

## La chromatographie en phase liquide moderne et ses applications

par Robert Rosset et Marcel Caude

*(Laboratoire de chimie analytique de l'École Supérieure de Physique et de Chimie de Paris, 10 rue Vauquelin, 75231 Paris Cédex 05).*



R. Rosset



M. Caude

### Introduction

La chromatographie en phase gazeuse fit son apparition dans les laboratoires d'analyse dans les années 50. Son développement fut si rapide, elle résolut avec tant d'élégance un si grand nombre de séparations complexes (par exemple dans l'industrie pétrolière où l'on séparait en 20 minutes des coupes dont l'analyse avait demandé 20 ans par distillation fractionnée avec les appareils Poldbielniak) qu'elle devint la plus importante méthode chromatographique. Son intérêt n'a pas diminué depuis cette époque, bien au contraire. Elle reste la technique de prédilection de l'analyse organique et elle a fait bien des progrès depuis avec le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse qui est un outil extraordinaire pour l'analyste, donnant en quelques minutes l'identité de dizaines de pics chromatographiques, ou encore l'emploi des colonnes capillaires dont le brevet est tombé récemment dans le domaine public et sur lesquelles les constructeurs déploient leur ingéniosité, proposant maintenant des chromatographes spécialement conçus pour l'emploi de ces colonnes dont la résolution est spectaculaire.

Pourtant la chromatographie en phase gazeuse avec ses exigences sur la volatilité et sur la stabilité thermique des substances à analyser ne couvrait qu'une faible partie de l'analyse organique, 20 % environ des substances connues. Pour les autres, il fallait soit traiter les échantillons préalablement à l'analyse de manière à préparer des dérivés volatils ou moins polaires, soit se résoudre à opérer par chromatographie en phase liquide. Jusqu'en 1970, celle-ci n'avait guère changé depuis trente ans : les séparations sur colonnes étaient longues et fastidieuses ; les détecteurs étaient peu nombreux et une fois la séparation effectuée, l'analyste contemplant avec résignation la centaine de tubes à essai qui garnissaient le plateau du collecteur de fractions et qu'il allait lui falloir analyser pour obtenir un chromatogramme.

Certes, vers 1950, était apparue la chromatographie sur couche mince qui était une version technologique simplifiée de la chromatographie en phase liquide et qui connut un succès considérable en raison de sa remarquable simplicité et des nombreux problèmes d'analyse qu'elle permettait de résoudre. Mais elle présentait un inconvénient majeur, elle se prêtait mal à l'automatisation et surtout

ne fournissait des résultats *quantitatifs* que difficilement et avec une précision médiocre.

D'une manière assez inhabituelle, c'est la réflexion des théoriciens de la chromatographie en phase gazeuse qui fut à l'origine, en 1969, des progrès décisifs de la chromatographie en phase liquide sur colonne. Ils montrèrent que l'accroissement de la rapidité des analyses passait par l'emploi de phases stationnaires de granulométrie fine et homogène. Les problèmes technologiques soulevés par l'emploi de ces phases (qu'il fallut également fabriquer) furent résolus.

## I. Place de la chromatographie en phase liquide (CPL) dans la classification des méthodes chromatographiques (1)

La CPL fait appel à quatre types de phénomènes fondamentaux :

● **l'adsorption** lorsque la phase stationnaire est un solide adsorbant (silice, alumine) et que la séparation est fondée sur les différences d'adsorption des molécules du mélange par la phase fixe. On parle aussi de chromatographie liquide-solide. C'est en général la meilleure méthode pour la séparation d'isomères de position ou de composés polyfonctionnels. Elle permet aussi la séparation de composés portant des groupements fonctionnels différents en fonction de leur polarité. Par contre, les chaînes hydrocarbonées, très peu polaires, n'ayant que peu d'influence sur l'adsorption, cette méthode ne convient pas pour la séparation des composés qui diffèrent entre eux seulement par le nombre ou la longueur des radicaux alkyles. C'est en chromatographie d'adsorption que l'on trouve actuellement les phases ayant atteint le plus grand degré de perfection : silices poreuses de granulométrie fine et homogène (5  $\mu\text{m}$ ), sphériques ou de formes irrégulières de surfaces spécifiques variées, aluminés.

● **le partage**, lorsque la séparation est fondée sur des différences de solubilité (ou plus généralement d'interactions) des molécules à séparer dans la phase liquide qui imprègne ou qui est greffée sur un solide convenable. On parle alors de chromatographie liquide-liquide. Actuellement, on n'utilise pratiquement plus que les phases greffées sur silice. Celles-ci peuvent être polaires (par exemple silices greffées alkyl nitrile -CN ou amine -NH<sub>2</sub>, ou à groupements nitro -NO<sub>2</sub> ou alcool -OH) et la phase mobile utilisée est peu polaire. C'est la chromatographie de partage classique. Elle est surtout utilisée pour la séparation des composés polaires, trop fortement retenus sur les adsorbants.

On dispose également de phases greffées peu polaires, silices dites

Vers 1973, les premiers appareils commerciaux apparaissaient sur le marché de l'instrumentation, aussi bien chromatographiques que détecteurs. Dès lors, les progrès furent très rapides et actuellement la méthode est en plein essor s'attaquant avec succès à d'innombrables problèmes de séparation, par exemple dans le domaine du métabolisme des médicaments qu'elle est en train de bouleverser.

Nous nous proposons ici de donner les principes de base de la méthode dont nous illustrerons les possibilités par quelques exemples de séparation issus de travaux réalisés dans notre laboratoire.

-CH, par exemple à greffons octadécyl ou octyl. La phase mobile est alors polaire et on parle de chromatographie à polarité de phases inversée (ou plus simplement mais incorrectement «à phases inversées»). Elle est utilisée pour la séparation des composés non polaires tels les hydrocarbures à longue chaîne.

● **le partage par formation de paires d'ions** : cette technique peut être mise en œuvre en partage classique (la phase stationnaire est alors souvent de la silice de fine granulométrie ou en partage à polarité de phases inversée (sur silice greffée octadécyl ou octyl)). Elle est utilisée pour la séparation de substances ionisées ou ionisables. Par exemple, si le soluté est un anion A<sup>-</sup> on formera une paire d'ions avec un cation B<sup>+</sup> (appelé «contre-ion») qui sera extraite par la phase mobile.

Le choix raisonné de la nature et de la concentration du contre-ion, de la phase mobile, de la force ionique et du pH permet d'obtenir une très grande sélectivité.

● **l'échange d'ions** : la phase stationnaire est alors un échangeur d'ions généralement constitué d'un haut polymère du type polystyrène réticulé par du divinylbenzène et comportant des groupements fonctionnels ionisés ou ionisables. Les échangeurs d'ions se prêtent bien à la séparation des substances ionisées. Toutefois, ils permettent aussi la séparation de molécules variées en raison d'interactions possibles avec le réseau macromoléculaire de l'échangeur.

● Nous laisserons de côté la chromatographie d'exclusion (dite encore de perméation ou de filtration sur gel) fondée sur la séparation des molécules en fonction de leur taille et qui est plutôt réservée aux produits de masses moléculaires élevées (> 2000).

## II. Caractéristiques de la chromatographie en phase liquide moderne

Il faut faire intervenir trois grandeurs : les coefficients de diffusion dans les liquides, la viscosité et la compressibilité des liquides.

### II. 1. Coefficients de diffusion

Ils sont de l'ordre de 10<sup>-5</sup> - 10<sup>-6</sup> cm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>, de sorte que les vitesses de diffusion dans la phase mobile stagnant dans les pores de la phase stationnaires sont faibles et les échanges entre phase stationnaire et phase mobile sont lents. Avec les colonnes classiques remplies de phases stationnaires de granulométrie de l'ordre de 100 à 200  $\mu\text{m}$ , on était obligé de faire percoler la phase mobile à faible vitesse, d'où des séparations longues.

Pour accélérer les séparations, il faut accroître la vitesse des échanges, ce qui peut être obtenu de deux manières différentes :

a) en utilisant des phases stationnaires de granulométries très fines, la profondeur des pores diminuant avec la taille des particules. Actuellement, on n'utilise guère que des grains de 10, ou mieux, de 5  $\mu\text{m}$ . Le gain d'efficacité des colonnes est considérable.

De nombreux auteurs (2-7) ont montré, en effet, que l'on avait entre la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) H qui mesure l'efficacité d'une colonne chromatographique et le diamètre  $d_p$  des particules de phase stationnaire une relation du type  $H = A d_p^\beta$ , A et  $\beta$  étant des constantes pour une colonne et une séparation données avec  $\beta$  de l'ordre de 1,8. Diviser le diamètre des particules par 2 multiplie donc par 3,5 le nombre de plateaux contenus dans une colonne de dimensions données.

Nous verrons plus loin les problèmes technologiques que pose

l'emploi de ces fines particules : remplissage des colonnes et perte de charge.

b) En utilisant des phases stationnaires dites «pelliculaires» constituées d'un support sphérique imperméable à la phase liquide, par exemple des billes de verre, sur lequel on dépose une fine couche superficielle de la phase stationnaire qui peut être aussi bien des microsphères de silice qu'une pellicule de résine échangeuse d'ions. Le diamètre du support est généralement de l'ordre de 30 à 50  $\mu\text{m}$ , tandis que l'épaisseur de la pellicule est d'environ 1 à 2  $\mu\text{m}$ . Le principal inconvénient de ces supports est leur très faible capacité (100 à 1000 fois plus faible que celle des supports entièrement poreux). Ils ne peuvent pas être utilisés en chromatographie préparative, ni en chromatographie analytique pour l'analyse des traces où l'on doit alors injecter des quantités importantes d'échantillons (pour ne pas être en-dessous de la limite de sensibilité du détecteur), ce qui entraîne une surcharge des colonnes. Ces supports qui ont joué (et jouent encore) un rôle important ont tendance aujourd'hui à disparaître au profit des supports entièrement poreux de fine granulométrie.

### II. 2. Viscosité et perte de charge

La perte de charge d'une colonne en fonction de la vitesse linéaire de la phase mobile est donnée, en première approximation, par la loi de Darcy que nous écrirons sous la forme :

$$\Delta P = 10^{-3} \frac{\eta L v}{d_p^2}$$

dans laquelle :

$\Delta P$  est la perte de charge en bars

$\eta$  est la viscosité de la phase mobile en poise

$L$  est la longueur de la colonne en cm

$v$  est la vitesse linéaire de la phase mobile en  $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$

$d_p$  est le diamètre des particules en cm.

La perte de charge est proportionnelle à la viscosité de la phase mobile (laquelle est de l'ordre de la centipoise) et inversement proportionnelle au carré du diamètre des particules.

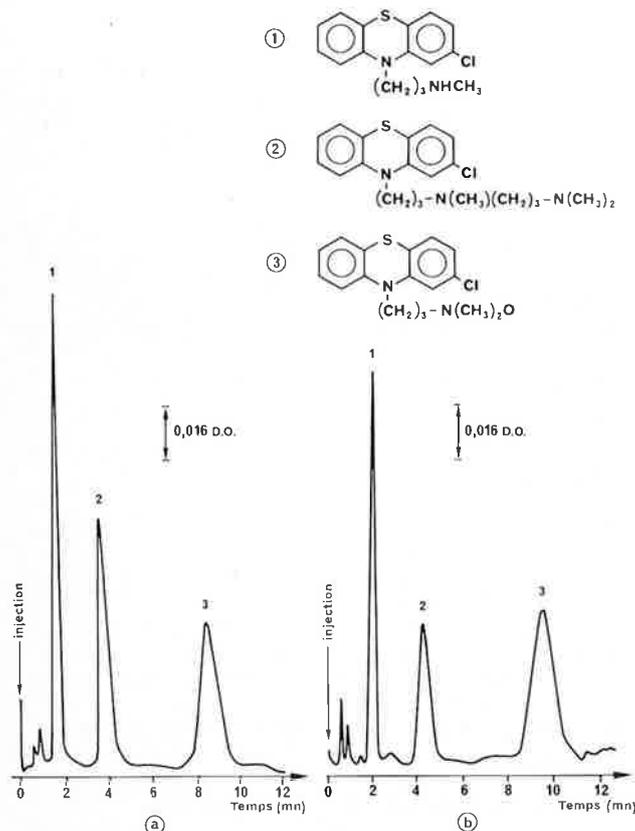


Figure 1. Organisation de la séparation de trois phénothiazines par chromatographie d'adsorption sur Sphérosil XOA 600 (d'après 9)

a) Colonne : longueur 25 cm ; diamètre intérieur 2,1 mm (1/8") ;  $d_p$  : 10  $\mu\text{m}$  ;  $v$  : 0,7  $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$  ;  $\Delta P$  : 35 bars.

b) Colonne : longueur 3 cm ; diamètre intérieur : 4,8 mm (1/4") ;  $d_p$  : 5  $\mu\text{m}$  ;  $v$  : 0,09  $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$  ;  $\Delta P$  : 1,5 bar.

Phase mobile : acétate d'éthyle anhydre, acétate d'éthyle saturé d'eau, méthanol anhydre, éthylamine en solution aqueuse à 33 % 60 : 20 : 20 : 0,25 (en volume).

### III. Efficacité des séparations par CPL

En plus de l'emploi de phases stationnaires très fines qui sont intéressantes sur le plan cinétique, trois raisons militent en faveur de la CPL sur le plan thermodynamique pour résoudre des séparations difficiles.

1. Alors qu'en chromatographie en phase gazeuse (CPG) il n'y a que



### IV. L'appareillage en chromatographie en phase liquide (11)

Nous avons représenté sur la figure 2 le schéma de principe d'un chromatographe en phase liquide ; le système le plus simple, fonctionnant à composition de solvant constante est figuré en trait

Ceci explique que, surtout au début du développement de la méthode, on ait été amené pour avoir des vitesses linéaires de phase mobile de l'ordre de 1  $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$  (ce qui était l'ordre de grandeur de celles réalisées en chromatographie en phase gazeuse et que l'on essayait d'atteindre) à opérer sous des pressions de 100 à 200 bars. Chromatographie en phase liquide moderne était alors synonyme de haute pression et il faut dire que certains constructeurs entretenaient la confusion en proposant des appareils capables de travailler sous pressions élevées.

Les nombreux travaux sur l'optimisation (8,9) des séparations chromatographiques ont montré qu'en fait, pour de très nombreuses séparations, on pouvait opérer à des pressions modérées, de quelques bars à quelques dizaines de bars, ceci à la condition de ne pas rechercher des séparations trop rapides. Il est un fait qu'en analyse une durée de 20 mn est souvent suffisante. On opère alors avec une vitesse assez faible de la phase mobile (de l'ordre de 0,1  $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ), une colonne courte ( $\leq 10$  cm de longueur) remplie de phase stationnaire de granulométrie 5  $\mu\text{m}$ .

Par exemple, la figure 1 montre qu'une séparation de phénothiazines réalisée en 10 mn avec une colonne de 25 cm remplie de silice 10  $\mu\text{m}$  sous une pression de 35 bars ( $v = 0,7 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ) peut être réalisée avec des résultats identiques du point de vue durée et résolution avec une colonne de 3 cm seulement remplie de silice 5  $\mu\text{m}$  sous une pression de 1,5 bar ( $v = 0,09 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

Ceci est très important car l'optimisation bien comprise des séparations par CPL ouvre la voie à des chromatographes simplifiés (à pression de gaz par exemple) peu onéreux, ce qui est essentiel si l'on veut que la méthode se développe en analyse de routine.

### II. 3. Incompressibilité des liquides

Aux pressions habituellement utilisées en CPL (< 300 bars) les liquides peuvent être considérés, à quelques exceptions près, comme incompressibles. L'emploi de ces pressions n'est donc pas dangereux.

Remarque : nous avons dit plus haut que l'on pouvait souvent effectuer les séparations sous des pressions modérées. Pourtant la plupart des laboratoires s'équipent avec des chromatographes haute pression. La contradiction n'est qu'apparente. Tout d'abord, le remplissage des colonnes chromatographiques avec des supports de faible granulométrie doit se faire obligatoirement par voie humide : on injecte dans la colonne sous haute pression (400 bars en général) une suspension du support chromatographique dans un liquide convenable. Par suite, il faut disposer, ne serait-ce que pour remplir les colonnes, d'un chromatographe haute pression. D'autre part, dans la recherche des conditions d'une séparation, il est fréquent que l'on ait à opérer avec des colonnes pouvant atteindre 25 cm et plus, et certaines phases mobiles ont une viscosité telle (par exemple les mélanges eau-alcool couramment utilisés en chromatographie de partage à polarité de phases inversée ou les solutions aqueuses salines en chromatographie d'échange d'ions), que des pressions de 100, 200 ou 400 bars peuvent être nécessaires.

des interactions du soluté avec la phase stationnaire, en CPL il y a des interactions avec la phase stationnaire et avec la phase mobile d'où des possibilités beaucoup plus grandes.

2. Les phases stationnaires de la CPL sont très variées : adsorption, partage, échange d'ions, et peuvent résoudre des problèmes divers.

3. On opère généralement à la température ordinaire. Or les interactions moléculaires augmentent d'intensité lorsque la température diminue.

plein (régime isocratique). On peut y adjoindre :

● un dispositif pour gradient qui peut être soit une seconde pompe commandée par un programmeur, soit plus récemment, un micro-

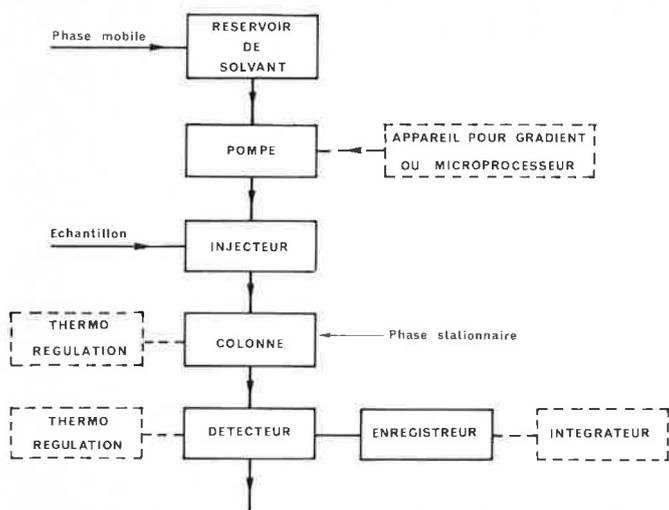


Figure 2. Schéma de principe d'un chromatographe en phase liquide.

processeur permettant d'automatiser et de contrôler l'ensemble des conditions opératoires, en particulier le volume d'admission des solvants dans la chambre de mélange ;

- un intégrateur en vue de l'automatisation des analyses quantitatives ;
- des dispositifs de thermorégulation, soit pour la colonne chromatographique placée dans une enceinte thermorégulée, soit pour le détecteur, en raison de la grande sensibilité de certains types de détecteurs aux fluctuations de température.

Les différentes parties de l'appareillage en contact avec la phase mobile sont construites en acier inoxydable type 316, qui présente le double avantage d'une remarquable tenue à la pression et d'une bonne résistance à la corrosion chimique.

Notons cependant la nécessité de débarrasser les solutions aqueuses de l'oxygène dissous et d'éviter les milieux chlorure et fluorure.

Nous examinerons succinctement les éléments principaux de l'appareillage :

#### IV. 1. Systèmes de pompage

Ils doivent avoir des pressions de refoulement élevées ( $\geq 350$  bars) et des débits volumiques suffisants ( $600 \text{ ml.h}^{-1}$ ).

On distingue deux types de pompes :

- les pompes mécaniques
- les pompes pneumatiques.

a) Pompes mécaniques : les pompes mécaniques peuvent être à piston, à diaphragme ou du type «seringue».

Les pompes à piston ou à diaphragme connaissent un grand succès et leur utilisation tend à se généraliser. Elles présentent l'avantage de pouvoir délivrer un volume illimité de solvant et se prêtent bien, du fait de leur faible volume mort, aux techniques de recyclage. Par contre, elles présentaient l'inconvénient de fournir un débit pulsé, mais la mise au point de plusieurs corps de pompe fonctionnant avec un déphasage approprié ( $180$  ou  $120^\circ$ ) associé à un système d'électrovannes commandées électroniquement permet d'obtenir un débit de phase liquide sans pulsation.

Les pompes seringues dans lesquelles un piston se déplace à l'aide d'une vis sans fin actionnée par un moteur pas à pas, ont l'avantage de refouler le liquide à vitesse constante sans aucune pulsation et ceci à de très fortes pressions (600 bars). Elles ont l'inconvénient de ne pouvoir délivrer qu'un volume limité de solvant et de nécessiter un rinçage soigné de la seringue lors du changement de la nature du solvant.

b) Pompes pneumatiques : ces pompes fonctionnent sous l'effet de la pression d'un gaz, soit directement sur la phase mobile, soit sur un réservoir déformable placé dans une enceinte pressurisée, soit encore sur un piston qui isole la phase mobile de ce gaz. Grâce à

de grands coefficients d'amplification, on peut atteindre des pressions élevées à partir de pressions de gaz modérées : par exemple, dans le cas de la pompe Haskell pour chromatographie, on peut obtenir des pressions d'utilisation de 460 bars pour une pression d'entrée maximale de 10 bars sur le piston primaire (le rapport des surfaces des pistons est de 46).

Comme l'obtention de chromatogrammes reproductibles exige la constance à  $\pm 1\%$  près du débit de la phase mobile, il est nécessaire (sauf pour les pompes «seringues») de disposer d'un système de régulation du débit de la phase mobile. En général, les pompes sont équipées d'un asservissement électronique, le débit est calculé en continu à partir d'une mesure de pression différentielle, de part et d'autre d'une perte de charge calibrée, la viscosité du solvant utilisé étant préalablement mise en mémoire.

#### IV. 2. Injecteurs (figure 3)

Il existe deux méthodes d'introduction de l'échantillon au sommet de la colonne, les injecteurs à seringue, les vannes à boucle d'échantillonnage.

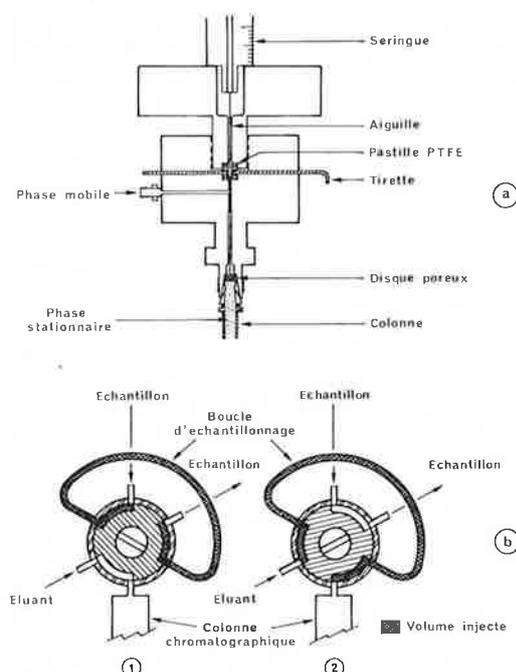


Figure 3. a) Schéma d'un injecteur à seringue du type «stop-flow». b) Vanne à boucle d'échantillonnage (1) : remplissage de la boucle (2) : injection de l'échantillon sur la colonne.

##### a) Injecteurs à seringue (figure 3a)

Avec ce type d'injecteur, l'injection est effectuée au moyen d'une seringue soit au travers d'un septum, la phase mobile étant en mouvement («continuous flow»), soit à l'arrêt («stop-flow»). La première méthode est recommandée pour des pressions n'excédant pas 200 bars (bien que des seringues pouvant supporter des pressions de 600 bars soient maintenant commercialisées). La seconde méthode est à la fois plus simple d'utilisation, compatible avec des pressions élevées et présente la même efficacité que la première du fait de la très faible diffusion de l'échantillon dans la phase liquide.

Les injecteurs à seringue permettent d'introduire l'échantillon au centre de la colonne dans des conditions d'efficacité optimale. En revanche, les résultats sont moins reproductibles qu'avec les vannes d'échantillonnage. Les injecteurs à seringue conviennent donc particulièrement bien aux analyses qualitatives.

##### b) Vannes d'échantillonnage

La solution à injecter, préalablement introduite dans une boucle ou un tiroir de volume connu, est entraînée en tête de colonne, après rotation ou translation de la vanne, par la phase mobile (figure 3b).

Ce type d'injecteur se prête bien aux injections sous haute pression aux analyses répétitives et à leur automatisation. Par ailleurs, en

permettant l'introduction de volumes importants, il convient bien aux séparations à des fins semi-préparatives ou préparatives.

#### IV. 3. Détecteurs

Le détecteur est l'un des organes essentiels d'un chromatographe en phase liquide puisqu'il permet de suivre en continu la séparation et de mesurer la concentration des solutés.

A la différence de la chromatographie en phase gazeuse, la CPL ne possède pas à l'heure actuelle de détecteur universel pratique et de détecteurs spécifiques de grande sensibilité.

Actuellement, les détecteurs à absorptiométrie dans l'ultraviolet ou le visible et la réfractométrie différentielle sont les plus utilisés.

##### a) Détecteurs à absorptiométrie dans l'ultraviolet et le visible

Après les détecteurs à longueur d'onde fixe (254 ou 280 nm), l'apparition sur le marché de spectrophotomètres à longueur d'onde variable (de 190 à 700 nm) a considérablement étendu leur domaine d'application ; ils restent cependant des détecteurs spécifiques dont la réponse dépend essentiellement du coefficient d'absorption molaire du soluté.

Le volume mort des cellules est généralement de 8  $\mu$ l pour un chemin optique de 1 cm et le temps de réponse est de l'ordre de 0,5 seconde. Ceci permet d'atteindre des quantités minimales détectables de l'ordre du nanogramme de substance dans les cas favorables. La plupart des solvants utilisés en CPL étant transparents dans le visible et l'ultraviolet, ce type de détecteur est très bien adapté pour la mise en œuvre de l'élution graduée.

##### *Formation de dérivés détectables*

On peut élargir le domaine d'application du détecteur précédent en réalisant avant ou après l'injection des solutés des réactions de dérivation conduisant à des produits détectables.

##### *Dérivation avant l'injection*

Un certain nombre de produits sont déjà commercialisés (Chromatags Regis), dans le cas en particulier des acides carboxyliques, amines, amino-acides, alcools, aminophénols, cétones, aldéhydes.

##### *Dérivation après l'injection*

Les très nombreuses données accumulées en chromatographie sur couche mince concernant des réactions spécifiques donnant naissance à des composés colorés ou fluorescents permettent d'envisager des détecteurs par réaction colorée en sortie de colonne chromatographique, puis utilisation d'un spectrophotomètre UV-visible ou d'un fluorimètre.

Les applications de ce genre de détecteur sont pour l'instant limitées à des mélanges complexes dans le domaine biologique <sup>(12, 13)</sup>. Les sensibilités atteintes sont en général grandes et la spécificité très bonne.

##### b) Réfractomètres différentiels

Le réfractomètre différentiel mesure en continu la différence d'indice de réfraction entre la phase mobile et l'effluent de la colonne. Sa principale qualité est donc son caractère universel, sauf dans le cas relativement rare où le soluté et la phase mobile ont rigoureusement le même indice de réfraction.

Le réfractomètre le plus récent (Optilab, commercialisé en France par les sociétés Interlab et Touzart & Matignon) mesure en permanence à l'aide d'un interféromètre la différence de chemin optique entre les cellules de mesure et de référence produite par la variation d'indice de réfraction, lors du passage du soluté (figure 4). Cette

conception permet d'une part d'atteindre une détectabilité environ 10 fois plus faible qu'avec les autres dispositifs (réfractomètre de Fresnel, réfractomètre à déviation) et d'autre part, d'utiliser des cuves à circulation de faible volume mort (5  $\mu$ l). Le plus grave défaut de la réfractométrie, c'est-à-dire son manque de sensibilité, se trouve ainsi atténué (la sensibilité de ce réfractomètre demeure toutefois environ 10 fois plus faible que celle des détecteurs par absorptiométrie dans l'ultraviolet). Il n'en reste pas moins que la réfractométrie nécessite une parfaite régulation de la température de la phase mobile, ce qui exige d'utiliser un ultrathermostat ( $\pm 0,01$  °C) et interdit tout gradient d'élution.

Les perspectives nouvelles des méthodes de détection en CPL sont explorées selon deux voies différentes <sup>(14)</sup> :

- d'une part, on recherche des détecteurs spécifiques, sensibles et relativement peu onéreux ;
- d'autre part, il serait intéressant de disposer d'un détecteur universel et sensible permettant les gradients d'élution.

La première voie a déjà conduit à la commercialisation récente de fluorimètres, spectrofluorimètres et de détecteurs électrochimiques.

##### c) Fluorimètres

Cette méthode de détection récemment introduite remporte déjà un grand succès du fait de sa sélectivité et de sa sensibilité. Un schéma de principe de l'appareil est donné sur la figure 5.

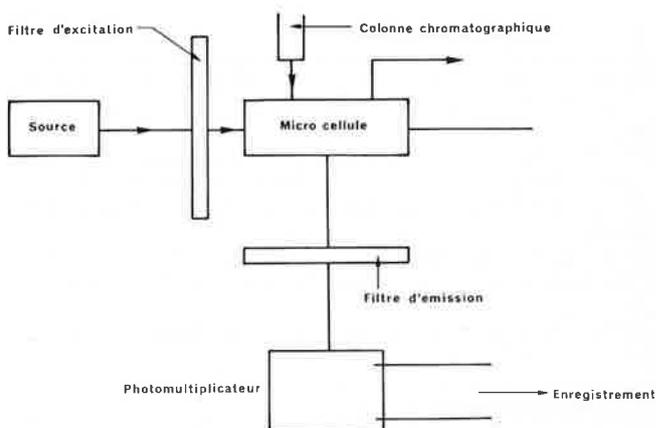


Figure 5. Schéma de principe d'un spectrofluorimètre.

Comme pour la détection par absorptiométrie dans l'ultraviolet, le domaine d'application de la fluorimétrie peut être élargi par la préparation de dérivés fluorescents soit avant l'injection, soit en sortie de colonne chromatographique.

Comme le montre la figure 6, la grande spécificité et sensibilité de ce détecteur le rend très utile dans le cas de l'analyse de traces. On peut ainsi détecter jusqu'à 5 picogrammes de LSD, soit  $2.10^{-14}$  mole dans des drogues <sup>(15)</sup>.

##### d) Détecteurs électrochimiques

Ces détecteurs utilisent les propriétés oxydo-réductrices des solutés, ce qui suppose que l'effluent de la colonne chromatographique soit suffisamment conducteur pour permettre le passage du courant.

On peut classer les détecteurs électrochimiques en deux catégories : les détecteurs coulométriques <sup>(16-19)</sup> qui réalisent l'électrolyse totale

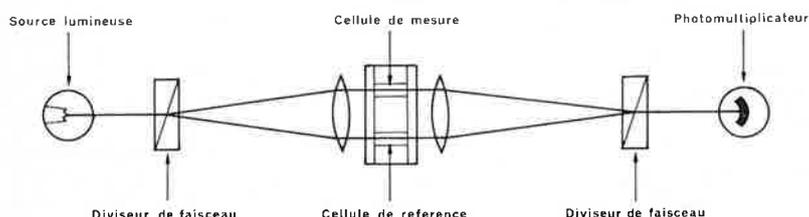


Figure 4. Schéma de principe du réfractomètre différentiel par mesure interférométrique de la différence de chemin optique entre les deux cuves (d'après un document Optilab).

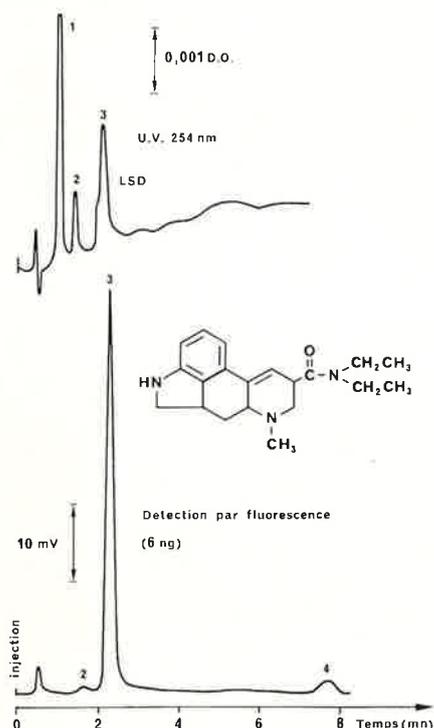


Figure 6. Séparation du L.S.D. par chromatographie de partage à polarité de phases inversée (d'après 15).

Colonne Micropak MCH-10 de 25 cm de long et de 2,2 mm de diamètre intérieur.

Phase mobile : solution aqueuse de carbonate d'ammonium 0,1 M, acétonitrile 50 : 50 (en volume).

Débit : 60 ml.h<sup>-1</sup>. Détection par fluorescence ; excitation à 330 nm ; émission > 420 nm.

du soluté lors de son passage dans la cellule et qui pour de multiples raisons sont mal adaptés à la chromatographie en phase liquide, et les détecteurs ampérométriques (20-22) qui n'effectuent qu'une électrolyse partielle du soluté.

Nous avons mis au point au laboratoire (23) un détecteur ampérométrique (figure 7) équipé d'une cellule de très faible volume mort (1 µl). Des détectabilités voisines de 10<sup>-10</sup> mole sont couramment

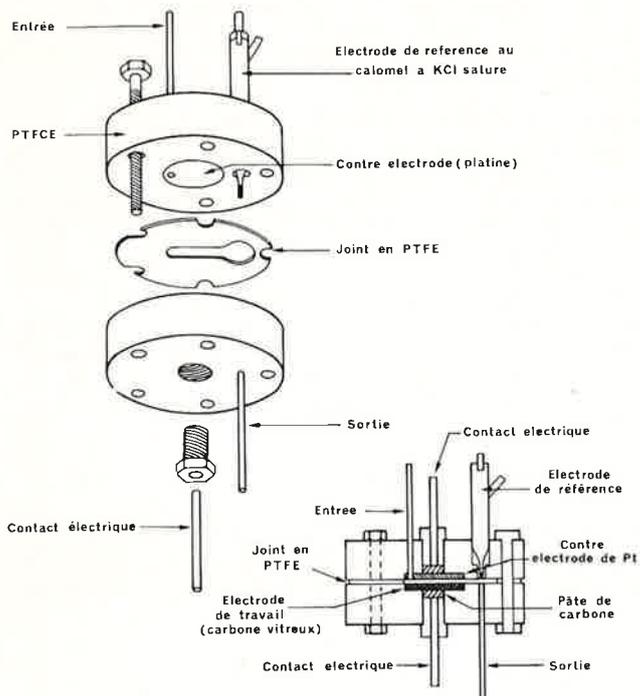


Figure 7. Schéma d'un détecteur électrochimique.

atteintes pour de nombreux composés organiques. Dans le cas des amines aromatiques, des dérivés phénoliques, des carbazoles, des amphétamines, etc. la limite atteint 10<sup>-14</sup> mole.

La détection électrochimique se généralise actuellement : plusieurs revues concernant son utilisation en chromatographie viennent d'être publiées (24, 25), et, d'autre part, quatre détecteurs ont été commercialisés.

La seconde voie est celle du couplage en ligne chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse.

Disons tout de suite que ce mode de détection peut sembler incompatible avec la CPL (26). En effet, d'une part le volume de phase mobile à éliminer après évaporation dépasse largement les capacités de pompage des systèmes de vide utilisés en spectrométrie de masse, d'autre part les solutés traités en CPL sont, soit thermolabiles, soit peu volatils, ce qui est, dans les deux cas, peu favorable à leur vaporisation aux températures de source.

Toutefois, quatre solutions sont proposées pour s'affranchir de ces difficultés :

- utilisation d'un diviseur d'effluent à l'entrée du spectromètre de masse (27-29) ;
- utilisation d'une source à pression atmosphérique (30) ;
- enrichissement de l'effluent en soluté à l'aide d'un séparateur à membrane (31) ;
- enrichissement de l'effluent en soluté par évaporations successives du solvant (32) (passage de l'effluent à l'aide d'un fil dans plusieurs chambres à vide).

Les principaux avantages de ce mode de détection sont sa grande sensibilité (10<sup>-5</sup> à 10<sup>-11</sup> g de soluté), son caractère universel et ses possibilités d'identification des solutés inconnus.

Cependant, le coût de l'appareillage et sa haute technicité en feront plutôt un « détecteur » de recherche destiné à des spécialistes qu'un appareil de routine.

#### IV. 4. Gradient d'élution

La mise en œuvre d'un gradient d'élution lors de la séparation de mélanges complexes permet d'optimiser les valeurs des facteurs de capacité et par là de réduire les temps d'analyse. La programmation de solvant en CPL joue le même rôle que la programmation de température en CPG.

Deux dispositifs de gradient sont utilisés : l'un faisant appel à une seule pompe, l'autre à deux pompes.

##### a) Dispositif à une seule pompe (figure 8)

La pompe utilisée est toujours une pompe à piston. Le serpentin C d'un volume voisin de 140 ml est préalablement rempli avec le solvant B. Ensuite, la forme du gradient est conditionnée par la

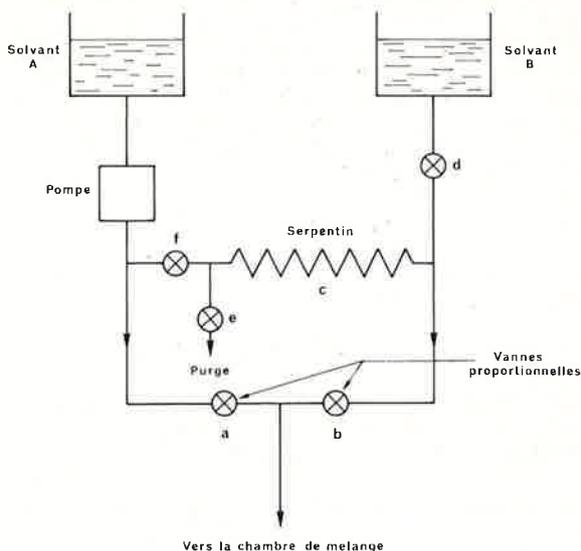


Figure 8. Schéma de principe d'un gradient d'élution avec une seule pompe (d'après 33).

commande électronique des vannes proportionnelles a et b (le volume des solvants A et B admis dans la chambre de mélange est proportionnel aux temps d'ouverture des vannes <sup>(33)</sup>).

La version la plus moderne (figure 9) utilise trois solvants avec une vanne proportionnelle à trois voies commandée par un microprocesseur <sup>(34)</sup>.

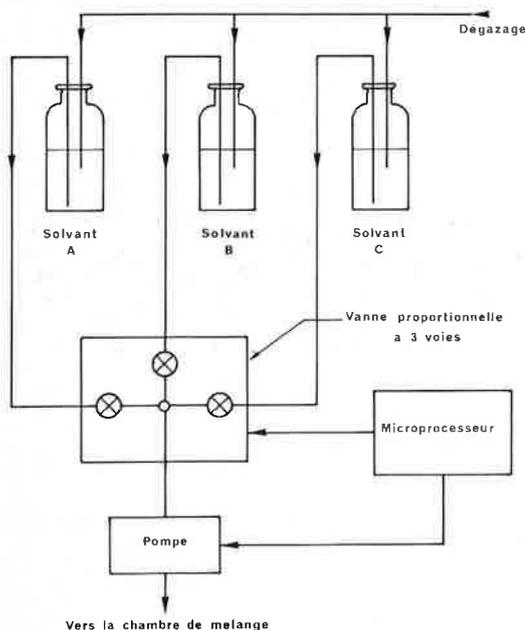


Figure 9. Schéma de principe d'une élution graduée avec trois solvants et une seule pompe commandée par un microprocesseur (d'après un document Spectra-Physics).

## V. Exemples d'applications

Nous avons choisi quelques exemples de séparations réalisées au laboratoire et faisant appel à la chromatographie d'adsorption, de partage et d'échange d'ions.

### V. 1. Chromatographie d'adsorption

#### a) Séparations de produits pharmaceutiques associés dans divers médicaments <sup>(35)</sup>

L'industrie pharmaceutique associe généralement dans les médicaments commerciaux différentes substances dont les effets se veulent complémentaires.

Le contrôle des médicaments exige donc des méthodes rapides et précises permettant de doser les différents constituants des préparations considérées. Nous montrons ici sur trois exemples comment la chromatographie en phase liquide peut s'appliquer au contrôle rapide de nombreux médicaments. S'agissant de composés présentant des groupements fonctionnels différents, toutes ces séparations ont été réalisées par adsorption sur silice entièrement poreuse et sphérique (Sphérosil XOA 600 5 µm).

##### ● Séparation de la benzocaïne et des chlorhydrates de procaïne et de tétracaïne

On rencontre ces trois composés dans un anesthésique dentaire. Leur séparation est représentée figure 11.

##### ● Séparation du phénobarbital, de la caféine, de l'amidopyrine et de la nicotinamide

Ces quatre substances sont associées dans des médicaments antipyrétiques. Une séparation en 10 minutes environ avec un solvant unique est possible comme en témoigne la figure 12.

##### ● Séparation de la lignocaïne, de l'acétate d'hydrocortisone et de la butazolidine.

On rencontre de tels mélanges dans les pommades anti-inflammatoires. La séparation à l'aide d'un solvant unique serait possible mais elle entraîne une durée d'analyse prohibitive ; c'est la raison pour

#### b) Dispositif à deux pompes (figure 10)

Ce dispositif très fiable et reproductible présente l'inconvénient par rapport au système précédent, d'immobiliser deux pompes ; notons cependant qu'en général ces deux pompes peuvent être débranchées très facilement pour être utilisées séparément en analyse de routine par exemple.

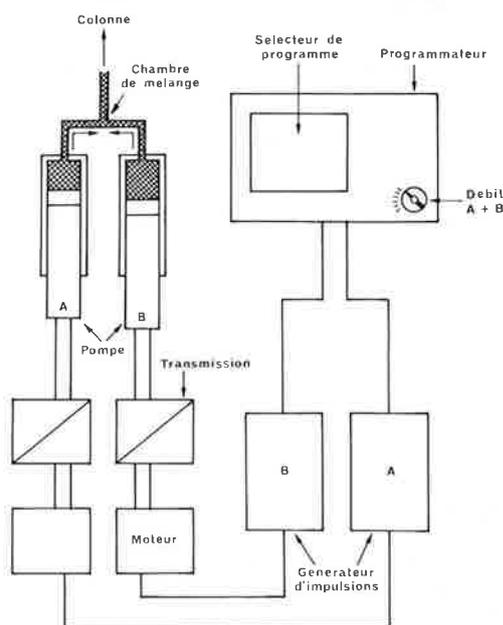


Figure 10. Schéma de principe d'un gradient d'élution avec deux pompes (d'après 1).

laquelle nous avons opéré par élution graduée. Le gradient utilisé et la séparation obtenue sont représentés sur la figure 13.

#### b) Séparation d'hydrocarbures aromatiques <sup>(36)</sup>

La caractérisation des hydrocarbures contenus dans les coupes pétrolières est un problème constant de l'industrie du pétrole.

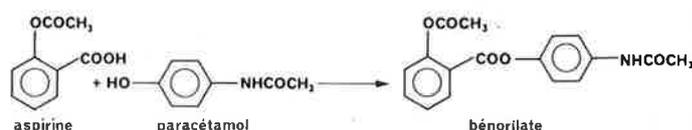
A titre d'exemple, la figure 14 représente la séparation en régime isocratique de onze hydrocarbures susceptibles d'être rencontrés dans des coupes pétrolières et en particulier dans beaucoup de lubrifiants. On remarquera la résolution totale des 1,2 et 3,4 benzopyrènes ; ces produits sont souvent présents à l'état de traces dans les huiles de coupe et le 1,2 benzopyrène est cancérigène <sup>(37)</sup>.

Il est important d'insister sur le fait que la reproductibilité des séparations réalisées par chromatographie d'adsorption dépend de l'activité de la phase stationnaire, elle-même fonction de sa teneur en eau, donc de celle de la phase mobile en équilibre avec elle <sup>(39, 38)</sup>. Il est indispensable que la teneur en eau de la phase mobile soit en équilibre avec celle de l'adsorbant. Nous avons soit adopté la méthode décrite dans <sup>(40)</sup> qui consiste à doser l'eau avec précision dans la phase mobile à l'entrée et à la sortie de la colonne et à ajuster la teneur en eau de l'influent de manière à ne plus observer de variation de la teneur en eau entre les solutions influente et effluente, soit utilisé des solvants isohydriques <sup>(41)</sup> c'est-à-dire des solvants dont la teneur en eau est en équilibre avec celle de l'adsorbant.

### V. 2. Chromatographie de partage

#### a) Identification et dosage des impuretés éventuelles du bénomilate <sup>(42)</sup>

Le bénomilate provient de la réaction d'estérification de l'acide acétylsalicylique (aspirine) par le p. acétylaminophénol selon la réaction :



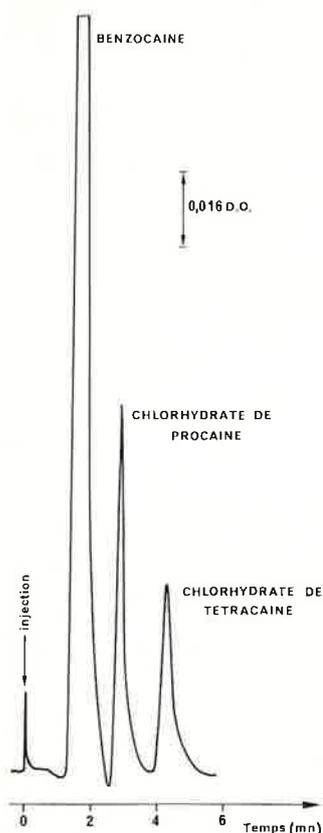


Figure 11. Séparation de la benzocaïne et des chlorhydrates de procaïne et de tétracaïne.

Colonne : longueur 15 cm ; diamètre intérieur 0,48 cm (1/4").  
Phase mobile : acétate d'éthyle-méthanol-éthylamine en solution aqueuse à 50 % (p/v) (93 : 6,86 : 0,14). Teneur en eau : 0,13 %.  
Débit : 80 ml.h<sup>-1</sup>. Injection de 10 µl d'une solution contenant 0,5 g de benzocaïne, 0,07 g de chlorhydrate de procaïne et 0,1 g de chlorhydrate de tétracaïne dans 100 ml de phase mobile. Détection U.V. à 254 nm, ΔP : 30 bars.

Tableau I

NOMS	Formules
acétoxy-2 benzoate d'acétamido-4 phényl (bénorilate)	<chem>CC(=O)Oc1ccc(cc1)C(=O)Oc2ccc(NC(=O)C)cc2</chem>
anhydride acétylsalicylique	<chem>CC(=O)Oc1ccc(cc1)C(=O)Oc2ccccc2</chem>
acide salicylique	<chem>Oc1ccc(cc1)C(=O)O</chem>
acide acétylsalicylique (aspirine)	<chem>CC(=O)Oc1ccc(cc1)C(=O)O</chem>
acide acétylsalicylsalicylique	<chem>CC(=O)Oc1ccc(cc1)C(=O)Oc2ccc(O)cc2</chem>
hydroxy-2 benzoate d'acétamido-4 phényl (salophène) (ester salicylique du N-acétyl p-aminophénol)	<chem>Oc1ccc(cc1)C(=O)Oc2ccc(NC(=O)C)cc2</chem>
acétoxy-2 benzoate d'acétamido-4 phényl (ester acétylsalicylique du p-aminophénol)	<chem>CC(=O)Oc1ccc(cc1)C(=O)Oc2ccc(N)cc2</chem>
N-acétyl para-aminophénol (paracétamol)	<chem>CC(=O)Nc1ccc(O)cc1</chem>
para-aminophénol	<chem>Nc1ccc(O)cc1</chem>

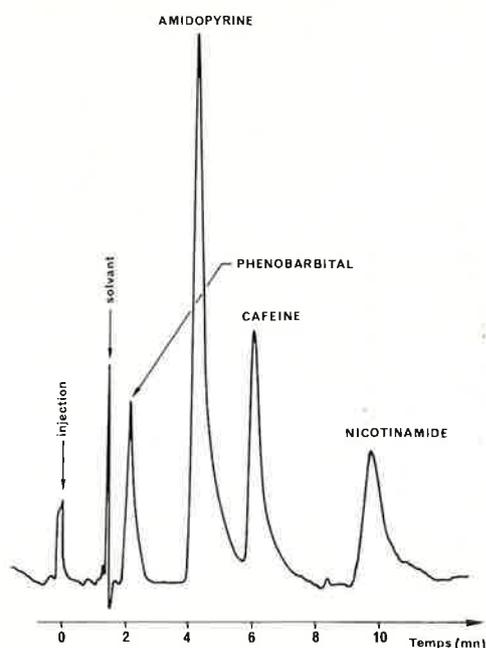


Figure 12. Séparation du phénobarbital, de l'amidopyrine, de la caféine et du nicotinamide.

Colonne : longueur 15 cm ; diamètre intérieur 0,48 cm (1/4").  
Phase mobile : éther isopropylique-méthanol-éthylamine en solution aqueuse à 50 % (p/v) (93 : 6,86 : 0,14). Teneur en eau : 0,07 %.  
Débit : 80 ml.h<sup>-1</sup>. Injection de 1,5 µl d'une solution contenant 2,5 mg de phénobarbital, 25 mg d'amidopyrine, 5 mg de caféine et 5 mg de nicotinamide dans 10 ml de méthanol. Détection U.V. à 254 nm. Sensibilité : 0,16 D.O. sauf pour l'amidopyrine (0,64 D.O.).  
ΔP : 30 bars.

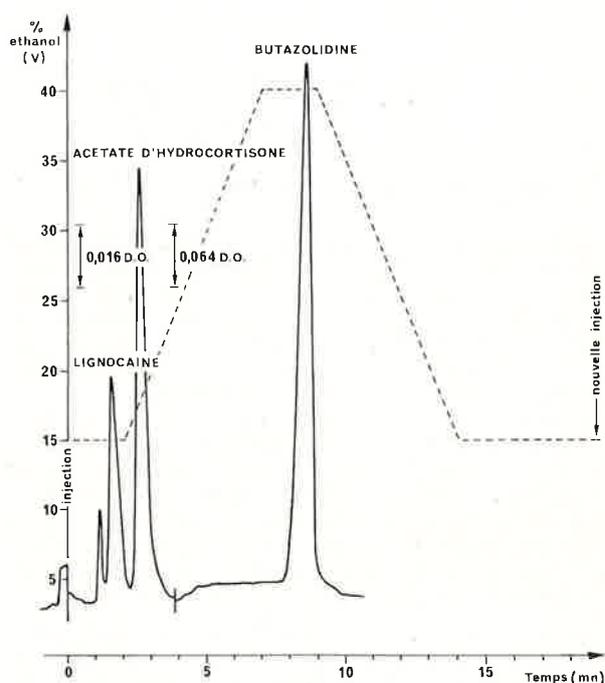


Figure 13. Séparation de la lignocaïne, de l'acétate d'hydrocortisone et de la butazolidine.

Colonne : longueur 15 cm ; diamètre intérieur 0,48 cm (1/4").  
Phase mobile : cyclohexane-éthanol additionné de 2 % d'une solution aqueuse d'éthylamine à 50 % (p/v). Le profil des concentrations est représenté sur le chromatogramme en fonction du temps ; il a été choisi de façon que chaque nouvelle injection soit faite lorsque la teneur en eau est constante et égale à 0,22 %.  
Débit : 80 ml.h<sup>-1</sup>. Injection de 3 µl d'une solution contenant 0,226 g de lignocaine base, 0,074 g d'acétate d'hydrocortisone et 0,262 g de butazolidine dans 100 ml de dichlorométhane. Détection U.V. à 254 nm. ΔP : 40-50 bars.

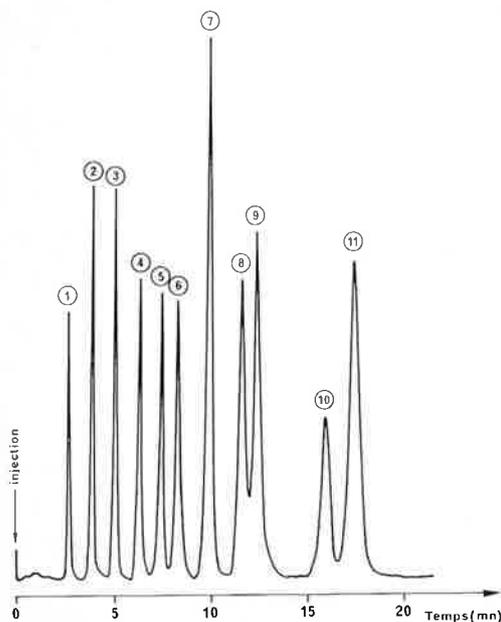


Figure 14. Séparation d'hydrocarbures aromatiques. Colonne : longueur 15 cm ; diamètre intérieur 0,48 cm (1/4"), remplie de Partisil 5  $\mu\text{m}$ .

Phase mobile : hexane contenant 8 ppm d'eau. Débit : 100 ml.h<sup>-1</sup> Détection U.V. à 254 nm.  $\Delta P$  : 40 bars.

- |                            |                   |
|----------------------------|-------------------|
| 1 benzène                  | 2 naphthalène     |
| 3 diméthyl-2,3 naphthalène | 4 anthracène      |
| 5 méthyl-2 phénanthrène    | 6 fluoranthène    |
| 7 phényl-2 naphthalène     | 8 3-4 benzopyrène |
| 9 1-2 benzopyrène          | 10 m-terphényl    |
| 11 p-terphényl             |                   |

Il possède les propriétés antalgiques de l'aspirine mais avec une meilleure tolérance (43).

Il fallait disposer pour contrôler la pureté de cet ester, d'une méthode d'analyse qualitative et quantitative des impuretés éventuelles qu'il peut contenir et qui peuvent provenir des matières premières et de la synthèse.

Les formules chimiques de ces différentes impuretés prévisibles sont rassemblées dans le tableau I.

En raison de la diversité des groupements fonctionnels rencontrés dans les molécules des différents produits à séparer et de leur caractère polaire, nous avons choisi de mettre en œuvre la chromatographie de partage classique en utilisant une phase stationnaire polaire (silice entièrement poreuse de 10  $\mu\text{m}$  greffée alkylnitrile) et une phase mobile peu polaire (mélange hexane-chlorure de méthylène renfermant des traces de méthanol et d'acide acétique).

Bien que la quasi-totalité des produits à séparer soit ionisable, nous avons écarté la chromatographie d'échange d'ions, car la présence d'eau aurait entraîné l'hydrolyse de l'anhydride acétylsalicylique et empêché de préciser la teneur de cette impureté dans le bénomilate. Nous avons opéré par élution graduée (figure 15). On obtient une séparation totale en 30 minutes environ. Remarquons toutefois que l'aspirine et l'acide salicylique sont élués au même temps de rétention et ne peuvent être séparés par cette méthode.

La reproductibilité de la séparation est excellente et l'analyse quantitative montre un écart-type relatif de  $\pm 0,54\%$  pour le produit principal et comprise entre  $\pm 6,2$  et  $\pm 13,6\%$  pour les principales impuretés éventuelles au seuil de confiance de 95%.

Quant à la limite de détectabilité, elle est comprise entre 2 nanomoles pour le p-aminophénol et 40 picomoles pour le salophène.

#### b) Séparation des dérivés phénylthiohydantoïne des amino-acides rencontrés lors de la dégradation d'Edman

La détermination de la structure des protéines en vue de leur biosynthèse passe par l'identification des séquences d'acides aminés qui les constituent. La méthode la plus couramment employée est la dégradation d'Edman (44) qui permet d'identifier l'acide aminé terminal sous la forme de son dérivé 3-phényl-2-thiohydantoïne (PTH amino-acide) après rupture de la liaison peptidique. L'identi-

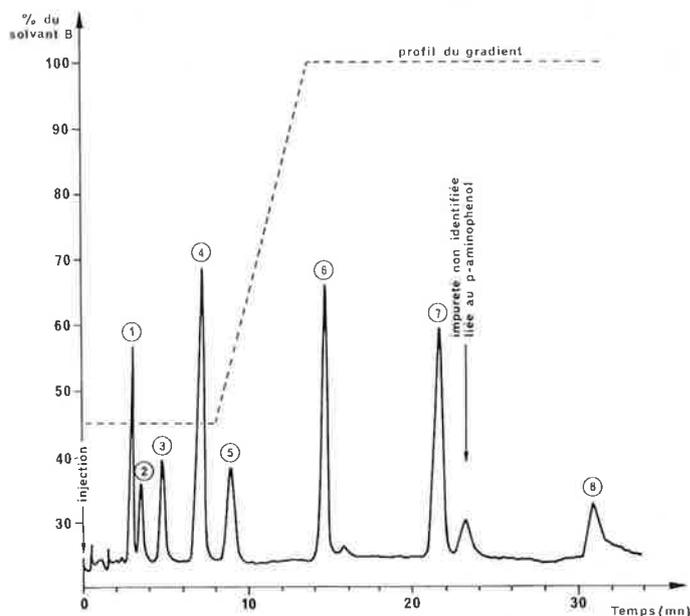


Figure 15. Chromatogramme du bénomilate et de ses impuretés éventuelles en solution dans le chlorure de méthylène

- 1 : anhydride acétylsalicylique (1 mg.ml<sup>-1</sup>) ;
- 2 : aspirine (0,5 mg.ml<sup>-1</sup>) ;
- 3 : acide acétylsalicylsalicylique (1,5 mg.ml<sup>-1</sup>) ;
- 4 : salophène (0,5 mg.ml<sup>-1</sup>) ;
- 5 : acétoxy 2 benzoate d'amino 4 phényl (1 mg.ml<sup>-1</sup>) ;
- 6 : bénomilate (0,5 mg.ml<sup>-1</sup>) ;
- 7 : paracétamol (0,5 mg.ml<sup>-1</sup>) ;
- 8 : p-aminophénol (1,5 mg.ml<sup>-1</sup>).

Colonne : longueur 25 cm ; diamètre intérieur 2,1 mm

Phase stationnaire : Micropak CN 10  $\mu\text{m}$

Phase mobile : solvant A : hexane-chlorure de méthylène-acide acétique (94,8 : 5 : 0,2) (v/v). Solvant B : hexane-chlorure de méthylène-méthanol-acide acétique (89,8 : 5 : 0,2) (v/v).

Débit : 90 ml.h<sup>-1</sup>.  $\Delta P$  : 70 bars. Quantité injectée : 3  $\mu\text{l}$

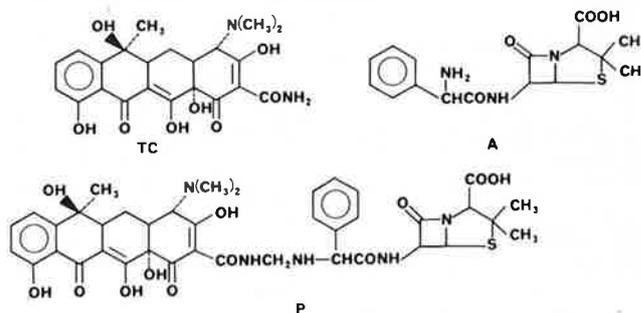
cation de l'acide peut alors être faite soit par une méthode soustractive, soit par l'analyse directe du dérivé PTH de l'acide terminal. Cette méthode permet donc de reconstituer progressivement la séquence en acides aminés de la protéine.

La figure 16 représente le chromatogramme obtenu sur une colonne de 25 cm remplie de silice poreuse 10  $\mu\text{m}$  greffée alkylnitrile (colonne Varian Micropak CN) avec une phase mobile constituée par un mélange hexane-chlorure de méthylène-isopropanol pour le mélange de dix-sept PTH amino-acides (45).

On voit que seize d'entre-eux sont séparés en 40 minutes environ. On peut ainsi identifier en une seule opération tout amino-acide provenant de la dégradation d'Edman.

#### c) Identification d'un antibiotique nouveau : la pénimocycline (46)

La pénimocycline (P) est un antibiotique nouveau (47) obtenu par réaction de Mannich entre la tétracycline (TC) et l'ampicilline (A). Son intérêt est de combiner les propriétés des deux fractions dont il est issu, en les améliorant, notamment dans les affections à germes intracellulaires comme la brucellose.



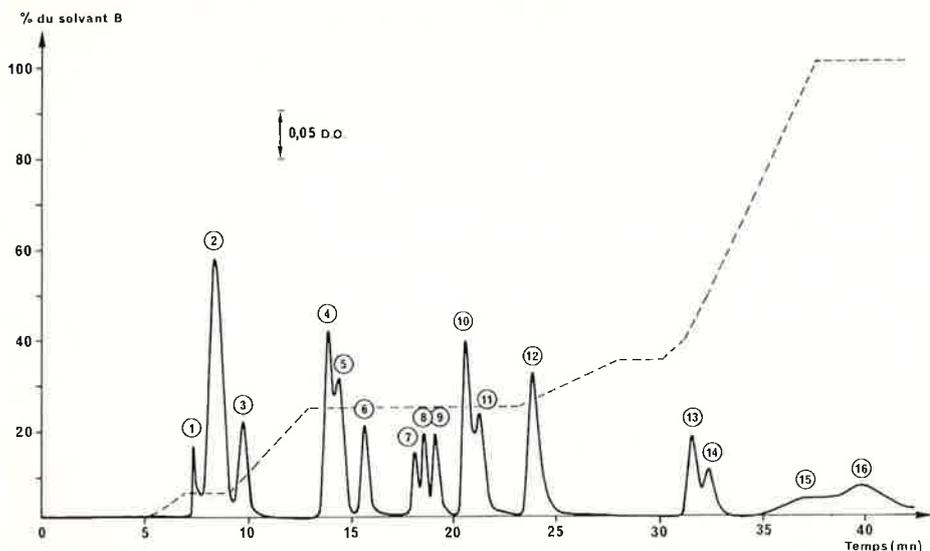


Figure 16. Séparation des PTH amino-acides rencontrés lors de la dégradation d'Edman.

Colonne : longueur 25 cm ; diamètre intérieur 2,1 mm (1/8") remplie de silice poreuse 10  $\mu$ m greffée alkylnitrile (Varian Micropak CN)

Eluants : (A) hexane ; (B) chlorure de méthylène-isopropanol 50 : 50 (v/v). Débit : 50 ml.h<sup>-1</sup>.  $\Delta P$  : 45-100 bars.

Le profil du gradient est représenté en tireté sur la figure. Détection par absorptiométrie à 254 nm.

1 proline – 2 leucine + isoleucine – 3 valine – 4 phénylalanine – 5 méthionine – 6 alanine – 7 thréonine – 8 glycine – 9 tyrosine – 10 lysine – 11 sérine – 12 tryptophane – 13 glutamine – 14 asparagine – 15 acide glutamique – 16 acide asparagique.

S'agissant d'un antibiotique fragile tant par la nature de ses constituants que par la liaison méthylène, son identification par les méthodes chromatographiques habituelles n'est pas possible. De plus, comme précédemment, il est important de connaître l'ensemble des impuretés présentes dans la pénimocycline. Il peut s'agir d'abord de celles qui accompagnent généralement la tétracycline et dont les teneurs sont limitées par les pharmacopées. Ce sont principalement la 4-épitétracycline (ETC), l'anhydrotétracycline (ATC) et la 4-épi-anhydrotétracycline (EATC). De plus, on peut aussi envisager la

présence des composés provenant de la réaction de Mannich sur les impuretés précédentes et qui seraient l'épipénimocycline (EP), l'anhydropénimocycline (AP) et l'épi-anhydropénimocycline (EAP).

Les meilleurs résultats ont été obtenus par chromatographie de partage à polarité de phases inversée, en utilisant une phase stationnaire apolaire constituée par une silice poreuse 10  $\mu$ m sur laquelle sont greffées des chaînes linéaires octadécyl (colonne Micropak CH) et une phase mobile polaire constituée par un mélange eau-méthanol tamponné à pH 7,6 (tampon phosphate 0,02 M). Un chromatogramme type est représenté figure 17.

De plus, cette méthode permet d'étudier l'hydrolyse de la pénimocycline.

La figure 18 représente les chromatogrammes obtenus immédiatement après la mise en solution d'une préparation de pénimocycline (figure 18 a : la teneur en pénimocycline est alors voisine de 85 %) et

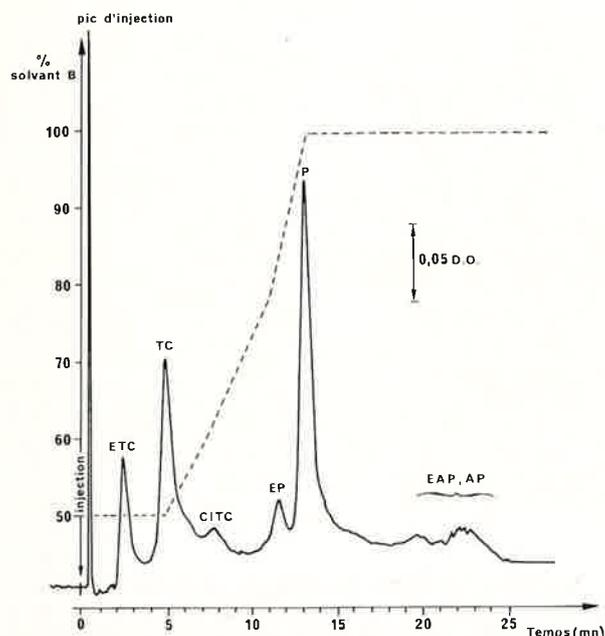
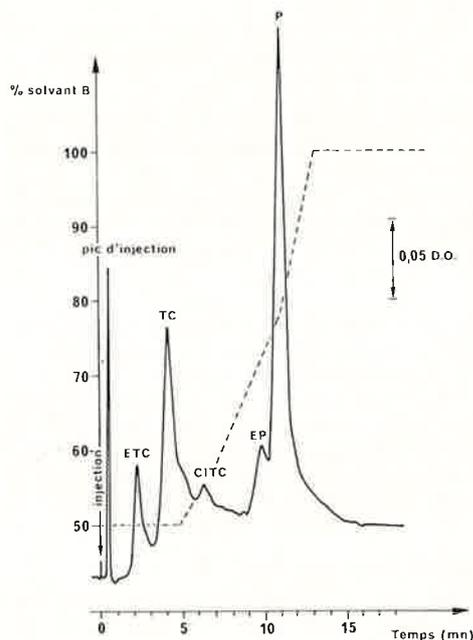


Figure 17. Chromatogramme d'une préparation de pénimocycline sur une colonne de 25 cm (2,1 mm de diamètre intérieur) Micropak CH.

Solvant A : solution aqueuse de tampon phosphate 0,02 M (pH 7,6) EDTA 10<sup>-3</sup> M.

Solvant B : solution de tampon phosphate 0,02 M en milieu eau-méthanol (50 : 50) EDTA 10<sup>-3</sup> M.

Le profil du gradient est représenté en tireté,  $\Delta P$  : 250-300 bars. Injection de 5  $\mu$ l d'une solution à 10 mg.ml<sup>-1</sup>.



(a)

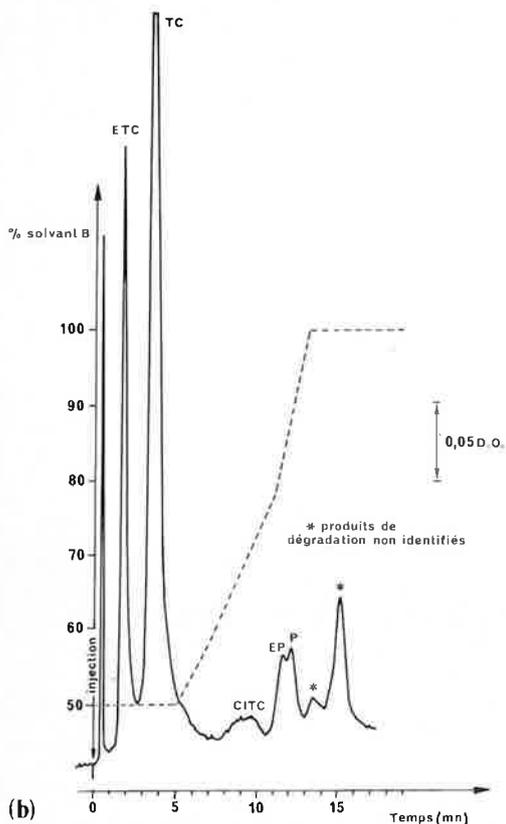


Figure 18. Hydrolyse de la pénimocycline en milieu DMSO anhydre.

(a) chromatogramme obtenu immédiatement après dissolution de l'échantillon. La préparation considérée contient environ 85 % de pénimocycline.

(b) chromatogramme obtenu 8 heures après. Conditions opératoires identiques à celles de la figure 17.

après 8 heures en solution dans le DMSO anhydre. On peut observer alors une très forte augmentation des pics de ETC et de TC au détriment des pics de EP et de P (figure 18 b). En milieu eau-méthanol (50 : 50) à pH 7,6 le temps de demi-vie de la pénimocycline peut être évalué à 30 minutes environ.

### V. 3. Chromatographie d'échange d'ions

#### a) Séparation des acides maléique, fumarique, acrylique et méthacrylique <sup>(48)</sup>

Les acides maléique, fumarique, acrylique et méthacrylique sont des acides carboxyliques insaturés qui constituent d'excellents philodienes et sont, de ce fait, des matières de base de la grande industrie chimique. Par ailleurs, ils coexistent dans de nombreuses solutions de synthèse, comme par exemple, les jus résiduels de la fabrication de l'anhydride phtalique. Leur analyse est un problème analytique important.

La chromatographie en phase gazeuse est difficilement applicable sans modification chimique préalable de l'échantillon car ces acides insaturés sont instables à la température de l'injection. Or, cette famille de composés est typiquement justiciable de la chromatographie en phase liquide, et une séparation parfaite du mélange (figure 19) est obtenue avec une résine échangeuse d'anions (Durrum X 4, 8 - 16  $\mu\text{m}$ ) du type base forte, et une phase éluante constituée par une solution aqueuse de fluorure d'ammonium 4 M tamponnée à pH 9.

#### b) Séparation des acides pyridine carboxyliques <sup>(49)</sup>

Les acides pyridine carboxyliques ou acides nicotiniques ne peuvent être dosés par un titrage acidimétrique en raison des valeurs trop voisines de leurs constantes d'acidité.

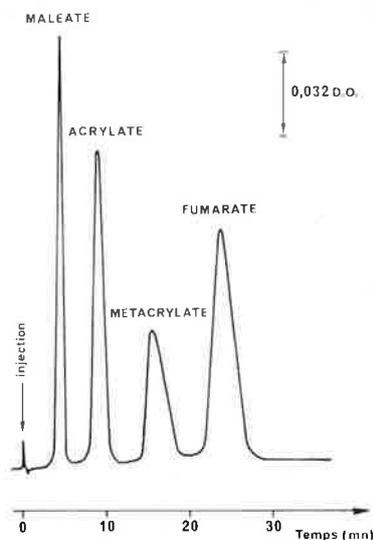


Figure 19. Séparation des acides maléique, acrylique, méthacrylique et fumarique sur une colonne de 10 cm de long et de 4,8 mm de diamètre intérieur (1/4") remplie de résine échangeuse d'anions base forte 8-16  $\mu\text{m}$ .

Phase mobile : solution aqueuse de fluorure d'ammonium 4 M tamponnée à pH 9. Débit : 280  $\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ .  $\Delta P$  : 90 bars. Détection U.V. à 254 nm.

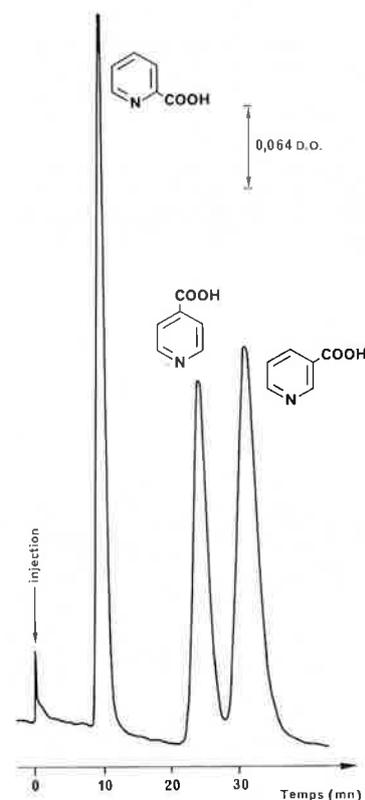


Figure 20. Séparation des acides picolinique, isonicotinique et nicotinique sur une colonne de 15 cm de long et de 4,8 mm de diamètre intérieur (1/4") remplie de Sphérosil échangeur de cations du type sulfonate 10  $\mu\text{m}$  (capacité d'échange : 1,7  $\text{meq}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

Phase mobile : solution aqueuse de nitrate de potassium 0,1 M et d'acide orthophosphorique 0,1 M. Débit : 550  $\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ .  $\Delta P$  : 90 bars. Détection U.V. à 254 nm.

Ce support échangeur d'ions expérimental a été synthétisé par la Société Rhône-Poulenc Industries, dans le cadre du contrat de recherches avec la D.G.R.S.T. n° 7570757, que nous tenons à remercier pour l'aide qu'elle nous a apportée.

acide pyridine-2 carboxylique (acide picolinique)		$pK_1 = 5,4$ $pK_2 = 1$
acide pyridine-4 carboxylique (acide isonicotinique)		$pK_1 = 4,9$ $pK_2 = 1,7$
acide pyridine-3 carboxylique (acide nicotinique)		$pK_1 = 4,8$ $pK_2 = 2$

Quant à la séparation par chromatographie en phase gazeuse, comme dans l'exemple précédent, elle passe obligatoirement par une estérifi-

## VI. Conclusions

Les exemples qui viennent d'être décrits montrent quelques-unes des possibilités de la chromatographie en phase liquide. Les séparations choisies n'avaient pu être réalisées par chromatographie en phase gazeuse, ou alors, pour certaines d'entre-elles, uniquement après une réaction chimique appropriée sur l'échantillon, ce qui complique les modes opératoires et entraîne parfois de sérieuses difficultés en analyse quantitative.

Actuellement la CPL est en plein essor. Les revues spécialisées de chromatographie publient chaque année des centaines de séparations nouvelles ou des adaptations des longues séparations d'autrefois. Un domaine très prometteur paraît être celui de l'analyse des médicaments ou de leurs métabolites dans les liquides physiologiques (sang, urine). Très souvent l'analyse est possible sans traitement préalable de l'échantillon et limite de sensibilité et précision sont fortement améliorées par rapport aux méthodes classiques d'analyse.

Les tendances pour les années à venir concernent des améliorations des méthodes de détection, le développement de la fluorimétrie par exemple, des détecteurs électrochimiques, la mise au point de réactions colorées sensibles et spécifiques, les progrès en instrumentation aussi bien pour la réfractométrie que pour le couplage CPL-SM.

## Bibliographie

- (1) R. Rosset, M. Caude et A. Jardy, Manuel pratique de chromatographie en phase liquide, Varian, Orsay, 1975, p. 2.
- (2) L. R. Snyder, *J. Chromatog. Sci.*, 1972, **10**, 200.
- (3) R.E. Majors, *J. Chromatog. Sci.*, 1973, **11**, 88.
- (4) M. Caude, Le Xuan Phan, B. Terlain et J.P. Thomas, *J. Chromatog. Sci.* 1975, **13**, 390.
- (5) J.H. Kirkland, *J. Chromatog. Sci.*, 1972, **10**, 129 et 1972, **10**, 593.
- (6) A. Jardy et R. Rosset, *J. Chromatog.*, 1973, **83**, 195.
- (7) I. Halasz et M. Naefe, *Anal. Chem.*, 1972, **44**, 76.
- (8) M. Martin, C. Eon et G. Guiochon, *J. Chromatog.*, 1975, **108**, 229 et 1975, **110**, 213.
- (9) M. Caude, J.P. Lefevre et R. Rosset, *Chromatographia*, 1975, **8**, n° 5, 217.
- (10) I. Halasz, H. Schmidt et P. Vogtel, *J. Chromatog.*, 1976, **126**, 19.
- (11) R. Rosset, M. Caude et A. Jardy, Manuel pratique de chromatographie en phase liquide, Varian, Orsay, 1975, p. 69.
- (12) C.D. Scott, *Sep. and Pur. methods*, 1974, **3** (2), 263.
- (13) W. Voelter et K. Zech, *J. Chromatog.* 1975, **112**, 643.
- (14) C. Bollet, *Analisis*, 1977, **5**, n° 4, 157.
- (15) E. Johnson, A. Abu-Shumays et S.R. Abbott, *J. Chromatog.* 1977, **134**, 107.
- (16) Y. Takata et G. Muto, *Anal. Chem.*, 1973, **45**, 1864.
- (17) D.C. Johnson, J. Laroche, *Talanta*, 1973, **20**, 959.
- (18) J. Lankelma, H. Poppe, *J. Chromatog.*, 1976, **125**, 375.
- (19) J. Devynck, A. Pique, G. Delarue, *Analisis*, 1975, **3**, 417. et H. Pinochet, Thèse 3<sup>e</sup> cycle, Paris, 1977.
- (20) B. Fleet, C.J. Little, *J. Chromatog. Sci.*, 1974, **12**, 747.
- (21) P.T. Kissinger, C. Refshauge, R. Dreiling, R.N. Adams, *Anal. Lett.*, 1973, **6** (5), 465.
- (22) R.C. Bucata, L.J. Papa, *J. Chromatog. Sci.* 1976, **14**, 213.
- (23) C. Bollet, P. Oliva et M. Caude, *J. Chromatog.* (sous presse).
- (24) P.T. Kissinger, C.J. Felice, W.P. King, L.A. Pachia, R.M. Riggan et Reshoud, *J. Chem. Ed.*, 1977, **54** n° 1, 50.
- (25) P.T. Kissinger, *Anal. Chem.*, 1977, **49**, n° 4, 447 A.
- (26) W.H. Mc Fadden, H.L. Schwartz et S. Evans, *J. Chromatog.*, 1976, **122**, 389.
- (27) M.A. Baldwin et F.W. Mc Lafferty, *Org. Mass Spectrom.*, 1973, **7**, 1111.
- (28) P.J. Arpino, B.G. Dawkins et F.W. Mc Lafferty, *J. Chromatog. Sci.*, 1974, **12**, 574.
- (29) V.L. Tal'Rose, V.D. Grishen, V.E. Skurate et G.D. Tantsyrev Recent developments in mass spectrometry, K. Ogata et T. Hayakawa Editeurs, University Park Press, Baltimore, 1970, p. 1218.
- (30) D.I. Carroll, I. Dzidic, R.N. Stillwell, K.D. Haegle et E.C. Horning, *Anal. Chem.*, 1975, **47**, 2369.
- (31) P.R. Jones et S.K. Yang, *Anal. Chem.*, 1975, **47**, 1000.
- (32) R.P.W. Scott, C.G. Scott, M. Munroes et J. Hess Jr, *J. Chromatog.*, 1974, **99**, 395.
- (33) R.P.W. Scott, Contemporary Liquid Chromatography, John Wiley and Sons Ed., New York, 1976, p. 118.
- (34) F.W. Karasek, Research, Development (sous presse).
- (35) M. Caude et Le Xuan Phan, *Chromatographia*, 1976, **9**, 20.
- (36) M. Thibert, C. Souteyrand et M. Caude (à paraître).
- (37) P.L. Gupta et P. Kuman, *Petroleum and hydrocarbon*, 1971, **6**, n° 2, 140.
- (38) L. R. Snyder, *J. Chromatog.*, 1964, **16**, 55.

cation préalable des trois acides. La figure 20 représente la séparation obtenue sur sphérosil échangeur de cations du type sulfonate. Ce nouveau support échangeur d'ions combine les avantages des résines échangeuses d'ions à matrice macromoléculaire (grande capacité d'échange) et du support siliceux (très bonne résistance à la pression).

On remarquera que l'élution de ces trois acides nicotiniques se fait selon l'ordre de leur  $pK_A$ ; par suite, la sélectivité est beaucoup plus grande pour le couple acide picolinique-acide isonicotinique ( $\Delta pK_A = 0,7$ ) que pour le couple acide isonicotinique-acide nicotinique ( $\Delta pK_A = 0,3$ ).

Si en adsorption les phases stationnaires paraissent bien au point maintenant, des progrès restent à faire sur le plan de la reproductibilité des analyses par une meilleure connaissance des mécanismes, en particulier du rôle de l'eau contenue dans les phases mobiles. Les notions de solvants isohydriques ou isoactivants devraient s'affirmer et s'étendre au cas des milieux peu polaires où la teneur en eau devient le paramètre prédominant.

En partage, des progrès restent à accomplir dans la préparation des phases greffées variées et stables. Toute une chimie du greffage sur silice devra être mieux comprise et mieux maîtrisée pour que ces phases connaissent la faveur des chromatographistes.

En échange d'ions, le développement de la technique souffre de ne pas disposer d'échangeurs d'ions ayant des propriétés mécaniques satisfaisantes pour pouvoir opérer sous haute pression. Là encore, le développement des silices échangeuses d'ions ou d'échangeurs de type résine améliorés sur le plan de la résistance à la pression paraît nécessaire.

C'est dire que les sujets d'inspiration ne manqueront pas au cours des prochaines années pour les chercheurs engagés dans le développement de la chromatographie en phase liquide à haute résolution.

- (39) L.R. Snyder, *J. Chromatog. Sci.*, 1969, **7**, 595.  
(40) L.V. Berry, H. Engelhardt, *J. Chromatog.* 1974, **95**, 27.  
(41) J.P. Thomas, M. Caude, A. Brun et J.P. Bounine, *Analisis*, 1977, **5**, n° 5, 205.  
(42) G. Chevalier, P. Rohrbach, C. Bollet et M. Caude, *J. Chromatog.* 1977, **138**, 193.  
(43) P. Rohrbach, M.J. Laroche, G. Teche, *Thérapie*, 1977, **32**, 89.  
(44) P. Edman, dans S.B. Needleman (Rédacteur), *Protein sequence determination*, springer, New York, Heildelberg, Berlin, 1970, p. 211  
(45) C. Bollet et M. Caude, *J. Chromatog.*, 1976, **121**, 323.  
(46) G. Chevalier, C. Bollet, P. Rohrbach, C. Risse, M. Caude et R. Rosset, *J. Chromatog.*, 1976, **124**, 343.  
(47) Brevet français, 1966, n° 1, 455 886.  
(48) J.P. Lefevre, M. Caude et R. Rosset, *Analisis*, 1976, **4**, n° 1, 16.  
(49) M. Caude et R. Rosset, *J. Chromatog. Sci.*, 1977, **15**, 405.