

CHROM. 5203

ÉTUDE THÉORIQUE ET EXPÉRIMENTALE D'UN GRADIENT D'ÉLUTION POUR LA CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE DES ACIDES ORGANIQUES

J. CARLES ET G. ABRAVANEL

Laboratoire de Physiologie Végétale, 31, rue de la Fonderie, 31-Toulouse (France)

(Reçu le 7 décembre 1970)

SUMMARY

Theoretical and experimental study of an elution gradient for the partition chromatography of organic acids

A general relationship between variation in solvent composition and elution time is proposed following the experimental determination of two specific coefficients for each of a group of organic acids. This relationship can be of value when studying and determining an elution gradient which permits the separation and identification of a particular group of organic acids.

INTRODUCTION

Très féconde par ses possibilités, la méthode de séparation et de dosage des acides organiques par chromatographie de partage, a le mérite d'être simple et relativement peu coûteuse dans sa mise en oeuvre. Toutefois BOVÉ ET RAVEUX¹ signalaient l'impossibilité d'éluer certains acides, en particulier l'acide quinique, et de séparer certains autres, tels que les acides lactique et succinique.

Depuis 1957, de nombreux perfectionnements ont été apportés à la méthode, en ce qui concerne la détection et le dosage des acides ou son automatisation²⁻⁴. Toutefois, à notre connaissance, il n'existe encore aucun moyen de prévoir l'effet d'un solvant sur la séparation de tel ou tel acide. Aussi avons-nous été amené à rechercher comment séparer d'une manière régulière et parfaitement prévisible la plupart des acides organiques.

EFFET D'UN SOLVANT CONTINUELLEMENT VARIABLE

Choix du mode de variation

Pour éluer successivement tous les acides, il faut employer un solvant chloroformique à proportion croissante de butanol. Si la variation de la teneur en butanol est trop rapide, certains acides de solubilités voisines ne seront pas séparés; si elle est trop lente, certains ne seront pas élués.

Nous avons choisi d'employer un solvant, dont la teneur en butanol augmente de 1% par heure, grace à un système régulateur du type autograde.

Résultats expérimentaux

Le chromatogramme obtenu à partir d'un mélange artificiel de 19 acides carboxyliques est représenté sur la Fig. 1; sur la droite de variation de la teneur en butanol en fonction du temps, nous avons indiqué l'heure de sortie de chacun des acides.

La durée totale de l'expérience est de l'ordre de 60 h et les acides sont groupés en quatre séries bien distinctes, mais à l'intérieur desquelles la séparation est plus ou

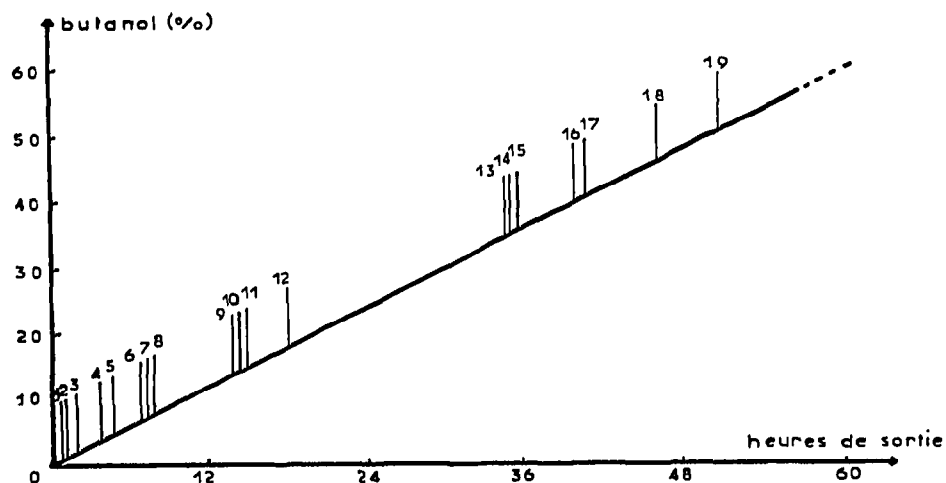


Fig. 1. Droite de variation continue du solvant, montrant la séparation des acides, identifiés par leur numéro d'ordre dans le Tableau I.

moins bonne. Par ailleurs d'importants temps morts séparent les différentes séries. Quoi qu'il en soit, cette expérience démontre la possibilité d'obtenir la séparation de tous les acides.

Discussion

En pratique, les seules intéressantes sont les zones de 0 à 4% de butanol, de 8 à 10%, de 14 à 16% et au-dessus de 35%. On peut donc obtenir un raccourcissement de la durée de l'analyse par un système d'autogrades qui supprimerait les teneurs intermédiaires correspondant à ces temps morts et ramènerait la durée totale de l'analyse à 23 h.

Cependant, certains acides sont assez mal séparés (lactique-succinique, aconitique-diméthylglycérique), tandis que d'autres le sont trop bien (malique-glycérique-tartrique). Dans les deux cas, la solution logique semble être le remplacement de certaines portions à teneur variable par un solvant à teneur fixe intermédiaire, en se fondant sur ce principe que, pour deux acides mal séparés, la séparation sera meilleure si le gradient de butanol s'arrête au niveau du premier, tandis que pour deux acides trop séparés, il convient de supprimer les gradients antérieurs pour garder celui qui fait sortir assez rapidement le dernier.

Ainsi, avec un solvant à 50 ou 60% de butanol peut-on réduire à quelques heures la distance qui sépare l'acide malique de l'acide quinique tout en conservant la sépa-

ration des acides intermédiaires. Inversement, on doit pouvoir améliorer la séparation des acides aconitique et diméthylglycérique, qui, avec le solvant progressif, sortent entre 9 et 10%, par un solvant constant à teneur de l'ordre de 9%, etc.

En conclusion une séparation de tous les acides peut être obtenue, dans un temps raisonnable, à l'aide d'un gradient d'éluion dont les marches doivent faire l'objet d'un choix judicieux.

C'est le problème de ce choix que nous allons tenter de résoudre en recherchant la relation qui permet de lier la teneur en butanol au temps d'éluion et l'effet de deux solvants successifs sur l'éluion d'un acide.

ÉTUDE THÉORIQUE DE L'ÉLUION

Exposé

Nous admettons avec MARTIN⁵, que le phénomène de séparation est dû à une chromatographie de partage et nous avons adopté la représentation cinétique envisagée par LEDERER ET LEDERER⁶,

Dans cette représentation, il existe un rapport constant entre la vitesse de déplacement de la zone, v , et la vitesse de déplacement du solvant, u :

$$v = \frac{u}{1 + K}$$

où K est le coefficient de partage moléculaire.

La variation élémentaire dl du déplacement pendant un intervalle de temps dt , sera

$$dl = v \cdot dt$$

et l'acide sera élué, lorsqu'il aura parcouru toute la longueur de la colonne, soit lorsque

$$\int_0^L dl = L = \int_0^\theta v \cdot dt$$

la limite supérieure θ est le temps d'éluion de l'acide.

Application au cas d'une succession de solvants à composition fixe

Dans le cas où le solvant a une composition fixe, la vitesse de déplacement de la zone est constante et $L = v\theta$. Cherchons quel est l'effet d'une succession de solvants à teneur en butanol x_1, x_2, \dots etc. sur le temps d'éluion d'un acide.

Soit un solvant contenant x_1 de butanol passant pendant un temps t_1 sur la colonne.

Un acide parcourra une longueur l_1 telle que $l_1 = v_1 t_1$ et comme

$$v_1 = \frac{L}{\theta_1}$$

on a

$$l_1 = L \frac{t_1}{\theta_1}$$

Si nous faisons arriver un deuxième solvant contenant x_2 de butanol, l'acide sera totalement élué dès qu'il aura parcouru la distance

$$l_2 = L - l_1$$

mais

$$l_2 = v_2 t_2 = L \frac{t_2}{\theta_2}$$

et le deuxième solvant devra passer un temps t_2 tel que

$$t_2 = \theta_2 \left(1 - \frac{t_1}{\theta_1} \right)$$

Tout se passe donc comme si le deuxième solvant était déjà passé pendant un temps

$$t'_2 = \frac{\theta_2}{\theta_1} \times t_1$$

Nous définissons ainsi pour le solvant x_1 , un "temps équivalent" en solvant x_2 .

On démontrerait de même que si le temps de passage t_2 du deuxième solvant est insuffisant pour faire sortir l'acide, un troisième solvant à teneur x_3 en butanol devrait passer pendant un temps t_3 tel que

$$t_3 = \theta_3 \left[1 - \left(\frac{t_1}{\theta_1} + \frac{t_2}{\theta_2} \right) \right]$$

En conclusion, on pourra prévoir l'effet de toute combinaison de solvants pourvu que l'on connaisse les θ correspondants. Malheureusement, ni la théorie, ni les travaux antérieurs, ne permettent de connaître pour chaque acide la forme de la variation du coefficient de partage en fonction de la teneur en butanol. Aussi avons-nous entrepris pour la plupart des acides courants, une étude systématique de l'influence de la teneur en butanol sur le temps d'éluion.

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE L'ÉLUTION

Appareillage

La technique utilisée est celle du dosage automatique des acides organiques par potentiométrie³. 300 mg de Célite, ayant absorbé 40 μ equiv. d'acides organiques, sont placés au sommet d'une colonne de Célite 535, de 12 cm de longueur et de 0.5 cm² de section. La phase stationnaire est constituée par 1.5 ml d'acide sulfurique 0.5 N. L'arrivée des solvants est réglée tant en ordre qu'en durée par un programmeur (Brevet CNRS 1 546 645), qui commande également l'ouverture des colonnes et la dérivation vers un collecteur de fractions. Le système de dosage comprend une pompe proportionnante Technicon assurant d'une part, le transfert des acides de la phase chloroformique à la phase aqueuse, et d'autre part le mélange à une solution tampon dont les variations de pH sont mesurées dans une microcellule Beckmann par un pHmètre couplé à un enregistreur.

Les analyses sont effectuées avec les débits suivants: solvant, 0.64 ml/min; eau, 2.00 ml/min; repompage, 0.64 ml/min; tampon, 1.20 ml/min.

Résultats expérimentaux

Nous avons porté, pour chaque acide étudié, le temps de sortie θ en minutes, mesuré sur l'enregistrement, en fonction de la teneur x en pour cent de butanol du solvant.

L'adoption d'un système de coordonnées semilogarithmiques permet de mettre en évidence certaines particularités de ces courbes (Fig. 2).

Quatre constatations importantes sont à noter: (1) Toutes les courbes sont sensiblement identiques par leur allure. (2) Chaque courbe possède une branche asymptotique qui lui est propre. (3) Chaque courbe possède une partie sensiblement linéaire. (4) Les courbes de deux acides différents ne se coupent jamais.

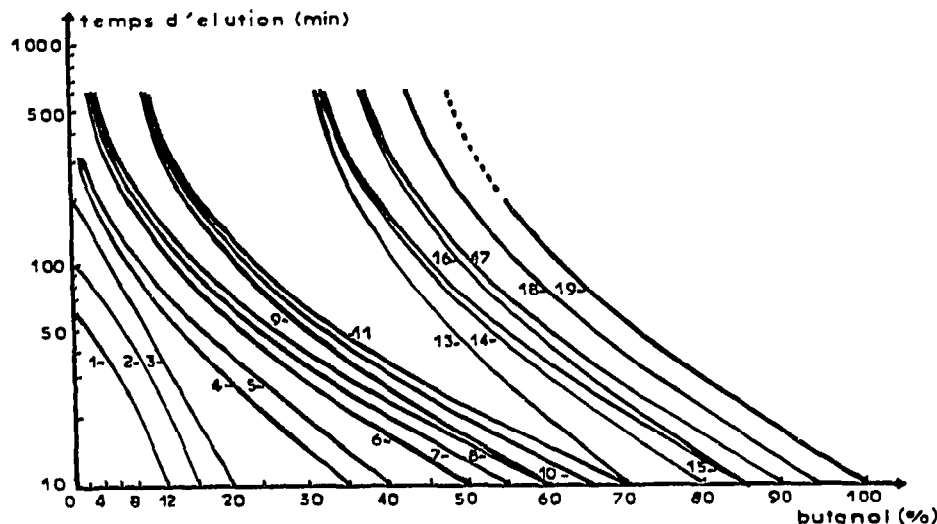


Fig. 2. Courbes de variation des temps d'éluion des acides organiques, en fonction de la teneur en butanol du solvant.

(4) Les courbes de deux acides différents ne se coupent jamais.

Il est donc possible de trouver une équation mathématique rendant compte de ce phénomène, dont la forme est la même pour tous les acides, la différenciation s'effectuant à l'aide de deux paramètres.

Représentation théorique

La fonction représentative du phénomène doit répondre à un certain nombre de conditions: (1) L'intervalle de variation de x doit être compris entre deux valeurs γ et α positives et inférieures ou au plus égales à 100. (2) Dans cet intervalle θ doit être positif et continuellement défini. (3) Lorsque $x \rightarrow \gamma$, $\theta \rightarrow \infty$. (4) Lorsque $x = \alpha$, $\theta = \theta_0$ valeur identique pour tous les acides. (5) Enfin θ doit avoir les dimensions d'un temps.

Nous proposons la relation

$$\theta = \theta_0 \frac{\alpha - \gamma}{x - \gamma} e^{\frac{\alpha - x}{\alpha - \gamma}}$$

où γ représente la teneur limite en butanol au dessous de laquelle l'acide n'est en aucun cas élué par chromatographie de partage, α représente la teneur en butanol

pour laquelle l'acide est entraîné avec le front et θ_0 est le temps mis par le solvant seul, pour parcourir la longueur L de la colonne.

$$\theta_0 = \frac{L}{u} = 10 \text{ dans notre appareil.}$$

Les paramètres α et γ sont déterminés pour chaque acide à l'aide de la courbe correspondante et les valeurs obtenues sont ajustées par confrontation avec les résultats expérimentaux.

Le Tableau I donne pour chaque acide étudié, les valeurs de γ et α correspondantes, et les valeurs de θ mesurées et calculées pour différentes teneurs en butanol du solvant.

On notera que les valeurs de α et γ permettent bien de classer les acides en

TABLEAU I

TEMPS D'ELUTION MESURÉS ET CALCULÉS (EN ITALIQUES)

No. Acides	γ	α	Teneur en butanol du solvant (%)										
			0	2	4	6	8	12					
1 Acétique	0	12	60	55	138	50	58	30	33	20	21	10	10
2 Formique	0	16	100	90	192	80	85	50	50	35	33	20	23
3 Fumérique	0	20	180	140	246	110	111	70	67	50	46	25	25
4 Lactique	0	35	210	180	212	130	212	134	100	95	60	36	36
5 Succinique	0	40	250	210	246	160	246	156	110	70	67	67	67
6 Malonique	2	50			626	300	200	192	110	110	106	106	106
7 Aconitique	2	55			694	334	220	214	120	119	119	119	119
8 Diméthylglycérique	2	60			792	368	240	237	130	133	133	133	133
9 Glycolique	8	60											327
10 Citramalique	8	65											361
11 Hydroxyglutarique	8	70											395
12 Oxalique	12	70											
13 Malique	30	70											
14 Citrique	30	80											
15 Isocitrique	30	85											
16 Glycérique	35	85											
17 Shikimique	35	90											
18 Tartrique	40	95											
19 Quinique	45	100											

quatre groupes, et de retrouver la séparation obtenue avec un solvant continuellement variable.

DISCUSSION

Insuffisance de la formule

Malgré l'accord remarquable obtenu pour la plupart des valeurs déterminées, il reste des écarts assez importants, en particulier pour les acides acétique et formique. De tels écarts s'observent également dans le cas des acides fumarique, lactique et succinique pour les très faibles valeurs de α .

Nous ne pensons pas que cela suffise pour infirmer notre relation, car en l'éta-

16	20	24	30	35	40	45	50	55	60
40									
50	38								
70	46								
80	50	40							
90	70	50	38						
150	79	57	43						
170	88	64	49						
180	90	65	45						
	151	94	65	42					
	105	75	50						
	168	105	73	49					
	115	80	55						
	185	116	81	55					
	368	172	107	65					
				180	90	50	35	25	15
				220	110	70	50	35	25
				246	111	67	46	33	25
				260	130	80	55	40	30
				273	125	76	52	38	29
					246	111	67	46	33
					273	125	76	52	38
						105	65	45	35
						125	75	50	35
						273	125	76	52
							125	75	55
							273	125	76
							> 200	130	80
							273	125	76

blissant, nous n'avons pas tenu compte de deux facteurs supplémentaires pouvant intervenir d'une manière importante: d'une part, la solubilité éventuellement possible de ces acides dans le chloroforme, qui est saturé d'eau, et d'autre part l'intervention d'un phénomène de chromatographie d'adsorption. En effet, les valeurs calculées sont de l'ordre du double des valeurs mesurées, ou bien très voisines de ces valeurs. Il semble donc qu'intervienne un facteur correctif, au voisinage de 0% de butanol.

Par ailleurs, il faut souligner la difficulté d'apprécier avec exactitude le moment où commence à sortir l'acide, donc à déterminer la valeur de θ lorsque x est voisin de γ c'est à dire, lorsque le pic est étalé. Ceci pourrait expliquer certains écarts observés.

Nous pensons donc que notre relation reste valable au moins en première approximation.

Variation minimale du taux de butanol

En prenant la dérivée logarithmique de l'expression

$$\frac{\Delta\theta}{\theta} = - \frac{\Delta\alpha}{\alpha - \gamma} - \frac{\Delta\gamma}{\gamma - x}$$

le signe négatif confirme bien que le temps d'élution augmente quand la teneur en butanol du solvant diminue.

En pratique, on peut apprécier une variation de θ égale au 1/10 de sa valeur. Ainsi, pour les acides dont le γ est voisin de 0 et pouvant être élués par des solvants contenant de 4 à 10% de butanol, il faut une variation de 0.5 à 1% dans la teneur, pour obtenir une variation appréciable de θ . Cette variation est de 2 à 3% environ pour les acides du groupe du glycolique et de 3 à 5% environ pour les acides du groupe du malique.

Extension de la relation

Bien que nous nous soyons limités à l'étude complète d'une vingtaine d'acides carboxyliques, nous pensons être en mesure de prévoir l'action d'un solvant donné pour n'importe quel autre acide. En effet, l'expérience montre, qu'en aucun cas il ne peut y avoir inversion de l'ordre de sortie de deux acides. Ainsi, un acide nouveau repéré entre deux acides connus doit nécessairement avoir des coefficients α et γ intermédiaires, l'ordre de sortie étant essentiellement conditionné par la solubilité dans le butanol.

Un acide A, sortant avant un acide B, est plus soluble dans le butanol que ce dernier. Son γ est donc égal ou plus petit que le γ de l'acide B.

Si $\gamma_A = \gamma_B$ les acides ne peuvent être séparés que si leurs courbes de solubilité sont distinctes, donc si $\alpha_A \neq \alpha_B$.

Par contre si $\gamma_A < \gamma_B$ les courbes de solubilité sont distinctes même si $\alpha_A = \alpha_B$.

Il est donc possible d'attribuer à un acide nouveau une valeur de α et une valeur de γ par comparaison avec deux acides connus et de corriger éventuellement ces valeurs par confrontation avec l'expérience.

APPLICATION: MISE AU POINT D'UN GRADIENT D'ÉLUTION

Si nous voulons doser les acides organiques du vin par exemple, nous en dres-

sons, grâce à la chromatographie sur papier, l'inventaire et nous les plaçons suivant leur ordre de sortie :

acétique	citramalique
formique	malique
fumarique	citrique
lactique	glycérique
succinique	tartrique
diméthylglycérique	quinique

Puisqu'il est possible de remplacer le solvant continuellement variable par un gradient convenablement choisi, nous allons tenter d'exposer le mode de ce choix.

Si faible soit la proportion de butanol dans le solvant, l'acide acétique et l'acide formique seront élués au cours de la première heure. Seul importe donc le choix d'un solvant qui assurera, d'une part la séparation de ces acides d'avec le fumarique, et d'autre part, la séparation des acides lactique et fumarique. Il semble qu'un palier à 4% remplisse ces conditions.

Ce même palier assurera une séparation convenable des acides lactique et succinique, mais les pics seraient longs à sortir et très étalés. Si, tout de suite après l'acide fumarique, nous augmentons brusquement le taux de butanol, à 8% par exemple, l'acide lactique et l'acide succinique sortiront très vite mais trop proches l'un de l'autre pour que la séparation soit bonne. Un palier intermédiaire à 6% maintiendra pratiquement la distance tout en resserrant légèrement les pics, et nous allons conserver ce palier jusqu'au moment où l'acide lactique est près de sortir. A ce moment l'arrivée du 8% active sa sortie sous la forme d'un pic bien résolu et suffisamment séparé de l'acide succinique. Le 8% sera prolongé jusqu'à la sortie de l'acide succinique, et nous pourrons alors passer tout de suite à 12% pour franchir rapidement le temps mort.

En somme, pour supprimer les temps morts et disperser convenablement les acides, il est intéressant d'utiliser des paliers successifs. Alors que les solvants précédents ont déjà commencé à déplacer les acides, on passe tout de suite à un palier assez élevé pour faire sortir très rapidement le premier du groupe et assez rapidement le dernier.

Dans ces conditions, et en tenant compte de tous les facteurs, nous sommes arrivés à déterminer le pourcentage de butanol de chaque solvant et la durée de son passage. Le gradient est donc composé comme suit :

Solvant (%)	4	6	8	12	30	60
Durée (min)	90	60	30	75	45	180

Avec ce gradient, les horaires de sortie (en min) sont les suivants :

acétique	50	succinique	180	citrique	330
formique	80	diméthylglycérique	255	glycérique	350
fumarique	115	citramalique	295	tartrique	390
lactique	160	malique	315	quinique	420

Il est d'ailleurs facile de calculer d'une manière assez précise l'heure de sortie

de chaque acide et de confirmer ainsi les détails du tableau qui réunit les données expérimentales.

Puisque l'acide succinique, par exemple, est élué par le 8% il a déjà, avant l'arrivée de ce solvant, subi 90 min de 4% et 60 min de 6%. Avec le seul 8% il sortirait en 110 min, avec le 6% en 156 min et avec le 4% en 246 min. 90 min de 4% représenteront donc: $(110 \times 90)/246$, soit 41 min de 8%, 60 min de 6% représenteront $(110 \times 60)/156$, soit 42 min de 8% ou 83 min au total; sur le 8% il sortira donc au bout de 110 — 83 soit 27 min. En comptant depuis le début de l'analyse, son horaire de sortie est donc de $(90 + 60 + 27)$ soit 177 min (l'expérience aboutit à 180).

Ainsi peut-on calculer avec assez de précision les horaires de sortie de tous les acides jusqu'au quinique qui sort 7 h après le début de l'analyse.

Grâce au programmateur, le temps de passage de chaque solvant est tout à fait régulier, l'horaire de sortie de chaque acide est prévisible et rien ne s'oppose à ce que l'appareil fonctionnant en continu, il soit possible de réaliser sans difficulté trois analyses en 24 h.

CONCLUSION

C'est à partir de l'étude expérimentale d'un problème à ce jour non résolu, la séparation des acides lactique et succinique que nous avons été amenés à rechercher une loi générale régissant le temps d'éluion d'un acide selon la teneur en butanol du solvant.

Certes, notre relation ne permet pas de résoudre tous les problèmes que pose la chromatographie de partage, mais elle fournit un cadre général qui en facilite l'approche, elle évite les longues et fastidieuses expériences préliminaires qui ont permis l'établissement des divers gradients proposés, mais surtout elle permet de comprendre et de résoudre beaucoup de problèmes de séparation qui paraissaient jusqu'alors insolubles.

Il est intéressant de noter que le type de raisonnement qui nous a conduit à établir une relation dans le cas de la chromatographie de partage sur Célite, est assez général et peut être appliqué par exemple à l'étude de l'influence du pH sur l'éluion des acides aminés dans une chromatographie d'échange d'ions.

RÉSUMÉ

A partir de la détermination expérimentale de deux coefficients spécifiques pour chaque acide, une relation générale est proposée, qui rend compte de l'influence des variations du solvant sur la séparation des acides. Cette relation permet l'étude et la mise au point d'un gradient d'éluion adapté aux problèmes concrets de séparation et de dosage de tel ou tel groupe d'acides.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. BOVÉ ET R. RAVEUX, *Bull. Soc. Chim. France*, (1957) 376.
- 2 J. CARLES ET A. ALQUIER-BOUFFARD, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 47 (1965) 1519.
- 3 J. CARLES, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 50 (1968) 1341.
- 4 J. CARLES, *J. Chromatogr.*, 35 (1968) 158.
- 5 A. J. P. MARTIN, *Ann. Rev. Biochem.*, 19 (1950) 517.
- 6 E. LEDERER ET M. LEDERER, *Chromatography*, 2me éd., Elsevier, Amsterdam, 1957, p. 105.