

Cours de Chromatographie

Enseignant : Y. FRANCOIS

Yannis FRANCOIS

Laboratoire de Spectrométrie de Masse des
Interactions et des Systèmes
Tour de Chimie, 12^{ème} étage

e-mail: yfrancois@unistra.fr

Plan de cours

1. Introduction générale sur la chromatographie
2. Aspect théorique de la chromatographie
3. Chromatographie gazeuse : principe et appareillage
4. Chromatographie liquide : principe et appareillage

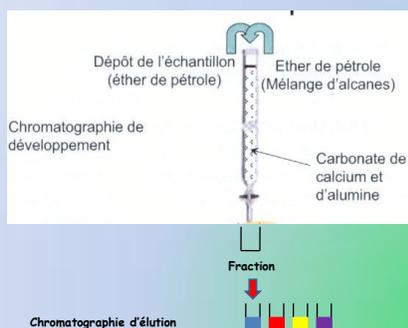
Introduction chromatographie

Historique

- 1900 : Invention de la chromatographie (Michel TSWETT)
- 1938 : Première chromatographie sur couches minces (Ismailov et Schraiber)
- 1952 : Naissance officielle de la chromatographie phase gaz (Martin et Synge, Nobel 1952)
- 1955 – 1960 : Age d'or de la chromatographie en phase gazeuse
- Fin des années 60 : Naissance de la chromatographie en phase liquide à haute performance
- De nos jours : Amélioration instrumentale (informatisation) et innovation dans le domaine de la miniaturisation (nanotechnologie)

Introduction chromatographie

Principe



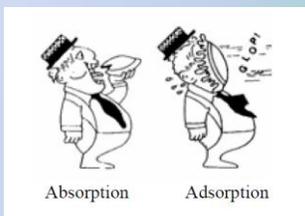
Introduction chromatographie

Principe

- Séparation de mélange complexe
- Basée sur des équilibres particuliers entre les composés et deux phases :
 - ✓ Phase stationnaire
 - ✓ Phase mobile
- Différentes interactions peuvent entrer en jeu :
 - ✓ Adsorption
 - ✓ Partage
 - ✓ Paires d'ions
 - ✓ Échange d'ions
 - ✓ Exclusion stérique

L'adsorption

▪ C'est l'accumulation de substances à la surface d'une des phases



Absorption

Adsorption

Le partage

Principe

- 2 corps différents ne se partagent pas de façon identique entre 2 phases
- Coefficient de partage

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

- ✓ C_s : concentration dans la phase stationnaire
- ✓ C_M : concentration dans la phase mobile

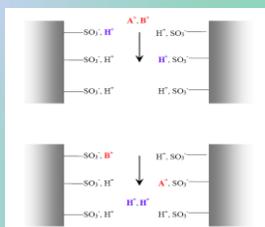
Echange d'ions

Principe

- La phase stationnaire a des propriétés d'échanges d'ions.
- Présence de groupements acide ou basique permettant l'échange de certains de leurs ions avec ceux, de même signe, de l'échantillon

✓ Phase mobile : Solution de sels ou d'acide ou de base

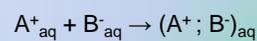
✓ Les coefficients de partage sont appelés coefficient d'échanges d'ions



Formation de paires d'ions

Principe

- On appelle paire d'ions, l'association de 2 ions de charges opposées



- La paire d'ions perd son caractère ionique

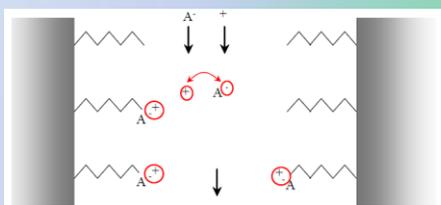
- ✓ Elle devient moins polaire,
- ✓ Elle devient hydrophobe
- ✓ Elle passe en phase organique peu polaire

- Cela permet de séparer les ions

Formation de paires d'ions

Principe

- On ajoute un contre ion (+) à la phase mobile
- Formation de paires d'ions apolaires qui interagissent avec la phase stationnaire
- Les composés sont retenus



Introduction chromatographie

Principe

- Affinité forte du produit pour la phase stationnaire :
 - ✓ Le produit progresse lentement dans la phase stationnaire
 - ✓ Le temps de rétention du produit est long
- Affinité forte du produit pour la phase mobile :
 - ✓ Le produit progresse rapidement dans la phase stationnaire
 - ✓ Le temps de rétention du produit est plus court
- Le temps de rétention du composé permet son identification

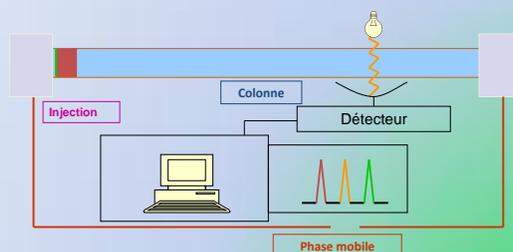
Introduction chromatographie

Principe

- Amélioration technique permanente de la chromatographie :
- Miniaturisation et automatisation des systèmes d'injections
 - ✓ Injection de petit volume
 - ✓ Répétabilité des injections
- Grande variété de phase stationnaire
 - ✓ Variation des types d'interactions
- Augmentation de la sensibilité des détecteurs
 - ✓ Étude de traces

Introduction chromatographie

Principe



Introduction chromatographie

Domaines d'applications

- De nos jours, la chromatographie est la technique de séparation la plus largement utilisée
- Techniques très répandues dans le monde industriel
- Très grand domaine d'applicabilités

Introduction chromatographie

Domaines d'applications

- Industrie chimique : production, contrôle...
- Industrie alimentaire : corps gras, vins et spiritueux, bière, arôme...
- Industrie cosmétique et parfums
- Industrie pharmaceutique
- Energie : raffinerie de pétrole, gaz naturel, biomasse...
- Contrôle pollution : eaux, sols, atmosphère
- Exploration spatiale
- Police scientifique
- Recherche scientifique

Introduction chromatographie

Les questions que vous aurez à vous poser ?

- Quel type d'échantillon ? Solide, liquide, gazeux
- Que veut on doser ? Composé majeur, mineur ou des traces
- Analyse partielle ou complète de l'échantillon ?
- Récupération de l'échantillon ?
- Précision de l'analyse ? Qualitatif ou quantitatif
- Durée de l'analyse ?
- Quel sera le coût de l'analyse ?
- Poids de l'analyse sur l'environnement ?

Plan de cours

1. Introduction générale sur la chromatographie
2. Aspect théorique de la chromatographie
3. Chromatographie gazeuse : principe et appareillage
4. Chromatographie liquide : principe et appareillage

Aspect théorique

Grandeurs physiques : Facteur de rétention k'

$$k = \frac{m_S}{m_M} = K \frac{V_S}{V_M}$$



$$k' = K \cdot \frac{V_s}{V_M} = \frac{C_s}{C_M} \cdot \frac{V_s}{V_M} = \frac{n_s}{n_M}$$

- ✓ Indépendant du débit
- ✓ Indépendant de la longueur de la colonne
- ✓ Définit le comportement des colonnes

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



$$k' = \frac{t_R}{t_M} - 1$$

Aspect théorique

Règle générale : Facteur de rétention k'

- > $k' = 0 \rightarrow t_R = t_M$ ou $V_R = V_M$
 - Composé non retenu par la phase stationnaire
- > k' faible
 - Composé peu retenu par la phase stationnaire
 - t_R rapide
- > k' très grand
 - Composé très retenu par la phase stationnaire
 - t_R très grand
- > k' trop grand
 - Composé trop retenu par la phase stationnaire
 - Phénomène de diffusion, le pic s'élargit

Aspect théorique

Règle générale : Facteur de rétention k'

- > Ordre de grandeur de k' : Compris entre 1 et 10
- > Le meilleur compromis :
 - Analyse courte
 - Bonne séparation

$$2 < k' < 6$$

Aspect théorique

Grandeurs physiques : la théorie des plateaux

- > La théorie des plateaux est sans doute la meilleure théorie permettant d'expliquer les phénomènes de séparation chromatographique.
 - > Modélisation des équilibres Soluté/Phase stationnaire/Phase mobile sous la forme de plateaux.
 - > Limitations :
 - ✓ Absence de considération des phénomènes de diffusion
 - ✓ Impossibilité d'introduire tout l'échantillon dans un volume infiniment petit
 - ✓ Absence de considération cinétique (vitesse d'échanges entre les deux phases)
- Théorie cinétique (Vu plus tard dans le cours)

Aspect théorique

Grandeurs physiques : Efficacité

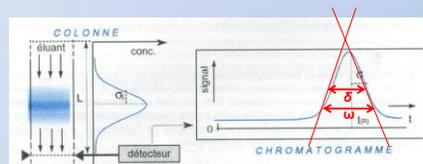
- > Paramètre N : Nombre de plateaux théoriques
- > Paramètre H : Hauteur des plateaux théoriques

$$H = L/N$$

- > N : paramètre relatif, dépend du soluté et des conditions opératoires

Aspect théorique

Grandeurs physiques : Efficacité théorique



Dispersion d'un soluté dans la colonne et traduction sur le chromatogramme

$$N = \frac{t_R^2}{\sigma^2}$$

$$N = 5,54 \frac{t_R^2}{\delta^2}$$

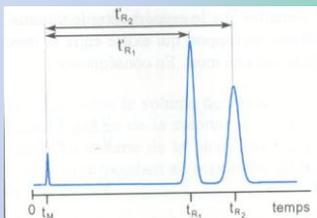
ou

$$N = 16 \frac{t_R^2}{\omega^2}$$

Aspect théorique

Grandeurs physiques : Sélectivité α

- La mesure de la sélectivité d'une séparation entre deux composés est réalisée à l'aide du facteur de sélectivité α
- Le facteur de sélectivité α décrit la position, l'un par rapport à l'autre, de deux pics adjacents



Aspect théorique

Grandeurs physiques : Sélectivité α

- Le facteur de sélectivité α peut être exprimé à l'aide des paramètres de rétention :

- Avec les temps de rétention :

$$\alpha = \frac{t'_{R2} - t_0}{t'_{R1} - t_0}$$

- Avec les volumes :

$$\alpha = (V_{R2} - V_M) / (V_{R1} - V_M)$$

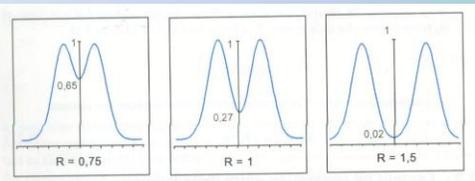
- ✓ $V_{R2} = V_M + K_2 V_S$
- ✓ $V_{R1} = V_M + K_1 V_S$

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1} \quad \text{Or } K_1 = k'_1 \cdot V_M / V_S \quad \rightarrow \quad \alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$$

Aspect théorique

Grandeurs physiques : Résolution R ou R_s

- Le facteur de résolution R permet de traduire numériquement la qualité de la séparation entre deux pics.

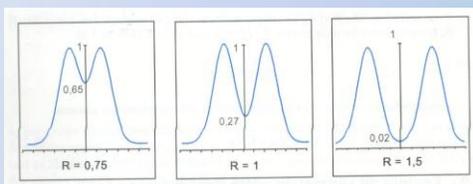


- La résolution

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

Aspect théorique

Exemple : Résolution R ou R_s



- Pour une bonne séparation :

$$R_s > 1,5$$

Aspect théorique

Grandeurs physiques : Relation entre N et R_s

- Pour deux pics homologues : $\frac{\omega_2 + \omega_1}{2} = \omega_1$

Or $\omega_1 = \frac{4 \cdot t_{R1}}{\sqrt{N}} = \frac{4 \cdot t_0 \cdot (1+k'_1)}{\sqrt{N}}$

$$R_s = \frac{k'_2 \cdot (1+k'_2) - k'_1 \cdot (1+k'_1)}{4 \cdot k'_1 \cdot (1+k'_1)} \cdot \sqrt{N}$$

$$R_s = \frac{(k'_2 - k'_1)}{1+k'_1} \cdot \frac{\sqrt{N}}{4}$$

Aspect théorique

Grandeurs physiques : Relation entre R_s et α

$$R_s = \frac{(k'_2 - k'_1) \sqrt{N}}{1+k'_1} = \frac{k'_2 - k'_1}{k'_1} \cdot \frac{k'_1 \sqrt{N}}{1+k'_1} = \frac{\alpha - 1}{1+k'_1} \cdot \frac{k'_1 \sqrt{N}}{1+k'_1}$$

Or $\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} (\alpha - 1) \frac{k'_1}{1+k'_1}$$

Approximation : k' = moyenne de k'_1 et k'_2 si les pics sont similaires ou presque

Aspect théorique

Question :

Que faire quand les pics sont mal résolus ?

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

- On augmente le facteur de rétention k'
- On augmente l'efficacité N
- On augmente la sélectivité α

Aspect théorique

Exemple appliqué à la CPG:

➤ Séparation de deux composés A et B sur une colonne de 2 m :

➤ Calculer la résolution de la colonne ?

○ Données expérimentales :

- ✓ $t_{RA} = 400 \text{ sec}$ $\omega_A = 19,5 \text{ sec}$
- ✓ $t_{RB} = 420 \text{ sec}$ $\omega_B = 20,5 \text{ sec}$
- ✓ $t_M = 50 \text{ sec}$

$$R = 2 \cdot (420 - 400) / (19,5 + 20,5) = 1$$

 **Mauvaise séparation**

Aspect théorique

Exemple appliqué à la CPG:

➤ Calculer le nombre de plateaux théoriques de la colonne ?

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N_B} (\alpha - 1) \frac{k'_B}{1 + k'_B}$$

Avec $\begin{cases} k'_B = \frac{t_{RB} - t_0}{t_0} = 7,4 \\ k'_A = \frac{t_{RA} - t_0}{t_0} = 7 \end{cases}$ et $\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = 1,06$

$\alpha - 1 = 0,06$

 **$N_B = 5727$ plateaux**

Aspect théorique

Exemple appliqué à la CPG:

➤ Quelle longueur de colonne serait nécessaire pour avoir $R = 1,5$?

$$\frac{L_2}{L_1} = \frac{N_2}{N_1} = y \quad \sqrt{N} \rightarrow \frac{R_{S2}}{R_{S1}} = \sqrt{\frac{N_2}{N_1}} = \sqrt{y}$$

➤ Application numérique :

$$R_2/R_1 = 1,5/1 = 1,5 = \sqrt{y}$$

 $y = 2,25$

 $L_2 = 2,25 \cdot 2 \text{ m} = 4,5 \text{ m}$

Aspect théorique

Grandeurs physiques : la théorie des plateaux

➤ La théorie des plateaux est sans doute la meilleure théorie permettant d'expliquer les phénomènes de séparation chromatographique.

- ✓ Pics gaussiens
- ✓ Calcul du nombre de plateaux

➤ Limitations :

- ✓ Absence de considération des phénomènes de diffusion
- ✓ Impossibilité d'introduire tout l'échantillon dans un volume infiniment petit
- ✓ Absence de considération cinétique (vitesse d'échanges entre les deux phases)
- ✓ Causes d'élargissement des pics

Aspect théorique

Grandeurs physiques : la théorie cinétique

➤ La théorie cinétique considère le pic chromatographique comme représentatif de la distribution statistique des temps de rétention des molécules d'une substance donnée sur la colonne.

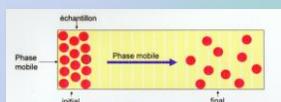
➤ La théorie cinétique considère les **phénomènes de diffusion** et de **transfert de masse**

Aspect théorique

Grandeurs physiques : la théorie cinétique

Phénomènes de diffusion :

Diffusion moléculaire longitudinale



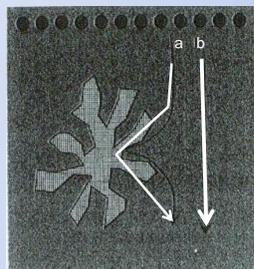
Diffusion turbulente
Remplissage



Aspect théorique

Grandeurs physiques : la théorie cinétique

Transfert de masse



✓ t_D , les molécules a et b d'une même substance sont sur la même ligne

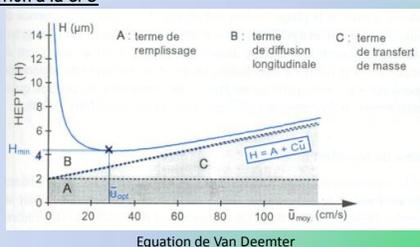
✓ t_D , a va rester dans le pore du grain de la phase stationnaire et b dans la phase mobile

✓ t_D , b ira plus vite que la molécule a

Aspect théorique

Grandeurs physiques : la théorie cinétique

Application à la CPG



$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C \cdot \bar{u}$$

\bar{u} = vitesse linéaire moyenne d'écoulement de la phase mobile dans la colonne

Aspect théorique

Grandeurs physiques : la théorie cinétique

Les solutions pour minimiser des phénomènes de diffusion :

- Améliorer l'homogénéité de la phase:
 - ✓ Absence d'hétérogénéités
 - ✓ Absence de bulle
 - ✓ Absence de vide
- Réduire le diamètre des particules d_p
- Homogénéiser le débit de la phase mobile
- Diminuer la taille des grains et des pores

Aspect théorique

Grandeurs physiques : la théorie cinétique

En résumé :

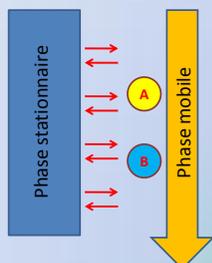
- Prendre des particules
 - ✓ De petites tailles
 - ✓ De faible porosité
- Réaliser des chromatographies
 - ✓ Rapides
 - ✓ Avec des phases stationnaires miniaturisées
- Travailler
 - ✓ A faible température
 - ✓ En réduisant les volumes morts

Plan de cours

1. Introduction générale sur la chromatographie
2. Aspect théorique de la chromatographie
3. Chromatographie gazeuse : principe et appareillage
4. Chromatographie liquide : principe et appareillage

Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

Principe



- Méthode de séparation de composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés dans décomposition
- ÉCHANGE de molécule GAZEUSE entre phase stationnaire et phase mobile
- Phase stationnaire liquide ou solide
- Phase mobile **GAZEUSE**

Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

Phase mobile ou gaz vecteur

- Nature : Gaz inerte
 - ✓ Hélium
 - ✓ Diazote
 - ✓ Argon
 - ✓ Dihydrogène...
- Propriété : inerte vis-à-vis des solutés et des phases stationnaires
- Choix du gaz vecteur
 - ✓ Détecteur utilisé
 - ✓ Coût de fonctionnement...

Il n'y a pas d'interaction entre le gaz et la phase stationnaire

Il n'y a pas d'interaction entre le gaz et les solutés

Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

La température T

La température T est un paramètre majeur en GPG

- Le volume de rétention V_R varie selon la loi :

$$\text{Log}(V_R) = (a/T) + b$$



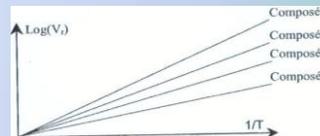
Si T augmente : le volume de rétention diminue et donc le temps de rétention diminue

Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

La température T

- Représentation de l'équation pour une série de **composés homologues**

$$\text{Log}(V_R) = (a/T) + b$$

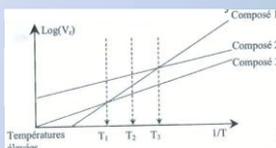


- Plus la température est forte, plus la séparation est rapide
- A très forte température, il n'y a plus de séparation

Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

La température T

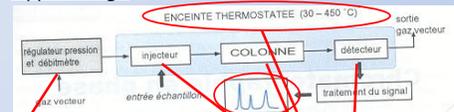
- Représentation de l'équation pour une série de **composés différents**



- A T_1 , on ne sépare pas les composés 1 et 3
- A T_3 , on ne sépare pas les composés 1 et 2
- A T_2 , on sépare des composés 1, 2 et 3

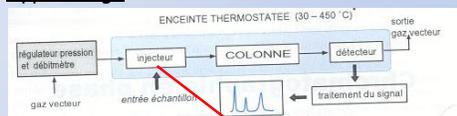
Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

Appareillage



Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

Appareillage



Systèmes d'injection

ROLE :

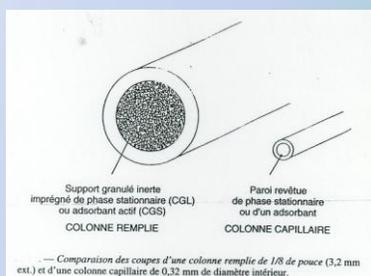
- Interface échantillon-chromatographe
- Système de vaporisation
- Organe de transfert dans la colonne

IDEAL :

- Récupération représentative de l'échantillon sans discrimination
- Permettre l'analyse quantitative
- Permettre l'analyse de traces
- Volume mort minimum, capacité suffisante
- Inertie chimique
- Répétabilité pour des injections manuelles
- Automatisation...

Systèmes d'injection

Deux principaux types de colonne en CPG



Systèmes d'injection

Choix du système

Colonnes remplies

- Injecteur classique à septum
- Injection directe
- Injecteur automatique
- Vanne à gaz
- Injecteur à solides

Systèmes d'injection

Choix du système

Colonnes capillaires

- Injection directe
- Injection avec division (split injection)
- Injection sans division (splitless injection)
- Injection dans la colonne (on column)
- Injection à température programmée
- Injection à évaporation de solvant

Systèmes d'injection

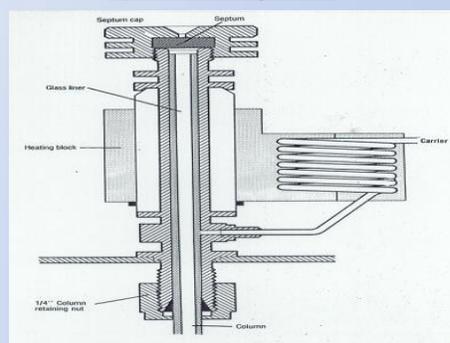


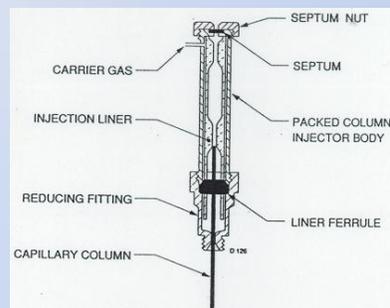
Schéma d'un système d'injection

Systèmes d'injection

Injection direct

- Système de première génération
- Utilisé pour des colonnes remplies et des colonnes capillaires
- Limitation du volume injecté
- Variation du diamètre de l'insert suivant le type de colonne
 - ✓ Grand diamètre pour colonnes remplies
 - ✓ Petit diamètre pour colonnes capillaires
- Limitation du diamètre interne des colonnes capillaires (0,53 mm)

Systèmes d'injection



Injecteur « direct »

Systèmes d'injection

Injection direct : Exemple

Cas des fortes concentrations :

- Pour une injection de 0,1 µL (minimum possible) d'un produit dont la concentration est de l'ordre de 10%, alors il y aura saturation d'une colonne capillaire



Mauvaise efficacité, mauvaise séparation

Cas des faibles concentrations :

- Volume d'échantillon limité par le volume de l'insert. Si l'on travail sur des traces et que le détecteur n'est pas sensible, alors le chromatogramme sera plat.



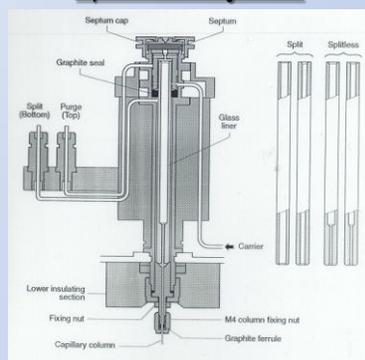
Pas de séparation

Systèmes d'injection

Injection split/splitless

- Système le plus répandu pour les séparation colonne capillaire
- Injection de volume d'échantillon compatible avec la quantité de phase stationnaire dans la colonne
- **Split** : système pour les échantillons très concentrés
 - ✓ Utilisation d'une vanne de Split pour diviser le volume total injecté
 - ✓ Réduction du volume injecté dans la colonne
- **Splitless** : système pour les échantillons très dilués
 - ✓ Utilisation de la vanne de Split pour pré concentrer
 - ✓ Pré concentration en tête de colonne

Systèmes d'injection



Injecteur Split/Splitless

Systèmes d'injection

Injection split/splitless

Fonctionnement Split :

- Injection d'un volume total d'échantillon dans le liner à l'aide d'une seringue
- L'injecteur étant chauffé, l'échantillon est instantanément vaporisé
- L'échantillon est ensuite divisé en deux parties par une vanne de split
- La plus petite partie est injectée dans la colonne
- La plus grande est évacuée par ce que l'on appelle la fuite

Rapport de division $R = \text{débit de fuite} / \text{débit de la colonne}$

Systèmes d'injection

Injection split/splitless

Exemple Split :

- Débit de l'injecteur : 52 ml/min
- Vanne de fuite : 50 ml/min
- On en déduit le débit de la colonne à 2 ml/min

R = débit de fuite/débit de la colonne

$$R = 50/2 = 25$$

Si on injecte 1 µL, alors on introduit 1/25 de µL dans la colonne

Systèmes d'injection

Injection split/splitless

Fonctionnement Splitless :

- La vanne de split est fermée
- On introduit l'échantillon (max 3µL)
- On attend quelques dizaines de secondes
 - ✓ Refocalisation dans les premiers cm de la colonne
- On ouvre la vanne de fuite pour purger la chambre d'injection

Application Splitless :

- Piège à froid
- Effet solvant

Systèmes d'injection



Systèmes d'injection

Liner ou insert

- Chemisage de la chambre d'injection pour la rendre inerte
- Premier point de contact de l'échantillon avec le système analytique
- Permet de faire évoluer la qualité de l'injection
 - ✓ Différents diamètres d'insert
 - ✓ Possibilité de les modifier chimiquement
 - ✓ Dérivation online des échantillons
- Grand nombre de liner proposé sur le marché
 - ✓ Choix du liner idéal très compliqué (compromis)
- Possibilité d'activer ou de désactiver chimiquement le liner
 - ✓ Augmentation du champs d'applications
- Entretien permanent du liner

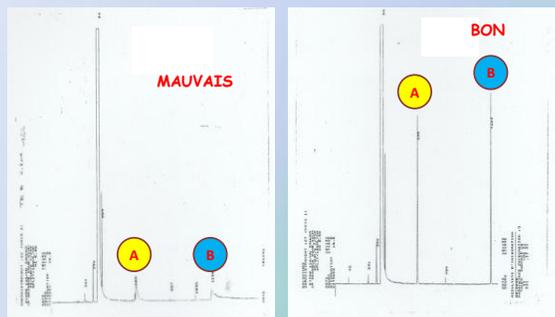
Systèmes d'injection

Direct Injection Liners	Splitless Liners	Splitless Liners (cont.)
<p>Agilent Inlet Liner with Therm-O-Ring Seal and Liner Seal</p> <p>Agilent Inlet Liner with Ferrule Seal</p> <p>Agilent Inlet Liner with Metal Seal</p> <p>Agilent Inlet Liner with Washer</p>	<p>Agilent Inlet Liner with Therm-O-Ring Seal and Liner Seal</p> <p>Agilent Inlet Liner with Ferrule Seal</p> <p>Agilent Inlet Liner with Metal Seal</p> <p>Agilent Inlet Liner with Washer</p>	<p>Agilent Inlet Liner with Therm-O-Ring Seal and Liner Seal</p> <p>Agilent Inlet Liner with Ferrule Seal</p> <p>Agilent Inlet Liner with Metal Seal</p> <p>Agilent Inlet Liner with Washer</p>
<p>CIS4 & PTV Liners</p> <p>SPME Liners</p>	<p>Agilent Inlet Liner with Therm-O-Ring Seal and Liner Seal</p> <p>Agilent Inlet Liner with Ferrule Seal</p> <p>Agilent Inlet Liner with Metal Seal</p> <p>Agilent Inlet Liner with Washer</p>	<p>Agilent Inlet Liner with Therm-O-Ring Seal and Liner Seal</p> <p>Agilent Inlet Liner with Ferrule Seal</p> <p>Agilent Inlet Liner with Metal Seal</p> <p>Agilent Inlet Liner with Washer</p>

Systèmes d'injection

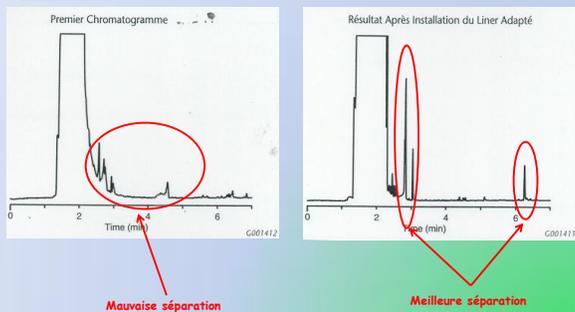
Injecteur et entrée de colonne encrassés

Injecteur et entrée de colonne nettoyés



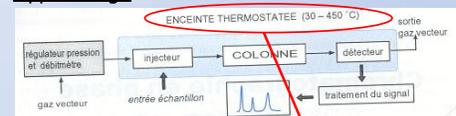
Systèmes d'injection

Choix du liner



Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

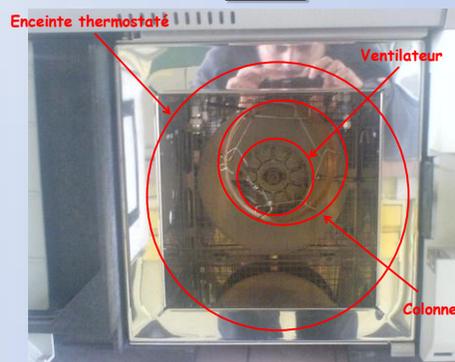
Appareillage



Le four

- Élément essentiel aux chromatographes modernes car doit posséder une excellente stabilité thermique (jusqu'à 450 C)
- Homogénéité de la température assurée par un ventilateur
- Programmeur de température
- Doit chauffer et refroidir très rapidement
- Gradient de température pour pouvoir séparer en un minimum de temps des mélanges de composés peu volatils et très volatils

Le four



La colonne

Deux principaux types de colonne en CPG

- Les colonnes remplies
 - ✓ Verre, métal
 - ✓ Courte (1 à 15 m) et épaisse (1 à 4 mm)
- Les colonnes capillaires
 - ✓ Silice fondue
 - ✓ Longue (15 à 100 m) et très fine (100 à 250 µm)

La colonne

Deux principaux types de colonne en CPG



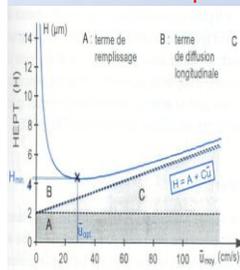
La colonne

Propriétés physiques

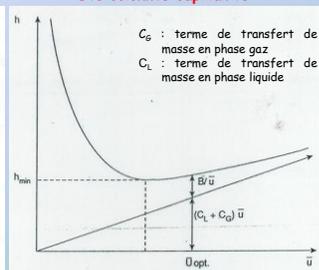
	Colonnes remplies analytiques	Colonnes capillaires remplies	Colonnes capillaires
Diamètre intérieur d_c (mm)	2 à 6	0,3 à 1	0,1 à 0,5
Longueur L_c (m)	0,3 à 6	0,25 à 10	10 à 50
Perméabilité k (cm ²)	$0,2 \cdot 10^{-6}$	$0,6 \cdot 3 \cdot 10^{-6}$	$3 \cdot 80 \cdot 10^{-6}$
Hauteur équivalente à un plateau théorique h (mm)	0,5 à 1	0,1 à 0,5	0,1 à 0,5
Rapport $\beta = \frac{\text{volume phase mobile}}{\text{volume phase stationnaire}}$	10 à 100	50 à 100	20 à 1 000
Quantités injectées	0,1 à 1 μl	1 à 10 μg	0,1 à 1 μg
Pression d'entrée (bar)	1 à 3	2 à 10	0,1 à 2

La colonne : aspect théorique

Les colonnes remplies



Les colonnes capillaires



Equation de Van Deemter

$$H = A + B/\bar{u} + C \cdot \bar{u}$$

Equation de Golay

$$H = B/\bar{u} + (C_G + C_L) \cdot \bar{u}$$

Choix de la colonne

- > Nature de l'échantillon
- > **Nature de la phase stationnaire**
- > Diamètre de la colonne
- > Longueur de la colonne
- > Épaisseur du film de la phase stationnaire

Paramètre important : Choix de la colonne

Phase stationnaire

- > Film polymérique qui recouvre ou qui est greffé sur la paroi interne de la colonne capillaire
- > Équilibres d'interactions entre solutés et phases différents suivant la nature de la phase

Paramètres de choix de la phase stationnaire

- ✓ Nature
- ✓ Polarité
- ✓ Stabilité
- ✓ Température mini et maxi d'utilisation

Phase stationnaire : Polarité

Composé non polaire

Une phase stationnaire non polaire convient pour la séparation des substances non polaires : composés uniquement de C et H

Les interactions les composés non polaires et les phases non polaires sont « dispersives » c'est à dire que les molécules entrent dans le film de phase et en sortent de façon aléatoire.

La séparation est donc basée uniquement sur la température d'ébullition.

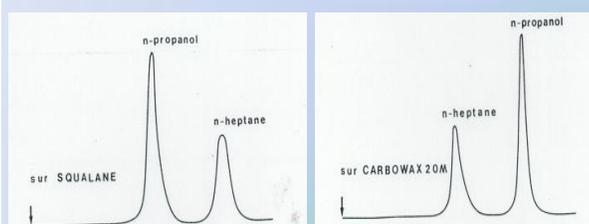
Composé polaire

Composés principalement de carbone, d'hydrogène + 1 ou plusieurs atomes de brome, chlore, fluor, azote, oxygène, phosphore, soufre.

Outre les interactions dispersives, il existe entre molécules polaires et phase polaires des interactions du type dipole-dipole et ou acide-base.

Phase stationnaire : Polarité

Exemple



— Effet de la polarité sur l'ordre de sortie des substances :
 – sur squalane, phase non polaire, le n-propanol ($P_b = 97^\circ\text{C}$) est peu soluble donc peu retenu : il sort avant le n-heptane ($P_b = 98^\circ\text{C}$) qui est très soluble donc très retenu ;
 – sur Carbowax 20M, phase polaire, c'est le n-heptane qui est mal soluble et qui sort le premier. Le n-propanol est bien soluble dans le polyéthylène glycol et sort longtemps après.

Détecteurs

ROLE :

- Appareil de mesure physico-chimique qui ne réagit qu'au passage des solutés voire d'espèces spécifiques du soluté
- Signal traité après amplification par un système informatique d'acquisition

IDEAL :

- Sensible
 - ✓ Rapport signal électrique/débit massique
 - ✓ Rapport signal électrique/concentration
- Universel
- Robuste
- Domaine de linéarité large

Détecteurs

3 types de détecteur

- Les détecteurs universels
- Les détecteurs semi-universels
- Les détecteurs spécifiques

2 types de réponse

- Proportionnelle au débit massique
- Proportionnelle à la concentration du soluté dans la phase mobile

Détecteurs

Comment choisir un détecteur ?

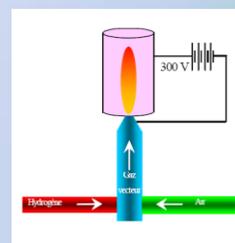
DETECTEUR	TCD Catharomètre	FID ionisation de flamme	FPD Photomètre de flamme	ECD Capture d'électrons	FTD-NP Thermo- ionique
Type	C	M	M	C	M
Linéarité	10^6	10^5	$P 10^5$ $S 10^3$	10^4	10^5
Limite de température	400 °C	400 °C	350 °C	350 °C	400 °C
Gaz vecteur	He, N ₂	He, N ₂	N ₂	N ₂	He, N ₂
Applications principales	Tous composés	Composés organiques carbonés	Composés contenant S ou P	Composés ayant une forte affinité pour e ⁻	Composés contenant N ou P

C : détecteur dont la réponse est proportionnelle à la concentration
M : détecteur dont la réponse est proportionnelle au débit massique

Détecteur à ionisation de flamme (FID)

Principe :

Mesure le courant ionique généré dans une flamme hydrogène au passage de l'échantillon



FID

Réponse

- Non proportionnelle au nombre d'atomes de carbone : à masse égale injectée, un C6 donne approx. La même réponse qu'un C1
- Le chlorure de méthylène donne une réponse moins grande que le méthane (le chlore refroidi localement la flamme)

Sensibilité

- Très élevée, s'exprime en coulomb/gramme

Limite de détection

- Peut atteindre 2 à 3 pg/sec

FID

Avantages et inconvénients:

- Décrit la première fois en 1958
- Le plus couramment utilisé
- Grande sensibilité
- Bonne linéarité
- Faible volume mort
- Presque universel
- Destructive

FID

— Composés donnant peu ou pas de réponse avec un détecteur à ionisation de flamme.

He	H ₂ S	CO
Ar	SO ₂	CO ₂
Kr	NO	COS
Ne	N ₂ O	CS ₂
Xe	NO ₂	CH ₂ O
O ₂	NH ₃	CHOOH
N ₂	H ₂ O	SiCl ₄

Spectrométrie de masse



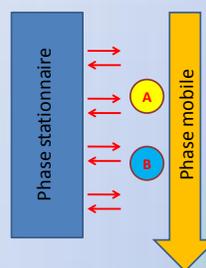
Détermination de données structurales sur les composés

Plan de cours

1. Introduction générale sur la chromatographie
2. Aspect théorique de la chromatographie
3. Chromatographie gazeuse : principe et appareillage
4. Chromatographie liquide : principe et appareillage

Chromatographie en Phase Liquide (HPLC)

Principe



- Méthode de séparation de composés non-volatiles
- ÉCHANGE de molécule LIQUIDE entre phase stationnaire et phase mobile
- Phase stationnaire solide
- Phase mobile LIQUIDE

Chromatographie en Phase Liquide (HPLC)

Phase mobile

- Solvant aqueux ou organiques
 - ✓ Eau
 - ✓ Acétonitrile
 - ✓ Méthanol
 - ✓ Ethanol...
- Propriété : polarité inverse à la phase stationnaire

Il y a interaction entre la phase mobile et la phase stationnaire

Il y a interaction entre la phase mobile et les solutés

Chromatographie en Phase Liquide (HPLC)

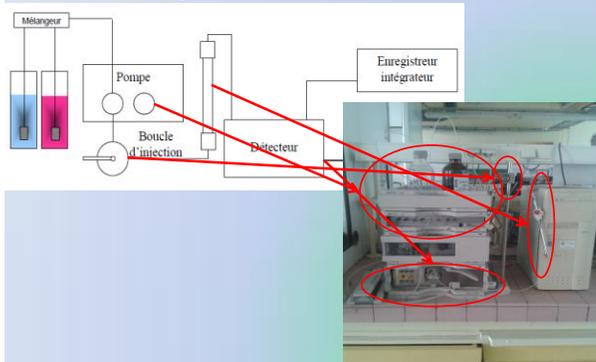
Phase mobile

phase polaire normale	solvants classés par polarité croissante	phase à polarité inversée
FAIBLE	hexane	FORT
pouvoir d'éluion	toluène	pouvoir d'éluion
	trichlorométhane	
	dichlorométhane	
	éther	
	acétate d'éthyle	
	acétonitrile	
	méthanol	
	eau	FAIBLE

tableau 1 : pouvoir d'éluion de la phase mobile en HPLC

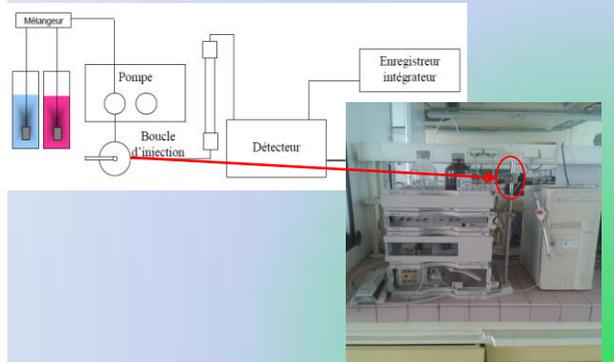
Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

Appareillage



Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

Appareillage



Systèmes d'injection

ROLE :

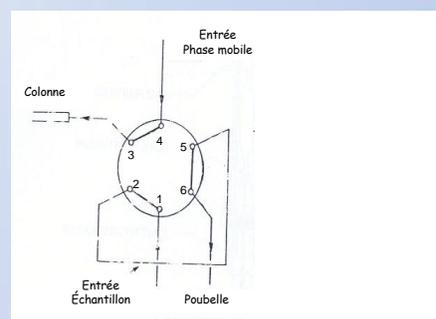
- > Interface échantillon-chromatographe
- > Organe de transfert dans la colonne

IDEAL :

- > Récupération représentative de l'échantillon sans discrimination
- > Permettre l'analyse quantitative
- > Permettre l'analyse de traces
- > Volume mort minimum, capacité suffisante
- > Répétabilité pour des injections manuelles
- > Automatisation...

Systèmes d'injection

Boucle d'injection (injection manuelle)

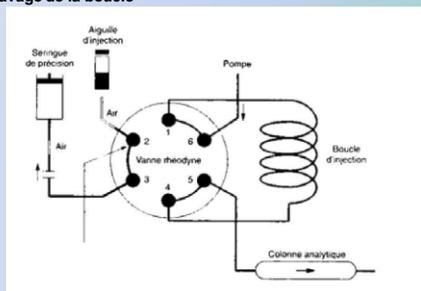


Systèmes d'injection

Boucle d'injection (injection automatique)

Etape 1 :

- > Lavage de la boucle

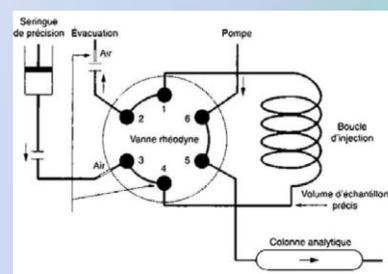


Systèmes d'injection

Boucle d'injection (injection automatique)

Etape 2 :

- > Remplissage de la boucle

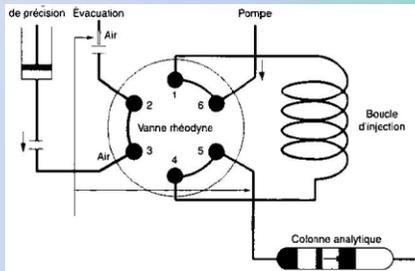


Systèmes d'injection

Boucle d'injection (injection automatique)

Etape 3 :

> Injection dans la colonne



La colonne

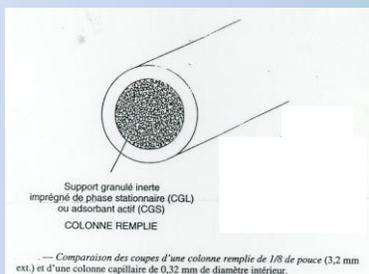
Deux principaux types de colonne en CPG

> Les colonnes remplies

- ✓ Inox ou verre
- ✓ Longueur : 15 à 30 cm
- ✓ Diamètre : 4 à 40 mm

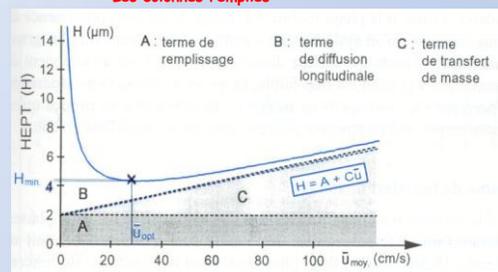
La colonne

Un type de colonne en HPLC



La colonne : aspect théorique

Les colonnes remplies



Equation de Van Deemter

$$H = A + B/\bar{u} + C \cdot \bar{u}$$

Choix de la colonne

> Nature de l'échantillon

> Nature de la phase stationnaire

> Diamètre de la colonne

> Longueur de la colonne

Paramètre important : Choix de la colonne

Phase stationnaire

> Équilibres d'interactions entre solutés et phases différents suivant la nature de la phase

Paramètres de choix de la phase stationnaire

- ✓ Nature
- ✓ Polarité
- ✓ Stabilité
- ✓ Température mini et maxi d'utilisation

Phase stationnaire : Polarité

Colonnes polaires dites « phase normale »

- Les colonnes en phase normale sont des colonnes dont la phase stationnaire est polaire et acide.
- La phase normale la plus utilisée est à base de gel de silice : à sa surface se trouvent des groupes silanols (-OH) et des groupes siloxanes (-O-). Ces groupes permettent à la silice de retenir les composés à analyser par des liaisons hydrogènes.
- Cette phase sert ainsi principalement à séparer des composés polaires.

Colonnes apolaires dites « phase inverse »

- La base d'une phase inverse est une phase normale sur laquelle des chaînes alkyles (ou autres selon la polarité recherchée) ont été greffées au niveau des groupes silanols. En général, la phase stationnaire est majoritairement composée de petites particules de silice sur lesquels on a greffé des fonctions chimiques, le plus souvent de chaînes alkyles à 8 ou 18 atomes de carbones.
- Cette phase est dite "inverse" car de polaire et hydrophile (sans les "greffes"), la phase devient apolaire et hydrophobe

Détecteurs

ROLE :

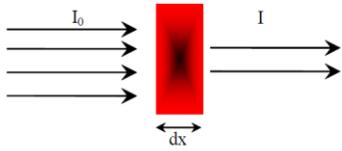
- Appareil de mesure physico-chimique qui ne réagit qu'au passage des solutés voire d'espèces spécifiques du soluté
- Signal traité après amplification par un système informatique d'acquisition

IDEAL :

- Sensible
 - ✓ Rapport signal électrique/débit massique
 - ✓ Rapport signal électrique/concentration
- Universel
- Robuste
- Domaine de linéarité large

Détecteur UV/Vis

Loi de Beer Lambert : Détection par absorbance



dI est proportionnel à I
 dI est proportionnel à c
 dI est proportionnel à dx

$$dI = -K \cdot I \cdot c \cdot dx$$

$K =$ coefficient de proportionnalité

Détecteur UV/Vis

$$dI = -K \cdot I \cdot c \cdot dx$$

$$\frac{dI}{I} = -K \cdot c \cdot dx$$

$\epsilon =$ coefficient d'extinction molaire
(c est exprimé en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

$$\ln\left(\frac{I_0}{I}\right) = K \cdot c \cdot L$$

ou

$$\log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon \cdot c \cdot L$$

$\epsilon =$ coefficient d'extinction spécifique
(c est exprimé en $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

$$A = \epsilon \cdot c \cdot L$$

Détection par Fluorescence

Détection par fluorescence

- Si la molécule absorbe, elle peut également re-émettre de la lumière si elle est suffisamment rigide (présence de noyaux aromatiques accolés).
- On a une très grande sélectivité car il y a deux longueurs d'ondes : λ_{exc} et λ_{em}

Détection par Fluorescence

Avantages et inconvénients:

- Très grande sensibilité
- Bonne linéarité
- Faible volume mort
- Ne détecte pas les composés qui ne fluorescent pas
- Etape de dérivation

Spectrométrie de masse



Détermination de données structurales sur les composés

Détecteur MS

Avantages et inconvénients:

- Très grande sensibilité
- Bonne linéarité
- Faible volume mort
- Pas Universel
- Cher
- Destructif pour l'Electrospray

Détecteur à conductimétrie

Mesure la résistance (R) à l'aide d'un ohmmètre.
On obtient la mesure de la conductance (G), la résistivité et la conductivité (σ) qui ne dépend que de la charge, de la mobilité et de la concentration de l'ion considéré

$$\sigma = G \cdot L / S$$

L = distance entre les électrodes
S = surface des électrodes

Détecteur à conductimétrie

Avantages et inconvénients:

- Le plus couramment utilisé pour la chromatographie d'échange d'ions
- Bonne sensibilité
- Bonne linéarité
- Faible volume mort
- NON SELECTIF