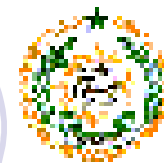




Université Moulay-Ismaïl
Faculté des Sciences-Meknès
Département de Chimie



Pr. M.N.BENNANI

Laboratoire de Chimie-Biologie Appliquées
à l'Environnement

Equipe de Matériaux et Catalyse Appliqués

Techniques D'Analyses Chromatographiques

Journées de Formation: Techniques d'Analyses Physico-Chimiques

Plan

I: Généralités

- définitions, vocabulaire, grandeurs chromatographiques, classification des techniques chromatographiques...

II: Chromatographie en Phase Gazeuse

« CPG »

III: Chromatographie Liquide Haute Performance « HPLC »

IV: Analyses quantitatives

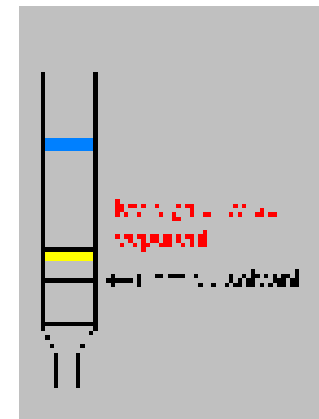
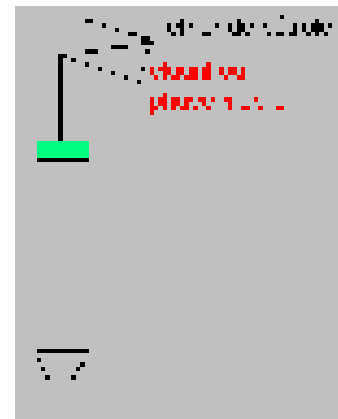
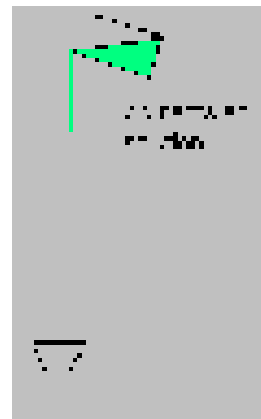
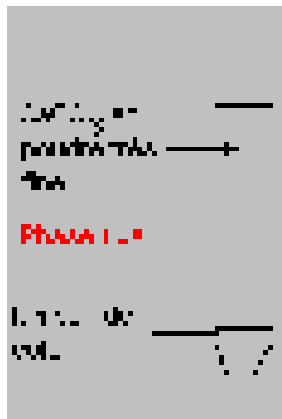
I: Aspects généraux

I-1- Définition: La chromatographie est une méthode destinée à séparer les constituants d'un mélange (ou **soluté**) en les distribuant entre deux phases: une **phase stationnaire** (PS) et **une phase mobile** (PM) non miscibles.

Le système chromatographique est l'ensemble (PS, PM, solutés)

I -2- Historique

- **Découverte** par M. Tswett vers **1906**, lors de la séparation de pigments d'épinard sur une colonne en CaCO_3

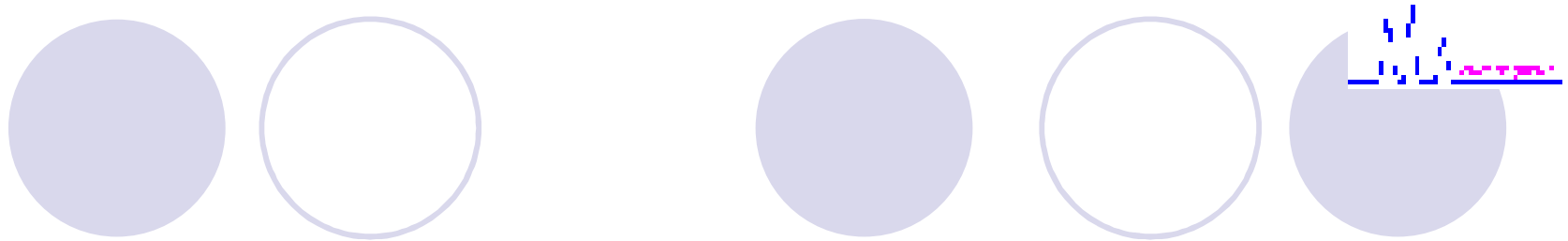


Observation de couleur → séparation

Le mot chromatographie vient du grec:

Khroma= couleur;

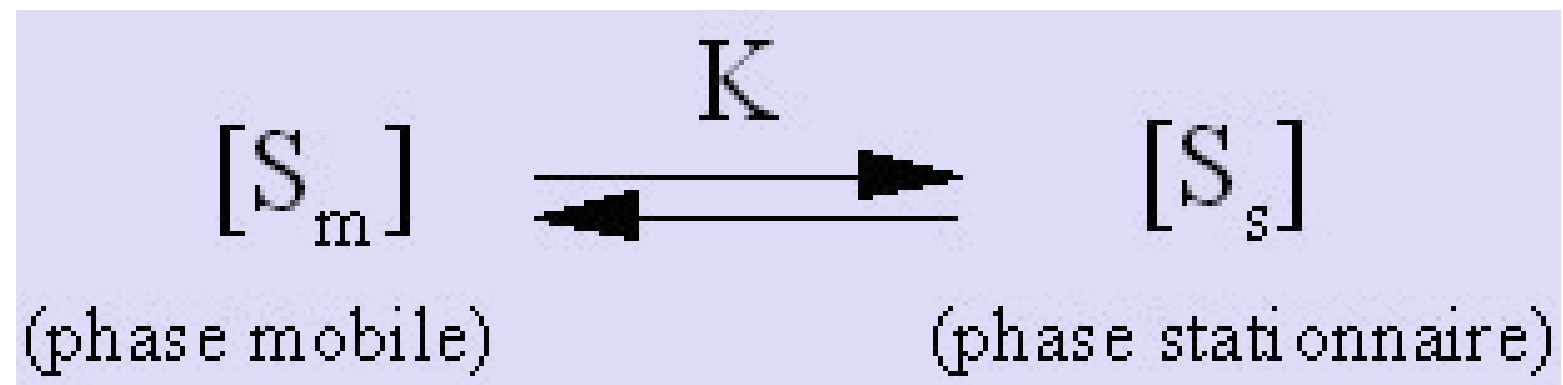
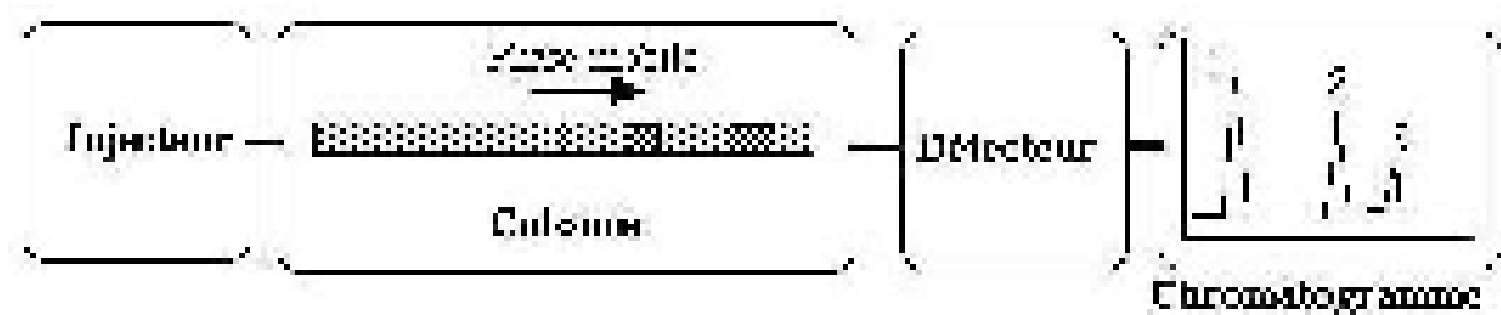
Graphein= écrire



1952 : Première chromatographie gazeuse
(MARTIN et JAMES)

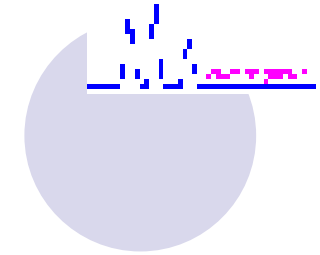
1967 : Début de la chromatographie liquide haute
performance (HUBER et HUZSMAN)

I-3- Principe générale:

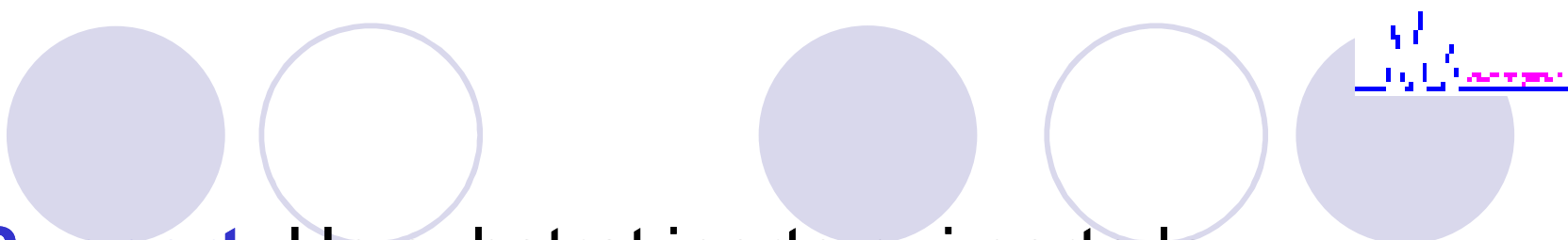



$$K = [S_s] / [S_m]$$

I-4- Terminologie générale de la chromatographie



- **Soluté**: toute substance, constituant d'un mélange, séparée par chromatographie.
- **Phase mobile PM**: le vecteur, liquide ou gazeux, qui déplace le soluté.
- **Phase stationnaire PS**: le produit qui, par ses affinités avec les solutés, va permettre leur séparation quand la phase mobile les déplace.

- 
- A decorative graphic at the top of the slide consists of five circles arranged horizontally. The first, third, and fifth circles are solid light purple. The second and fourth circles are white with a light purple outline. To the right of the fourth circle is a stylized plant with green leaves and a pink flower.
- **Support:** Un substrat inerte qui porte la phase stationnaire.
 - **Colonne chromatographique:** tube de diamètre et longueur variable, en verre, métal ou autre substance, à l'intérieur duquel s'opèrent les séparations chromatographiques.

The header features five circles in a row. The first, third, and fifth circles are solid light purple. The second and fourth circles are white with a light purple outline. To the right of the fifth circle is a small graphic of a chromatogram with a blue baseline and several peaks of varying heights, some colored in purple and pink.

* **Valeurs de rétention:** toutes données qui permettent de chiffrer l'action spécifique de la **PS** sur le soluté, au cours de l'analyse (temps de rétention, volume de rétention...).

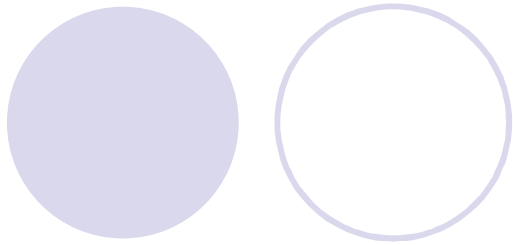
● **Chromatogramme:** l'ensemble des réponses successives du détecteur, au cours de l'élution des solutés hors de la colonne.



I-5– Classement des techniques chromatographiques

I-5–1– Classement selon la nature des phases et processus mis en jeu

Phase Mobile	Phase Stationnaire	Méthode Chromatographique
Gaz	Solide	C.G.S
Gaz	Liquide	C.G.L
Liquide	Solide	C.L.S
Liquide	Liquide	C.L.L



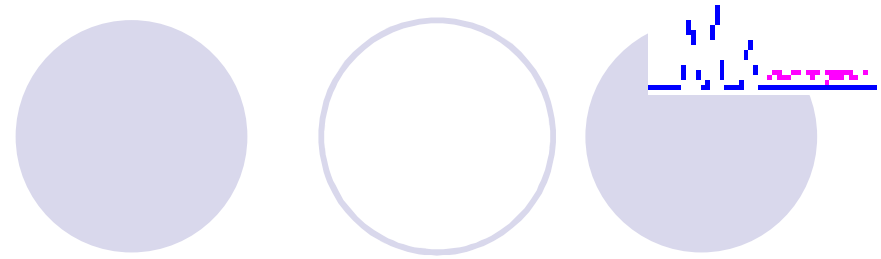
Mécanismes

Adsorption

Partition

Echanges d'ions

Perméations



Méthodes Chromatographiques

C.G.S et C.L.S

C.G.L et C.L.L

C.L.S

C.L.S

I-5– 2 – Classement selon les techniques opératoires

- Chromatographie sur couche mince ou sur papier;
- Chromatographie sur colonne;
- Chromatographie par perméation de gel ou d'exclusion (polymères);

I-6-Théorie de la Chromatographie

I- 6- I-Forme des pics en chromatographie

On assimile les pics en chromatographie à une courbe de Gauss d'équation:

$$y = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{x^2}{2}}$$

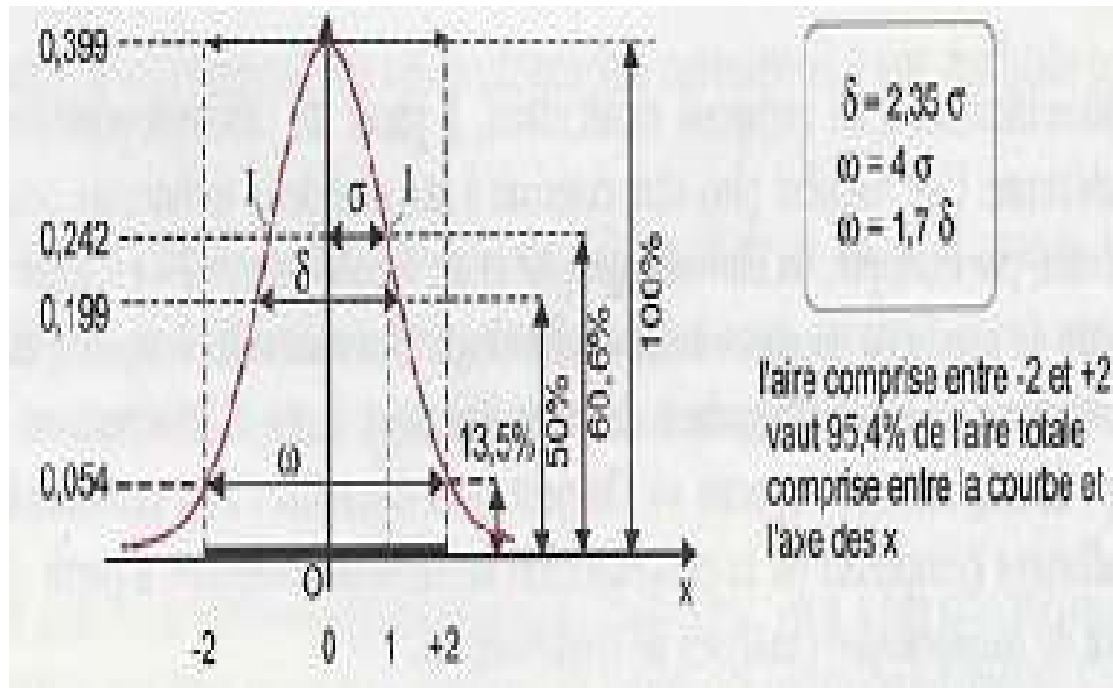
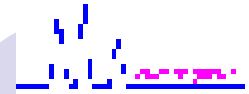


Figure 1: Profil des pics chromatographiques

Ces pics seront caractérisés par:



1- **Écart-type σ** : correspond à la moitié de la largeur du pic mesuré à **60,6%** de sa hauteur.

2- **Variance = σ^2**

3- **Largeur à mi-hauteur δ** : mesurée à **$h/2$** .

$$\delta = 2,35 \sigma.$$

4- **La "base" du pic w** .

Cette base est extrapolée par des tangentes aux deux branches et passant par les points d'inflexion de la courbe de Gauss.

$$\text{on a } w = 4 \sigma = 1,7 \delta .$$

I -6 - 2- Comment améliorer une séparation en chromatographie?

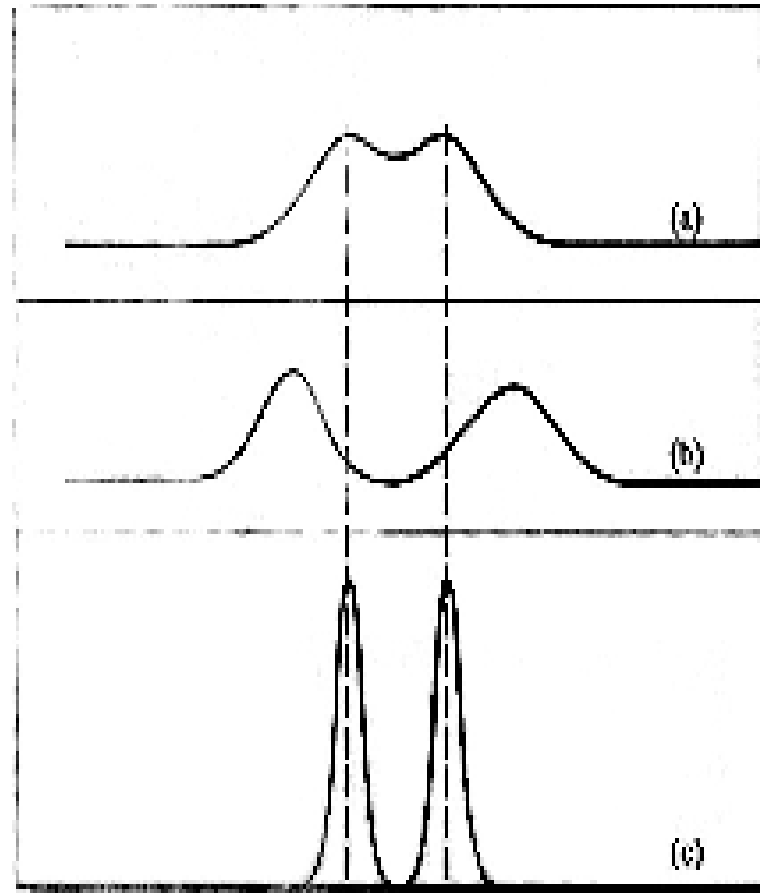
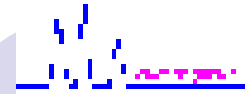


Figure 2: Séparations entre 2 pics en chromatographie



Deux possibilités:

1- augmenter la différence de temps de rétention
entre les 2 pics (largeur de pic constante)

→ chromatogramme (b)

2- diminuer la largeur des pics (temps de rétention
constant)→ chromatogramme (c)

En pratique, on peut jouer à la fois sur ces 2
paramètres pour améliorer une séparation.

Donc, deux paramètres s'avèrent primordiaux en
chromatographie, la rétention et la forme du pic.

I - 6- 3: Paramètres caractérisant la rétention

I-6-3-1- temps de rétention t_r : temps écoulé entre le début de l'injection et la sortie du produit.

t_r dépend du produit S et des conditions expérimentales (colonne, température, débit de phase mobile etc.)

I-6-3-2- volume de rétention V_r : correspond au volume de phase mobile nécessaire pour éluer un produit **S**.



Si le débit D de la phase mobile est constant:

$$V_r = t_r * D.$$


I-6-3-3- temps mort t_m : temps que met la phase mobile pour traverser la colonne

On a :

$$u = L / t_m$$

u = vitesse linéaire de la PM, L = longueur de colonne

En CPG, t_m = temps de l'air ou du méthane.

The header features five circles in a row. The first, third, and fifth circles are solid light purple. The second and fourth circles are white with a light purple outline. To the right of the circles is a small chromatogram showing a baseline with several peaks of varying heights, colored in blue and purple.

I-6-3-4- volume mort V_m : Volume occupé par la phase mobile dans la colonne: **$V_m = t_m * D$**

V_m ne dépend que de la géométrie et du remplissage de la colonne (volume interstitiel accessible)

I-6-3-5- volume et temps de rétention réduits:

Volume de rétention réduit: **$V'_r = V_r - V_m$**

De la même façon, on définit un temps de rétention réduit **t'_r** :

$$t'_r = t_r - t_m$$

I-6-3-6- Facteur de rétention (ou de capacité)

Le facteur de rétention k' pour un produit donné est défini comme suit:

$$k' = \frac{V_r - V_m}{V_m} = \frac{V_r^d}{V_m}$$

ou également

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m} = \frac{t_r^d}{t_m}$$

Ce qui donne :

$$V_r = V_m(1 + k') \quad \text{et} \quad t_r = t_m(1 + k')$$

k' est accessible à partir du chromatogramme.

I-6-3-7: Facteur de séparation ou sélectivité

Soit l'analyse d'un mélange de deux composés A et B qui donne le chromatogramme suivant:

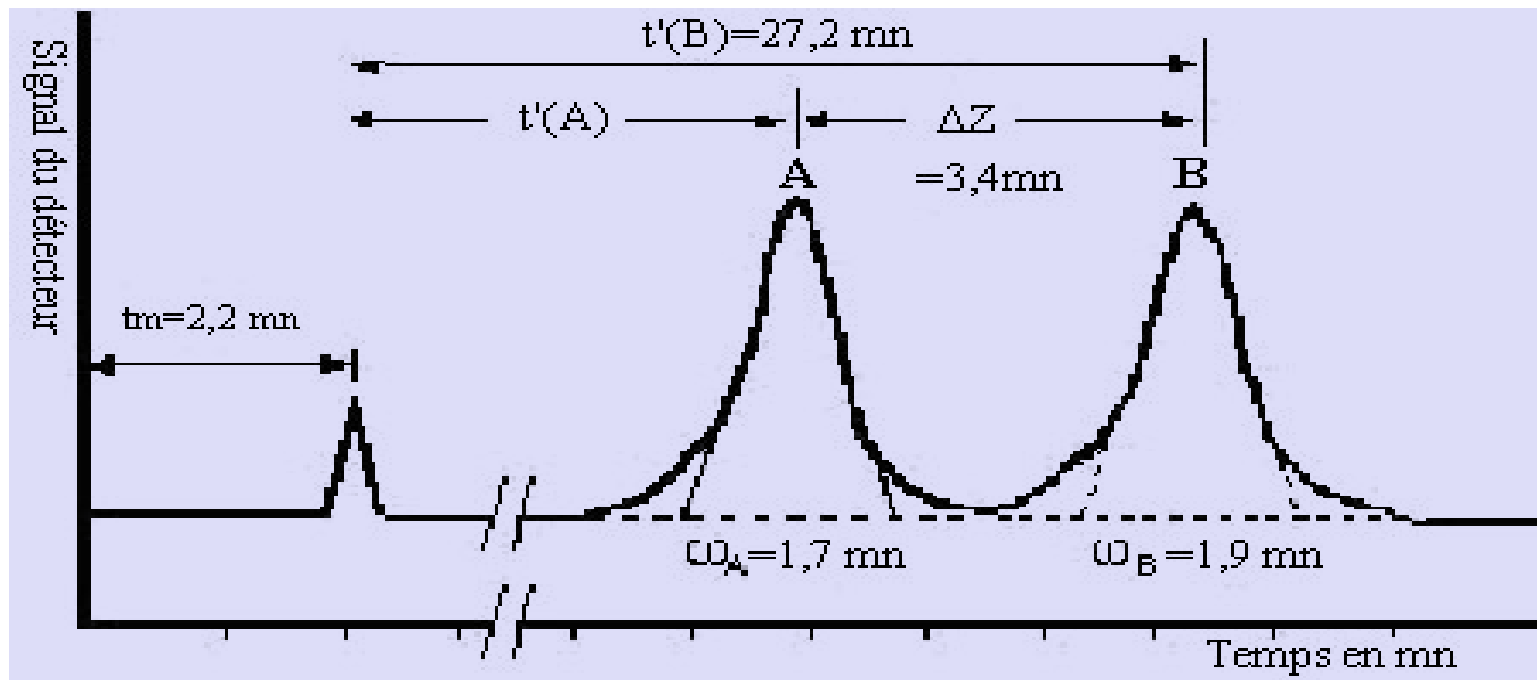


Figure 5. Chromatogramme d'un mélange de 2 produits A et B sur une colonne CPG remplie de 3 m



Le facteur de séparation (ou sélectivité) est:

$$\alpha = \frac{t'_{r(B)}}{t'_{r(A)}}$$

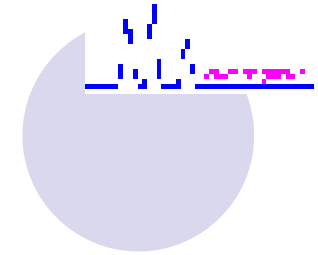
$$\alpha = \frac{k'_{(B)}}{k'_{(A)}}$$

$$t'_{r(B)} > t'_{r(A)} \rightarrow \alpha > 1 .$$

Ce facteur rend compte de la "proximité" des pics sans tenir compte de leur forme.

I-6-4- Paramètres caractérisant la forme des pics

I-6-4-1: Facteur de résolution.



Par convention le facteur de résolution **R** des 2 pics **A** et **B** de la figure 5, s'écrit :

$$R = 2 \left(\frac{t'_{rB} - t'_{rA}}{\omega_B + \omega_A} \right) = 2 \left(\frac{t_{rB} - t_{rA}}{\omega_B + \omega_A} \right) = 2 \left(\frac{\Delta Z}{\omega_B + \omega_A} \right)$$

Si on fait apparaître la largeur à mi-hauteur δ , on a

$$R = 1,18 \left(\frac{t_{rB} - t_{rA}}{\delta_B + \delta_A} \right)$$

Contrairement à α le terme R prend en compte la forme des pics et leur recouvrement éventuel.

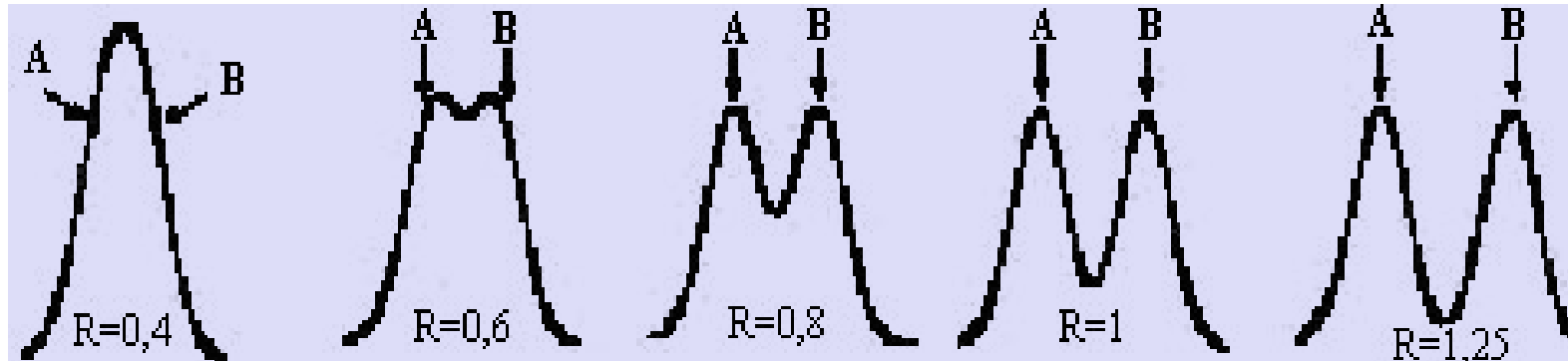


Figure 6. Influence du terme R sur la séparation de deux pics d'intensité égale

→ Généralement : bonne séparation pour $R \geq 1,5$

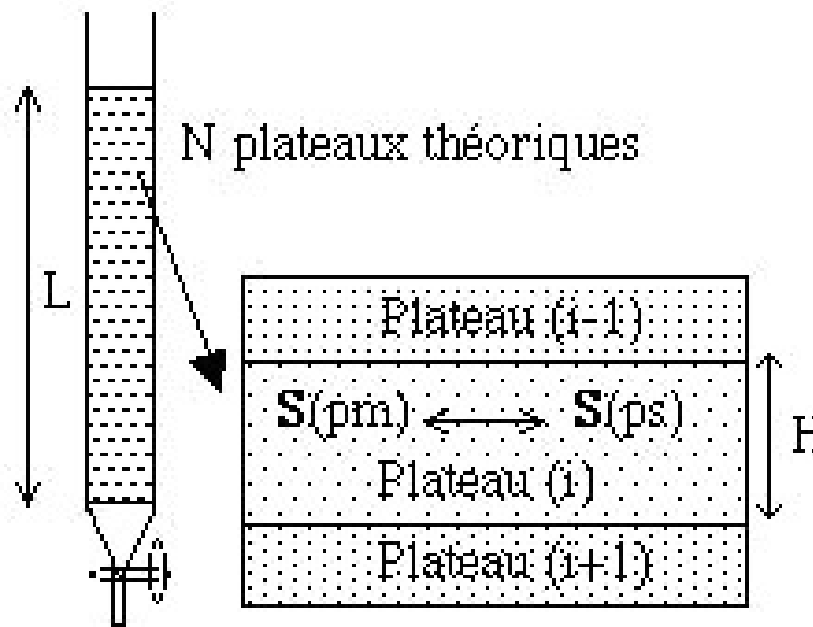
Pour $\omega_A \approx \omega_B$, on a la relation de **Purnell**,

$$R = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_p}{1 + k'_p} \right) \sqrt{N_p}$$

I-6-5- Efficacité d'une colonne

I-6-5-1- Modèle des plateaux théoriques

Assimilation d'une colonne de chromatographie à une colonne à distiller pour essayer d'expliquer la forme des pics:



I-6-5-2- Nombre de plateaux théoriques

Le nombre de plateaux théoriques **N** de la colonne mesure son efficacité

$$N\sigma^2=(t_r)^2$$

L'efficacité d'une colonne est son aptitude à donner des pics fins (**σ** petit) donc **N** élevé.

Les fabricant donnent toujours dans les spécifications le nombre de plateaux théoriques **N**

Autres expressions de **N**:



Formule utilisant la largeur à la base ω du pic

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{\omega} \right)^2$$

Formule utilisant la largeur à mi hauteur δ du pic

$$N = 5,54 \left(\frac{t_r}{\delta} \right)^2$$

Formule utilisant la hauteur h_p et l'aire A du pic

$$N = 16 \left(\frac{h_p t_r}{A} \right)^2$$

(ω , δ , h_p , A et t_r doivent être exprimés dans la même unité).

I-6-5-3- Hauteur équivalente à un plateau Théorique: HEPT

$$HEPT = L/N$$

avec L = longueur de la colonne

N= nombre de plateau théorique

Elle permet de comparer des colonnes de longueurs différentes

The background features five circles in a horizontal row. The first, third, and fifth circles are solid light blue. The second and fourth circles are white with a light blue outline. Overlaid on the right side of the circles is a small chromatogram showing a single sharp peak with a blue baseline and a pink peak, with some numerical labels in pink and blue.

I-7: Mécanisme d'élargissement d'un pic chromatographique

I-7-1: Equation de Van Deemter (1956)

Expression de l'équation :

$$H_{EPT} = A + B/\bar{u} + C.\bar{u}$$

où \bar{u} est la vitesse moyenne de la phase mobile (cm/s)

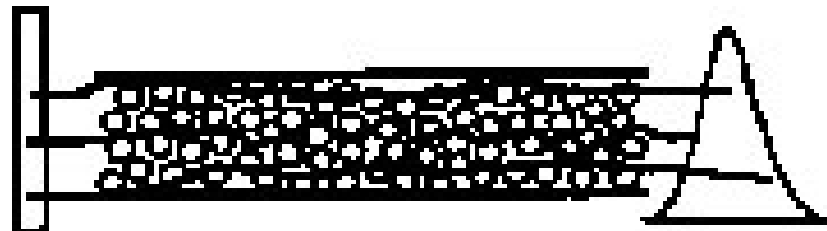
Trois facteurs, représentés par ces 3 termes, contribuent à l'élargissement des pics:



I-7-2: Diffusion turbulente (Terme A)

Suivant la taille et la forme des particules, ils existent pour la **phase mobile**, plusieurs trajets possibles

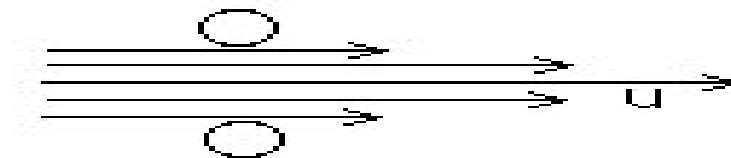
→ élargissement des pics



La contribution de **A** est nulle pour une colonne capillaire de CPG.

I-7-3- Diffusion longitudinale (Terme B)

Le terme B/u traduit la dispersion du soluté à cause de sa diffusion dans la colonne.



Par exemple, dans un flux liquide, les molécules au centre du flux progressent plus vite que celles qui sont sur les bords au contact des particules

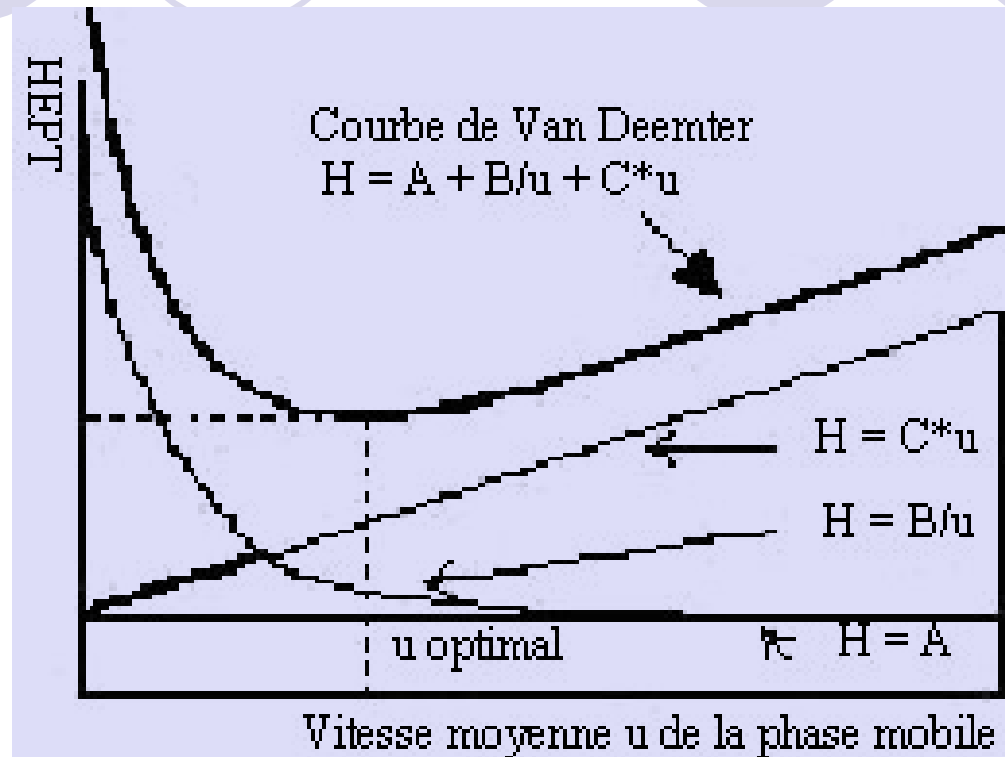
I-7-4 - Résistance au transfert de masse (Terme C)

Le terme $C^* \bar{u}$ représente la résistance au transfert du soluté entre les phases mobiles et stationnaires, cette résistance empêche l'établissement de l'équilibre entre $S(pm)$ et $S(ps)$.

En définitif:

→ les colonnes les plus efficaces seront celles régulièrement remplies et bien tassées où le diamètre des particules est le plus faible possible

I-7- 4- Représentation de la Courbe de Van Deemter en CPG



En conclusion: Existence d'un débit optimal de phase mobile pour lequel l'efficacité de la colonne est maximale (HEPT minimum).

II: Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

II-1 -Description d'un chromatographe

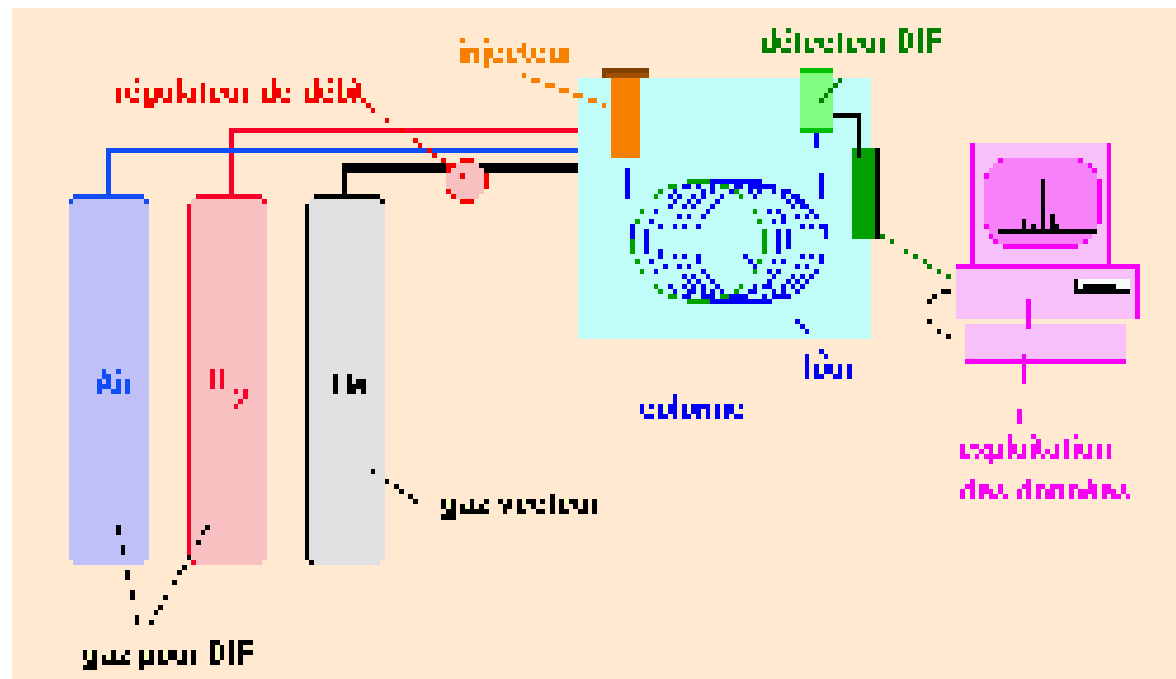


Fig.1 : schéma général d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un détecteur à ionisation de flamme.

II-1-1 Colonnes :

Il existe deux types de colonnes :

- colonnes remplies ($L = 1$ à 3 m, $d_i = 1$ à 6 mm);
- colonnes capillaires ($L = 15$ à 100 m, $d_i = 0,1$ à $0,35$ mm).

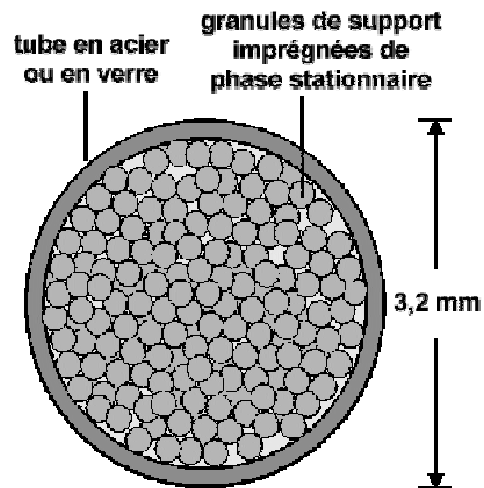


Fig.2 : Colonne remplie

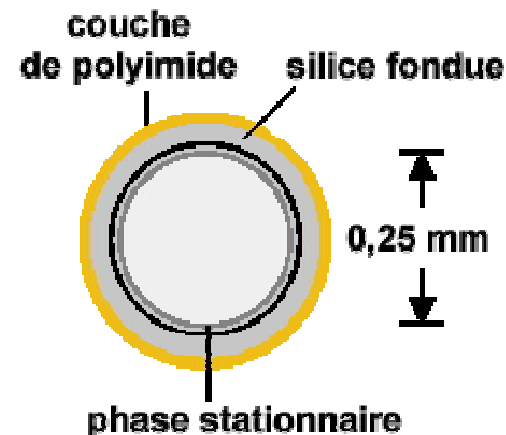
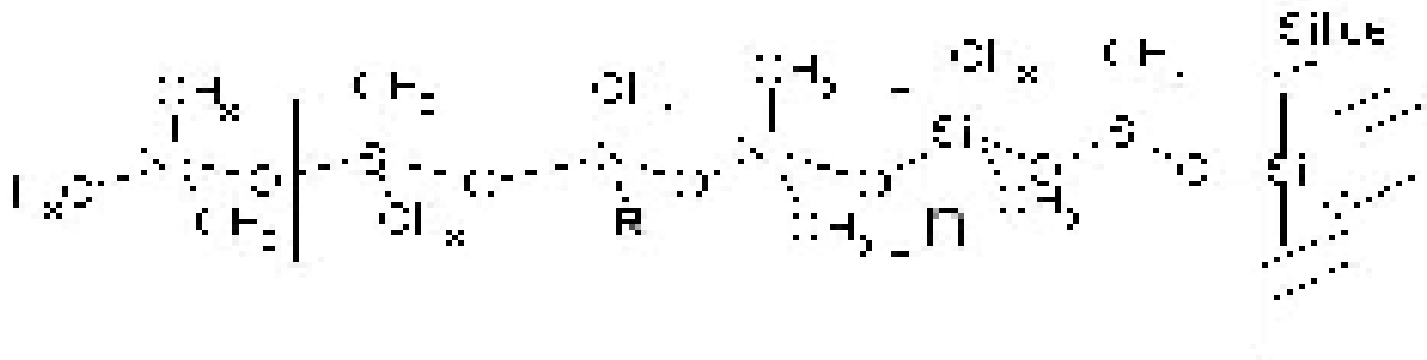


Fig.3 : Colonne capillaire.

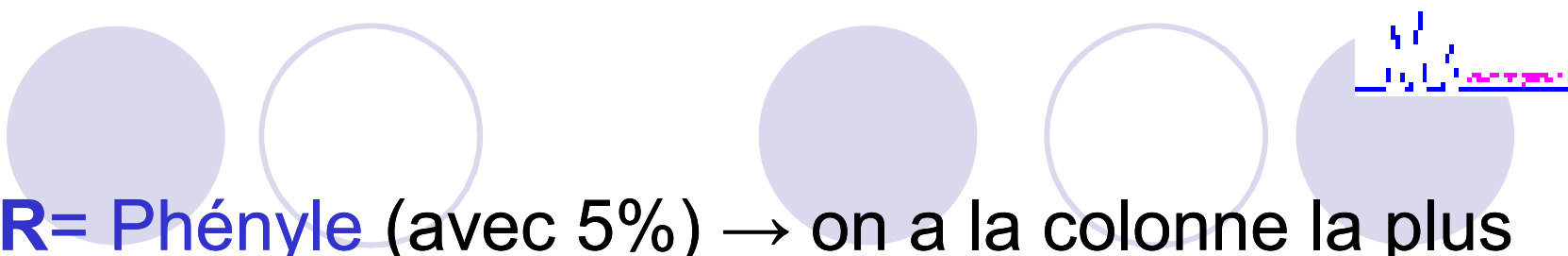
II-1 – 2– Phases stationnaires


Les phases les plus répandues sont les polymères siliconés dérivés du diméthyl polysiloxane



Phase stationnaire dérivée du diméthyl polysiloxane.

- Si **R** = CH_3 → colonne complètement **apolaire**:
séparation des produits suivant leur point d'ébullition
(noms commerciaux : **DB-1**, **OV1**, **SE-30**...)

- 
- Si **R= Phényle** (avec 5%) → on a la colonne la plus utilisée en CPG, elle est répertoriée sous les noms commerciaux: **DB5, CPsil5, OV5...**
 - Si on incorpore un substituant cyanopropyle (**R=-CH₂-CH₂-CH₂-CN**) la **polarité** augmente beaucoup (à cause du fort moment dipolaire du groupe -CN) → Ce sont les phases **DB 1701, CPSil 18...**

The header features five circles in a row. The first, third, and fifth circles are solid light purple. The second and fourth circles are white with a light purple outline. To the right of the circles is a small line graph with a blue line and a pink line, both showing a peak and then a decline.

Ces phases à base de silicone présentent deux avantages pour la CPG :

- 1- une bonne inertie chimique, elles ne réagissent ni avec les phases stationnaires, ni avec les produits injectés.
- 2- une très bonne tenue à la température, elles peuvent être chauffées sans dommage jusqu'à 300°C

Choix des phases stationnaires

Molécules

non-polaires
liaisons C-H et C-C

polaires
liaisons C-H et C-C
liaisons C-Cl, -Br, -F
liaisons C-N, -O, -P, -S

polarisables
liaisons C-H et C=C
et acétyléniques

Exemples

hydrocarbures
normaux
(n-alcanes)

alcools, éthers,
thiols,
amines, acides
carboxyliques,
esters et cétones

alcènes aromatiques

Phases stationnaires

SPB-octyl
poly(méthylsiloxane), SE-30
SPB-5, PTE-5, SE-54

poly(méthylphényl
siloxane)
poly(cyanopropyl
méthylsiloxane)
PEG, Carbowax 10, 20M

poly(cyanopropylsiloxane)
poly(cyanopropylphénylsiloxane)

II-1-3- Injecteur

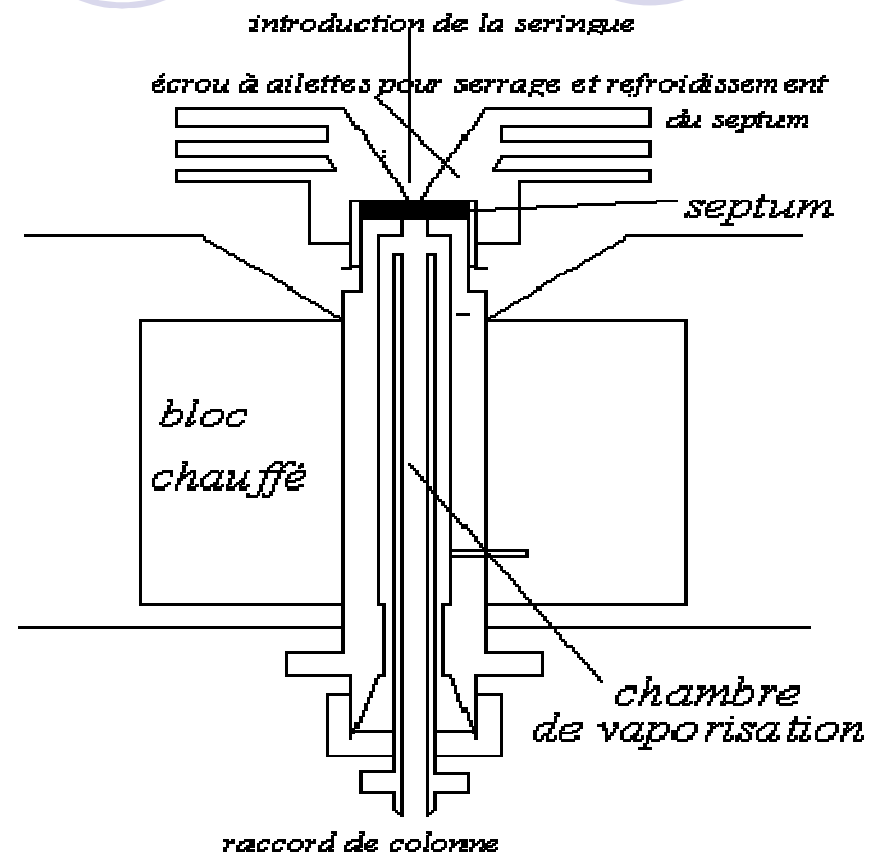


Fig.4 : schéma simplifié d'un injecteur

II-1-4- Détecteur

II-1-4-1-Détecteur à conductibilité thermique (TCD) catharomètre

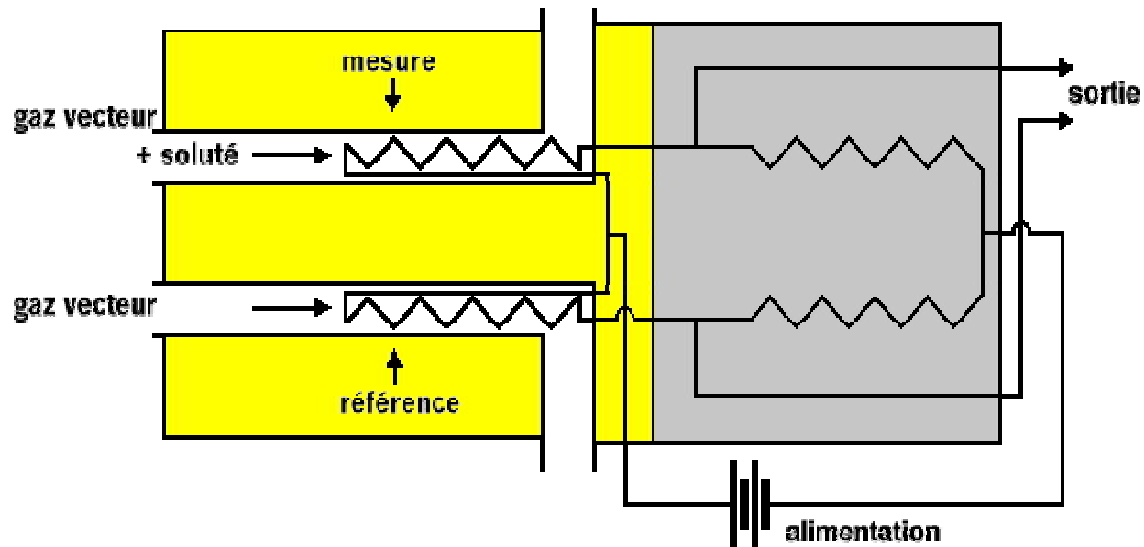


Fig.5: Détecteur à conductibilité thermique

II-1-4-2- Détecteur à ionisation de flamme (FID)

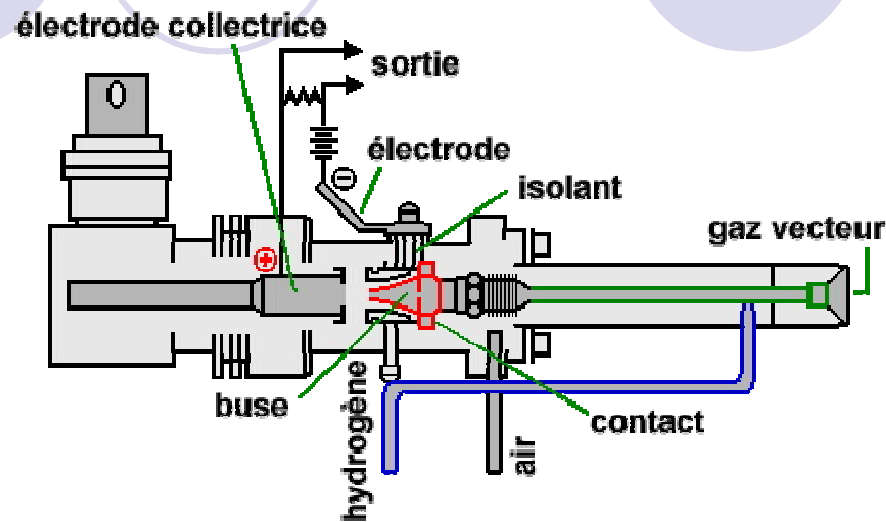
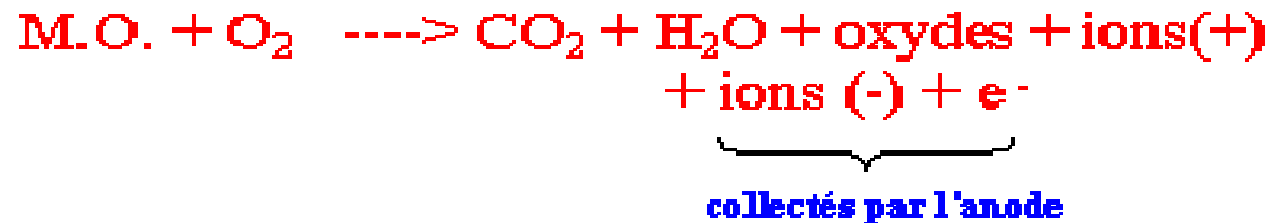


Fig.6 : Détecteur à ionisation de flamme



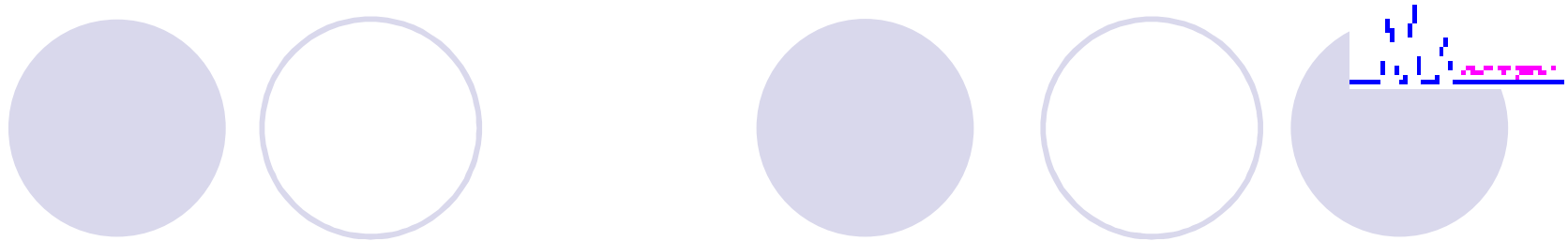
II-1-4-3- Détecteur à capture d'électron (ECD)



Une source telle que le tritium (^3H) ou le (^{63}Ni) envoie des électrons libres dans le détecteur → signal

**Performances des détecteurs :*

Catharomètre TCD	FID	ECD
1 à 10 ng (tous composés)	20 à 200 pg (composés organiques)	0,1 pg (composés Halogénés)



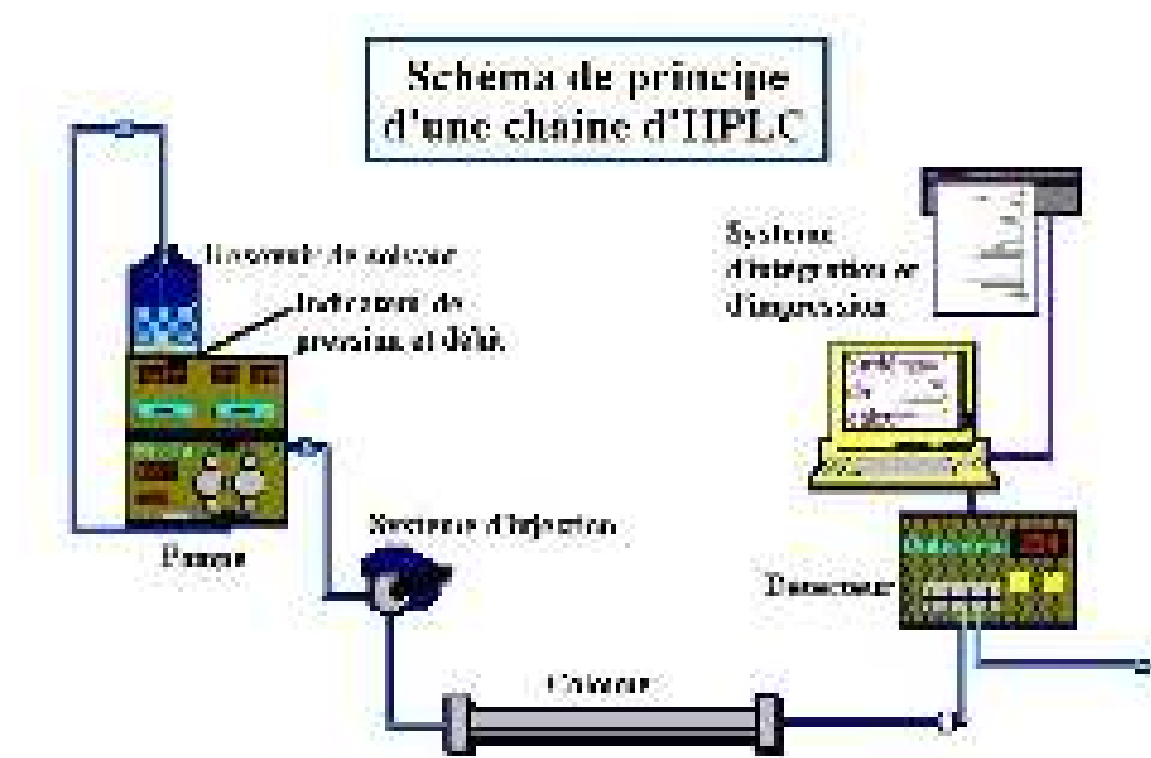
II- Optimisation d'une séparation:

Pour une bonne séparation, il faut vérifier:

- * Température de l'injecteur et de la colonne.
- * Débit du gaz vecteur.
- Choix du détecteur : TCD, FID, ECD
- Nature du gaz vecteur imposé par le détecteur, fonction de l'efficacité souhaitée et du coût/sécurité.

III: Chromatographie en phase liquide HPLC

III-1- Appareillage



III-I-1. Réservoir de la phase mobile (solvant)

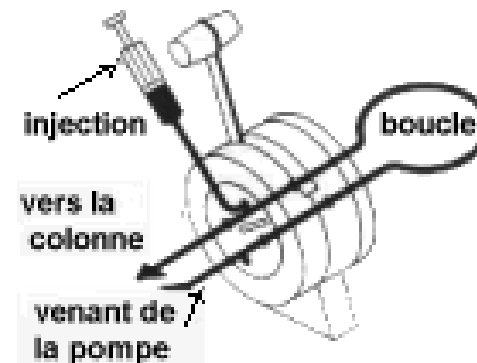
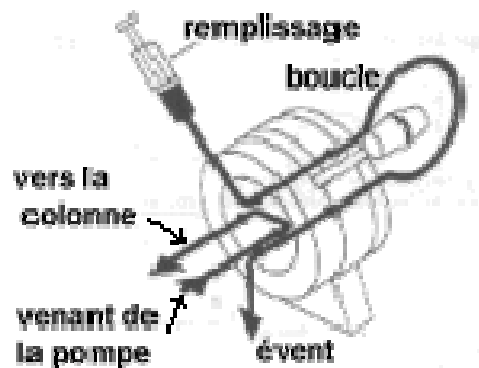
Le plus souvent ce réservoir est une bouteille en verre dans laquelle plonge un tube avec une extrémité filtrante en téflon.

III-I-2- Pompe

Elle délivre en continu la phase mobile. Elle est définie par la pression qu'elle permet d'atteindre dans la colonne, son débit, et la stabilité du flux.

III-1-3- Injecteur

Le type d'injecteur le plus couramment utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe (10, 20, 50 μL ...). Cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne.



The decorative graphic at the top of the slide consists of three circles on the left and three circles on the right. The first circle on the left is solid light purple, the second is a light purple outline, and the third is also a light purple outline. To the right of these are three more circles: a solid light purple one, a light purple outline one, and a light purple outline one that contains a small chromatogram with several peaks. The text 'III-1-4- Colonne' is written in blue across the first two circles on the left.

III-1-4- Colonne

- Colonnes en inox;
- diamètre interne de ≈ 4 mm;
- longueur = 5, 10, 15, ou 25 cm;
- Le remplissage (en silice, silice greffée ou particules polymériques) a une granulométrie de 3, 5, ou 10 μm .

III-1-5- Les détecteurs

a- Détecteurs UV –visible: le plus universel

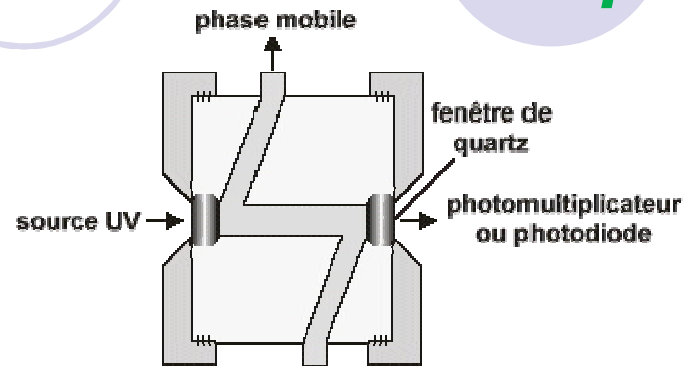
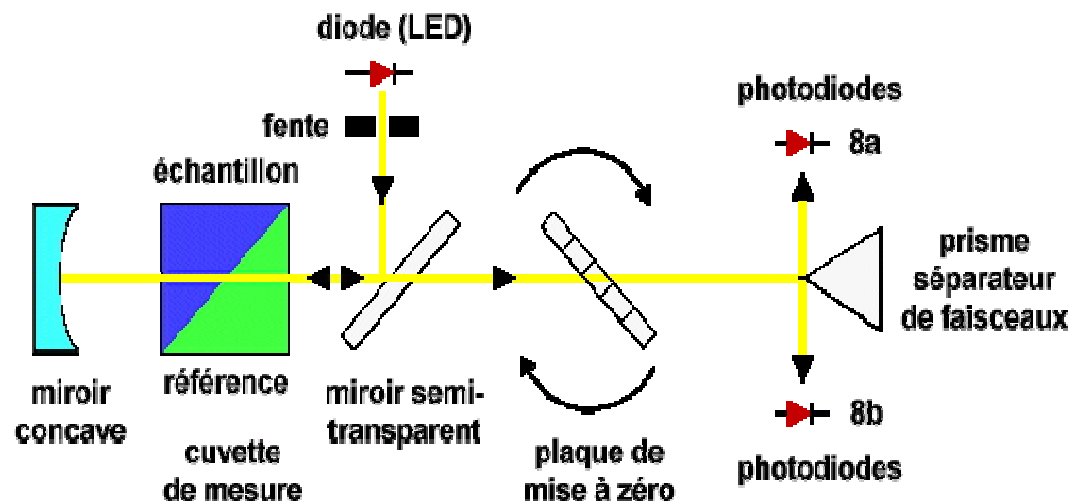
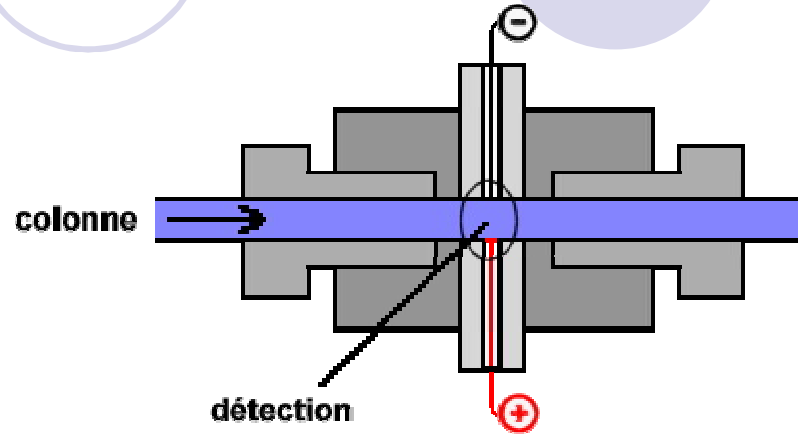


Figure1 . Schéma d'une cuvette trouvée dans un détecteur UV - visible.

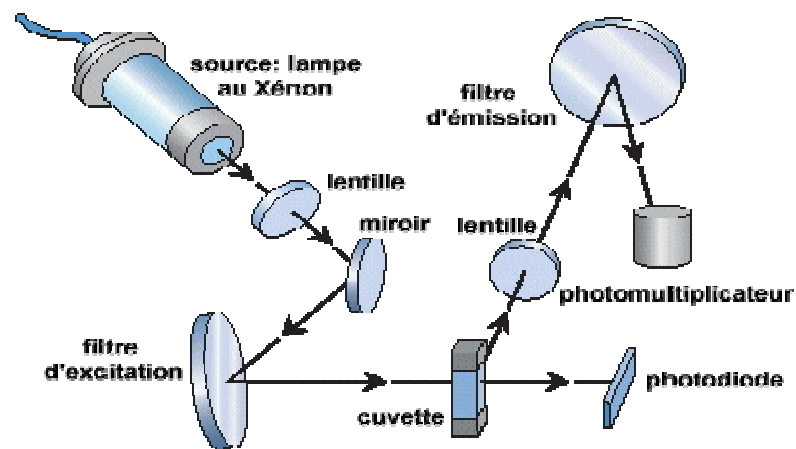
b- Réfractomètre



c- détecteurs conductimètres



d- détecteurs fluorimétriques.



III -2- Comparaison CG/CL

Les deux techniques ne sont pas compétitives mais tout à fait complémentaires.

Quelques avantages de la CL :

Possibilité de chromatographier :

- Produits thermolabiles;
- Produits de haute masse moléculaire.
- Mode préparatif facile à mettre en œuvre

Quelques avantages de la C.G :

- Détecteurs spécifiques et sensibles;
- Couplage avec spectrométrie
- Possibilité d'analyser les produits de très faible masse moléculaire.

The header features a horizontal row of five circles. The first, third, and fifth circles are solid light purple. The second and fourth circles are white with a light purple outline. To the right of the circles is a stylized signal waveform in blue and purple, consisting of several sharp peaks and a baseline.

IV: Analyse quantitative:

IV- 1- La chromatographie est aussi une technique analytique quantitative, .

La masse m_i de soluté i détecté est proportionnelle à l'aire A_i du signal mesuré :

$$m_i = K_i \cdot A_i$$

The header features a horizontal row of five circles. The first, third, and fifth circles are solid light purple, while the second and fourth are white with light purple outlines. To the right of the circles is a small graphic of a chromatogram with a blue baseline and several peaks, some colored in purple and pink.

K_i : coefficient de réponse du détecteur pour le soluté i.

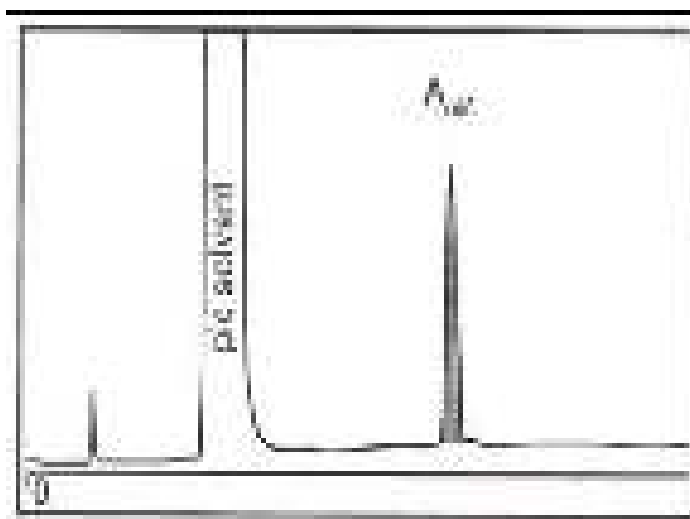
K_i dépend de la colonne, de la sensibilité du détecteur et des conditions expérimentales.

A_i = aire du pic d'élution du soluté i.

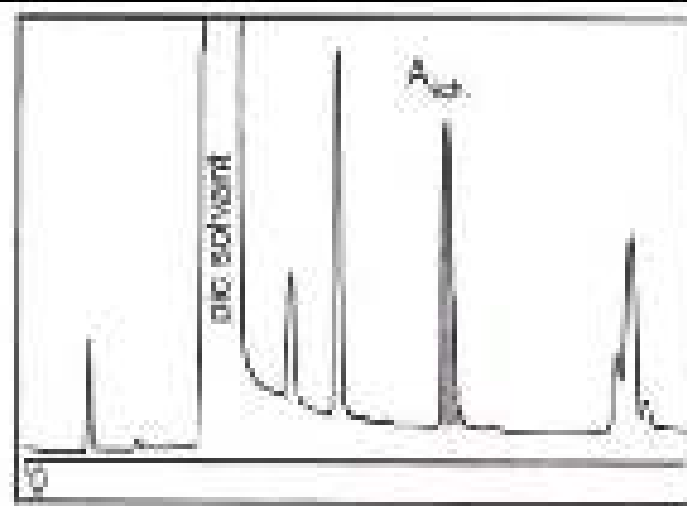
Dans la pratique, il faut donc déterminer K_i et A_i pour chaque soluté i

IV-2- Méthodes d'étalonnage


- Etalonnage externe
- Etalonnage interne



chromatogramme d'étalonnage (C_{std})



chromatogramme de la solution à doser (C_{sam})



Le champ d'application en **analyse quantitative** est restreint aux situations où la **composition** du mélange à séparer est connue.

Pour identifier des composés dont on ignore tout de leur structure chimique, il est fréquent de coupler à la chromatographie une autre technique d'analyse complémentaire comme la spectrométrie de masse ou la spectroscopie infrarouge.

Domaine d'application de la chromatographie



Domaine d'application très vaste:

- ♣ Industries chimiques ;
- ♣ Agro-alimentaires ;
- ♣ Environnement ;
- ♣ Pharmacie
- ♣ Biochimie.

Avantage: Séparation, identification et quantification de très faibles quantités de produits (\approx ng)




V: AUTRES TYPES DE CHROMATOGRAPHIE

En plus des deux techniques présentées ci-dessus et de la chromatographie sur couche mince **CCM** ou sur **papier** et la **chromatographie d'exclusion stérique** Il existe aussi :

V-1- La chromatographie supercritique

pm = gaz à l'état supercritique (en général CO_2 à 50° et 150 bars)

ps = solide ou liquide greffé sur solide.



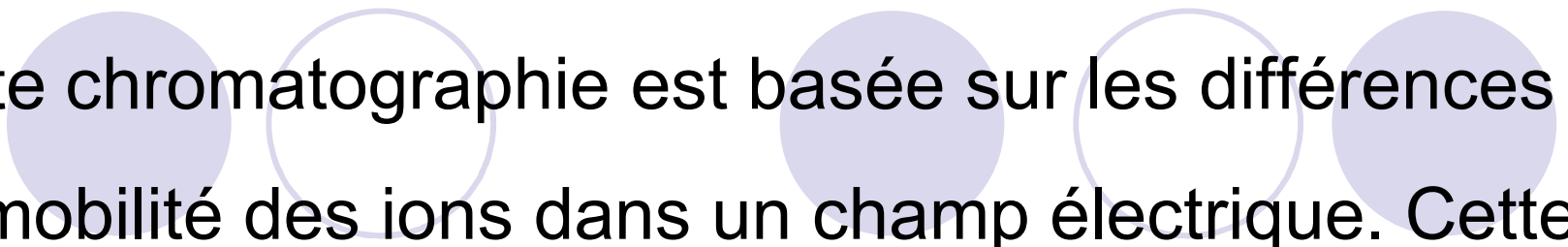
Cette chromatographie combine les bons résultats de la CPG au point de vue séparation et le domaine d'utilisation de la LC.

V-2- L'électrophorèse

pm = solution tampon.

ps = gel disposé sur une plaque ou dans un tube capillaire

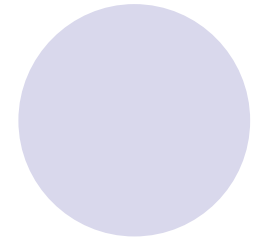
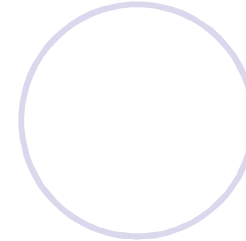
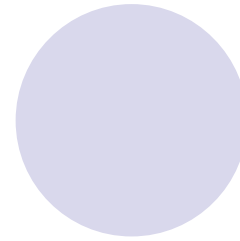
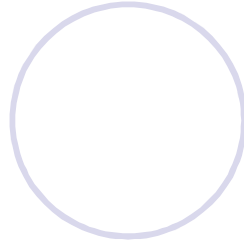
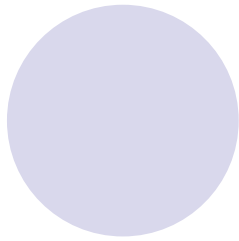
Un champ électrique est appliqué aux deux extrémités de la plaque (ou du tube).



Cette chromatographie est basée sur les différences de mobilité des ions dans un champ électrique. Cette mobilité varie en fonction de la **charge** de la **taille** et de la **géométrie** des **molécules**.

Les ions positifs vont vers l'électrode négative et vice versa.

***Applications** : Séparation des protéines, peptides, empreintes génétiques.*



***MERCI POUR VOTRE
ATTENTION***