

(1)

Chromatographie

Rappels

Classification (technologies) *Dr Laib*

- Chromatographie sur colonne
- Chromatographie de surface : sur papier ou sur couche mince (CCM)

Classification (phénomènes)

Dr Laib

Phénomène	Phase mobile	Phase stationnaire	Type
Adsorption	Liquide	Solide	LS
Adsorption	Gaz	Solide	GS
Partage	Liquide	Liquide	LL
Partage	Gaz	Liquide	GL
Échange ions	Liquide ionique	Échangeur d'ions	Echange ions
Exclusion stérique	Liquide	Gel	Exclusion

Classification (**phases**)

Phase mobile	Phase stationnaire	Type
Liquide	Liquide	LL
liquide	Solide	LS
Gaz	Liquide	GL
Gaz	Solide	GS

- La phase stationnaire est une phase qui reste en place, soit dans une colonne, soit sur une surface plane.
- La phase mobile est une phase qui se déplace sur ou à travers la phase stationnaire, entraînant l'analyte avec elle.

- La chromatographie est une méthode de séparation physique des constituants d'un mélange gazeux, liquide ou solide.
- Elle est basée sur les différences d'affinités que peuvent présenter deux ou plusieurs composés pour 2 phases, l'une stationnaire et l'autre mobile.

(2)

*Chromatographie sur
Couche Mince*

La CCM (TLC): Thin-Layer Chromatography)

est une méthode assez ancienne, relativement peu performante, mais très utilisée car :

- Elle ne nécessite pas un appareillage sophistiqué ;
- Son coût de revient est très faible ;
- Elle offre la possibilité de traiter rapidement un grand nombre d'échantillons.

- Dans le cas de **solutés incolores**, il est nécessaire de visualiser les spots par une réaction colorée (**révélation**)
- Cette réaction colorée peut être générale ou spécifique ou par fluorescence.
- L'identification des constituants du mélange se fait par comparaison avec des témoins, le **R_f** (**rapport au front**) de chaque soluté.

- L'identification des constituants du mélange se fait par comparaison avec des témoins, en calculant le R_f (rapport au front) de chaque soluté.

mettre l'éluant
dans le bêcher
sur
environ
5 mm
de haut

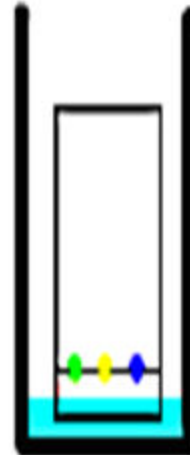


Plaque
chromatographique

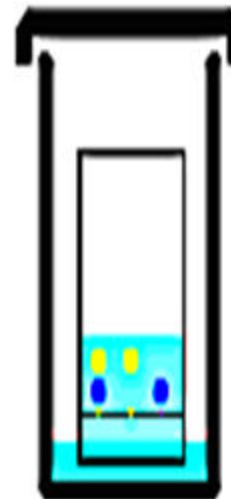
Marquer
d'un trait
l'endroit
des dépôts



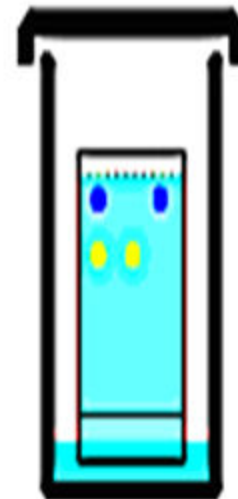
X : solution inconnue
A : solution connue A
B : Solution connue B



Placer la plaque
dans le bêcher
contenant l'éluant

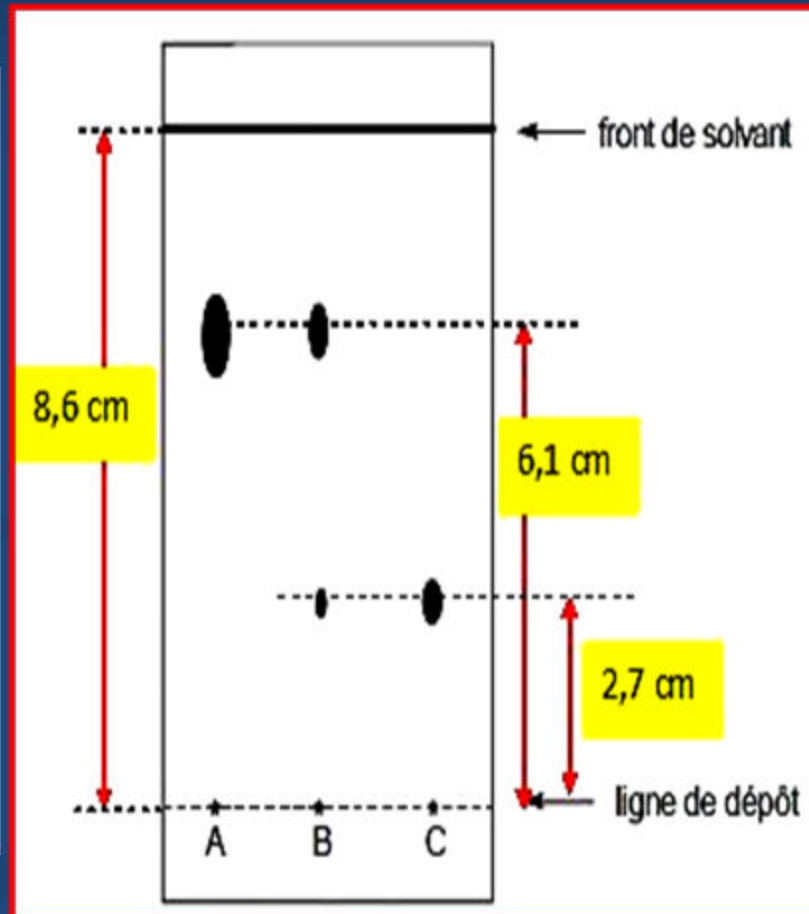
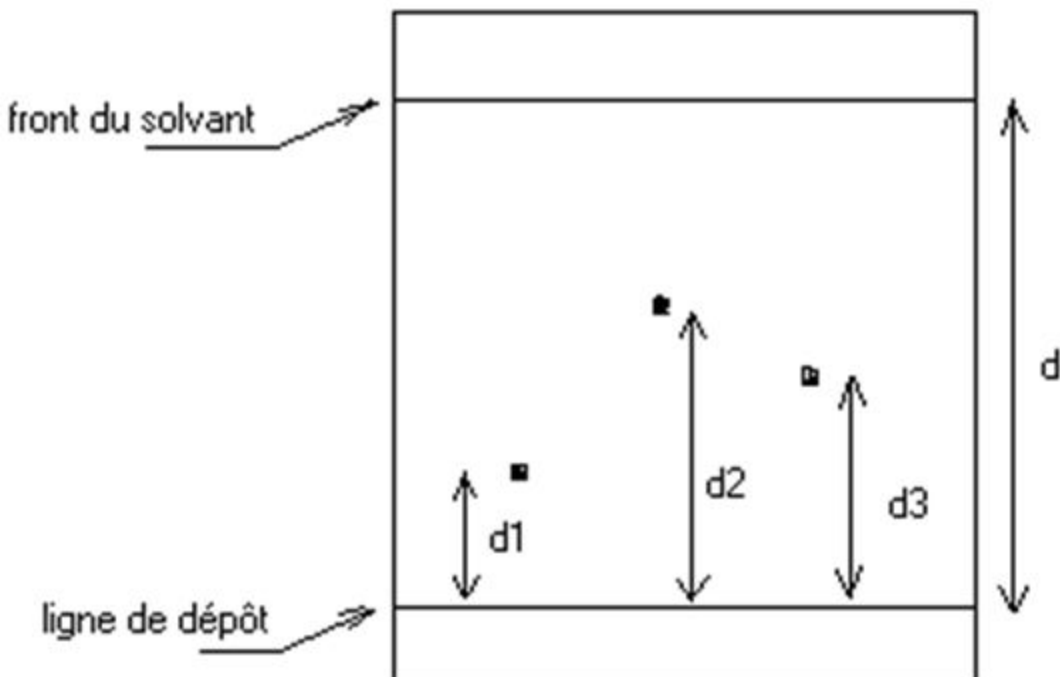


Refermer
L'élution commence



Lorsque l'éluant
a migré jusqu'en haut
sortir rapidement la plaque

Rapport au front (R_f) ou Référence front

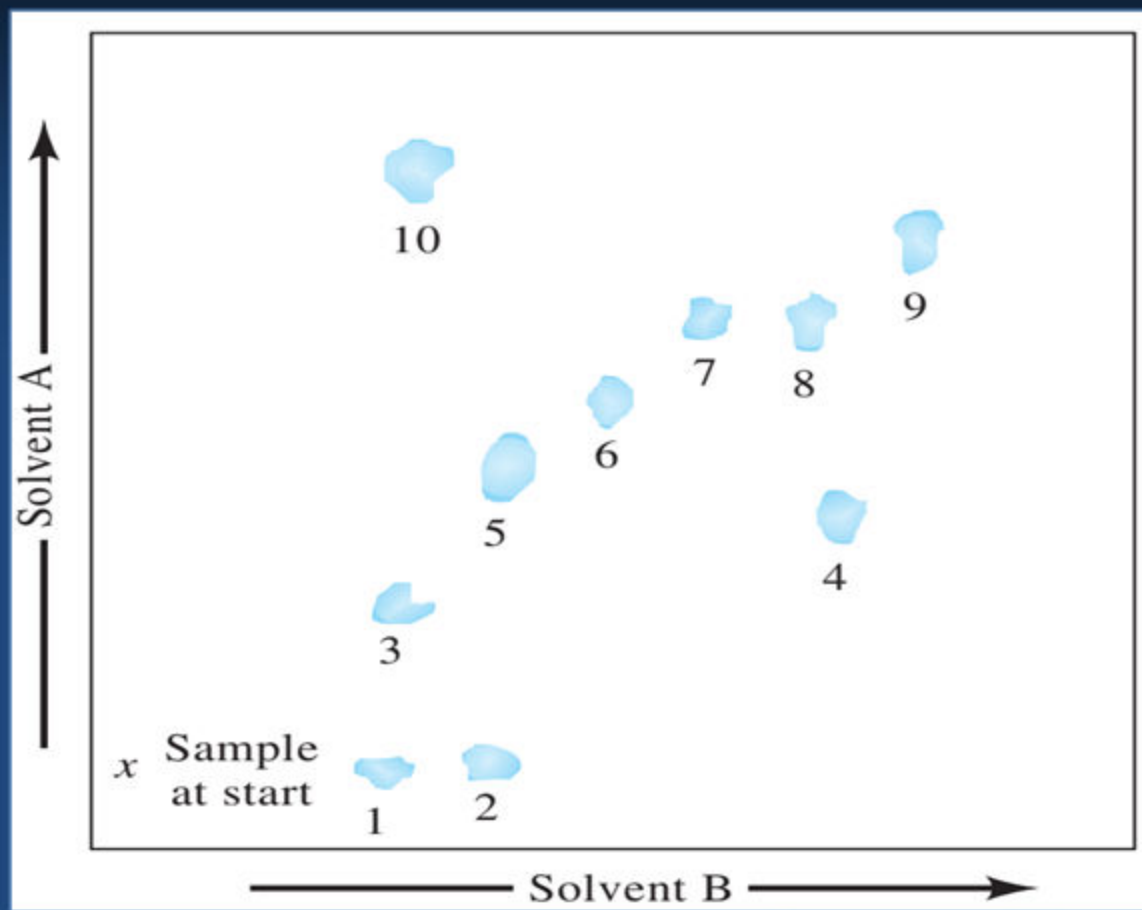


$$R_{f1} = d_1/d$$

$$R_{f2} = d_2/d$$

$$R_{f3} = d_3/d$$

CCM Bi-dimensionnelle
(gel de silice) de quelques
acides aminés.



Solvent A: toluene, 2-chloroethanol, pyridine.

Solvent B: chloroform, benzyl alcohol, acetic acid.

Amino acids : (1) acide Aspartique, (2) acide Glutamique, (3) Serine, (4) β -Alanine, (5) Glycine, (6) Alanine, (7) Methionine, (8) Valine, (9) Isoleucine, (10) Cysteine.

Les détecteurs

- À catharomètre ; à ionisation de flammes ; à capture d'électrons ; spectrographie de masse.

(4)

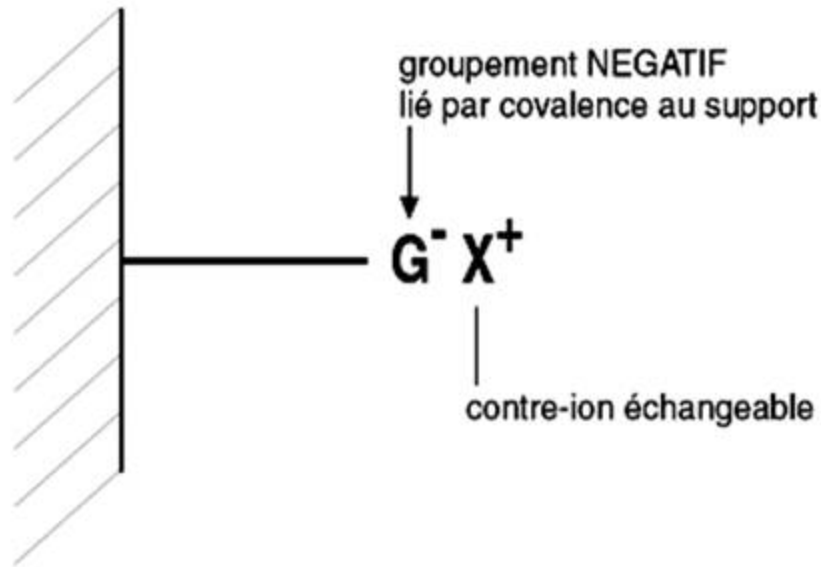
Chromatographie échangeuse d'ions

- Dans la chromatographie échangeuse d'ions, le paramètre qui va permettre la séparation des différents constituants est la charge nette.
- Pour cela, on utilise des résines chargées positivement (chromatographie échangeuse d'anions) ou négativement (chromatographie échangeuse de cations).

Les molécules à séparer sont dans le même tampon (même pH) et en fonction de leur point isoélectrique (pI), elle porte une charge nette :

- **Négative** : le pI de l'albumine de sérum bovin est 4.9, cette protéine est chargée négativement à pH 7.
- **Positive** : le pI du cytochrome c est 10.7, cette protéine est chargée positivement à pH 7.

Résine échangeuse de cations (cationique) :

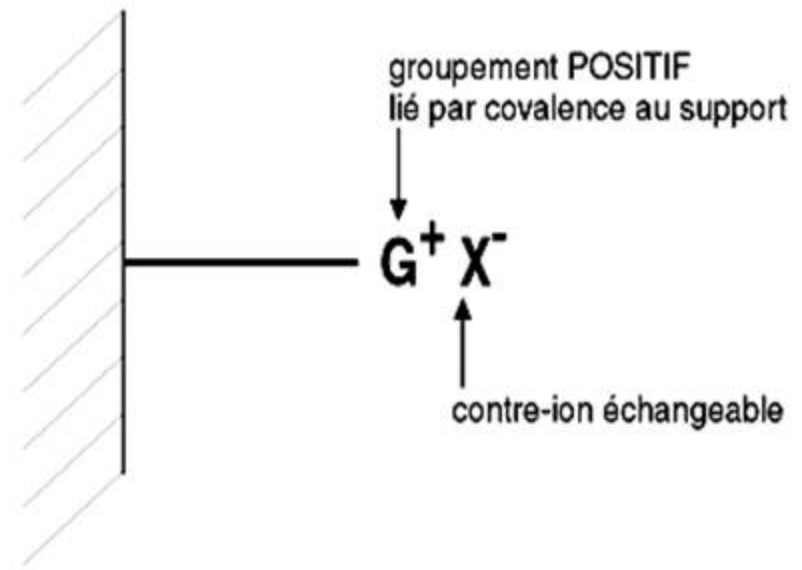


Résine cationique

chargée

négativement

Résine échangeuse d'anions (anionique) :



Résine anionique

chargée positivement

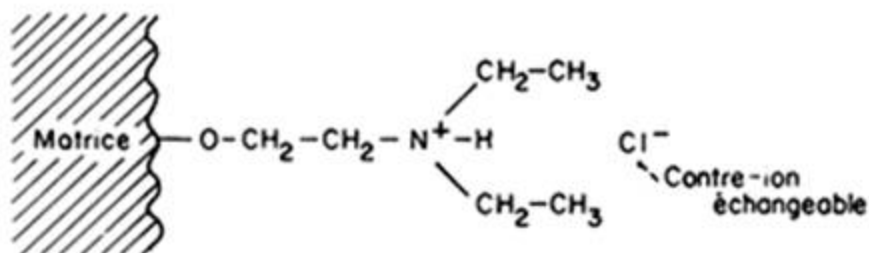
Exemple : Variation de la **charge nette** d'une **protéine** en fonction du **pH**

Il y a 2 manières d'éluer les molécules fixées sur la résine :

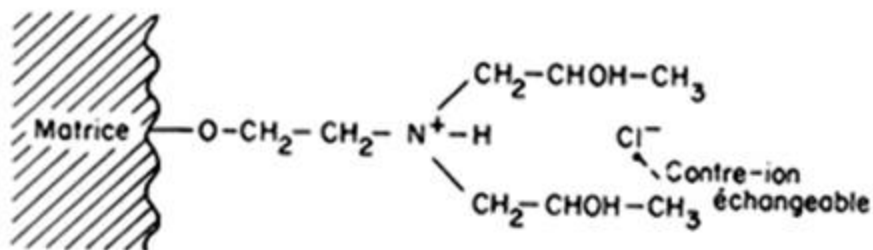
- En modifiant le pH de la phase mobile (les molécules qui sont chargées ne le soient plus ou qu'elles portent une charge de même signe que l'échangeur d'ions) ;

En ajoutant un sel (à une concentration croissante) qui apporte forcément un ion de même charge que les molécules fixées à la résine : cet ion s'appelle un contre - ion.

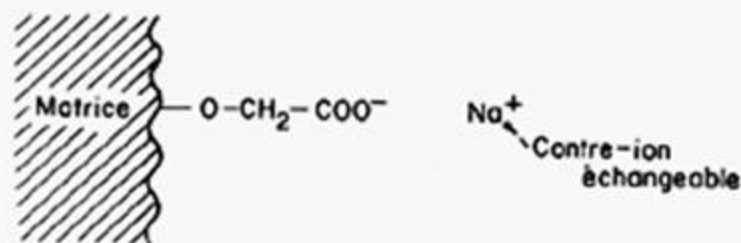
– le DEAE-polyoside (diéthylaminoéthyle), échangeur anionique faible :



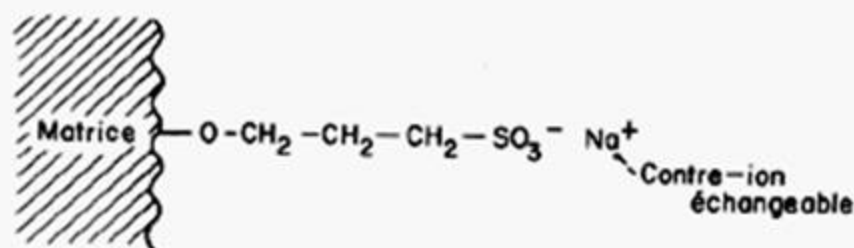
– le QAE-polyoside (quaternaire aminoéthyle), échangeur anionique fort :



– le CM-polyoside (carboxyméthyle) : échangeur cationique faible :



– le SP-polyoside (sulfopropyle) : échangeur cationique fort :



Echangeurs anioniques

Sephadex

Echangeurs cationiques

Sephadex

- Dans la chromatographie échangeuse d'ions, le paramètre qui va permettre la séparation des différents constituants est la charge nette.
- Pour cela, on utilise des résines chargées positivement (chromatographie échangeuse d'anions) ou négativement (chromatographie échangeuse de cations).

(3)

Chromatographie par exclusion stérique

- Appelée chromatographie d'exclusion-diffusion, tamisage moléculaire, gel de filtration, perméation de gel.
- La phase stationnaire est un solide poreux : les grosses particules sont exclues de la phase fixe, en revanche les petites particules incluses diffusent dans les pores du gel.

- La vitesse de migration d'un composé va donc dépendre, pour une même famille de molécules, de sa masse moléculaire.
- La plupart des gels sont constitués de dextran (Sephadex), d'agarose ou de polyacrylamide.

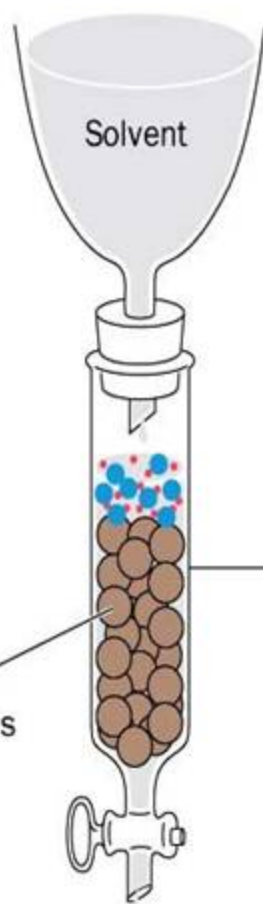
(a)



Gel bead

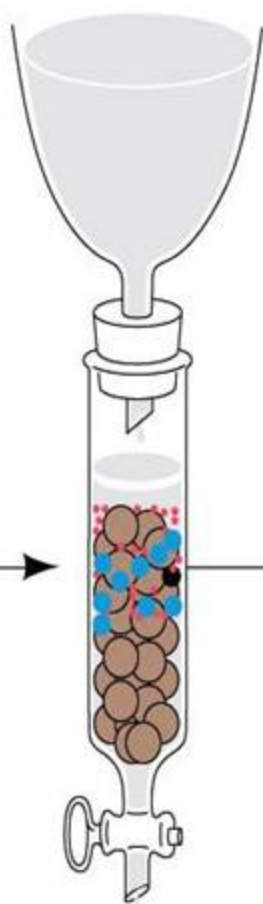
Gel matrix

(b)

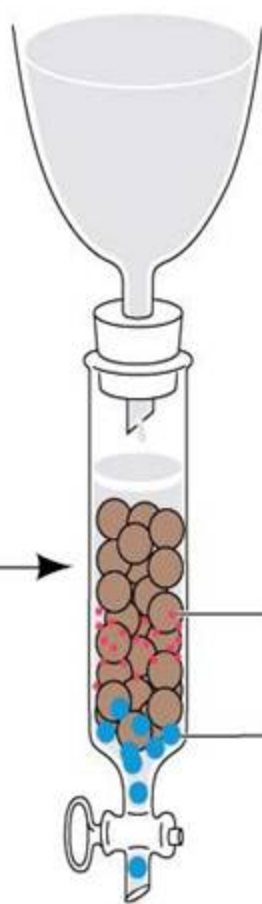


Gel beads

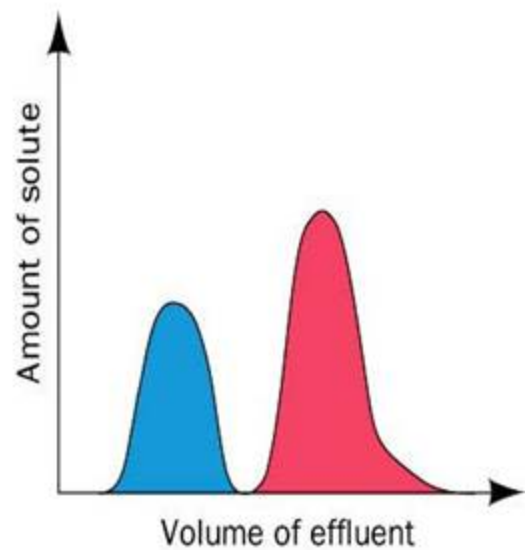
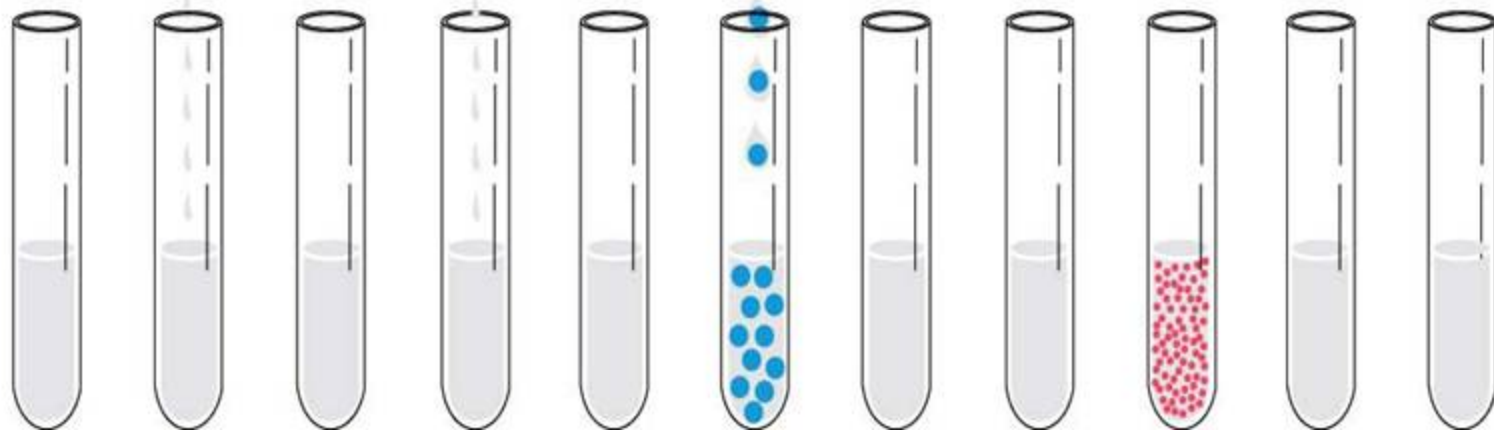
(c)



(d)

Small molecules
Large molecules

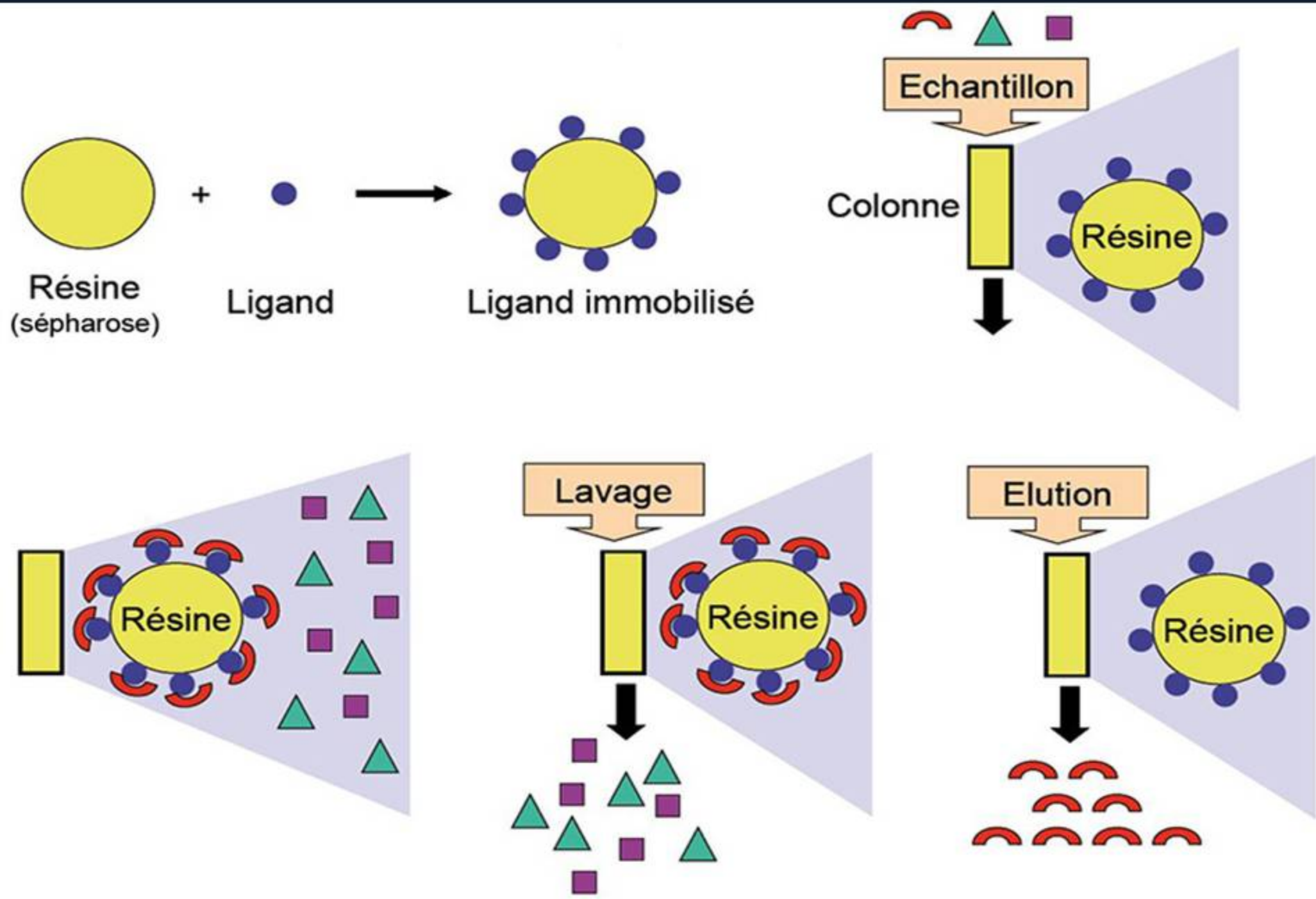
(e)

*Dr Laib*

(5)

Chromatographie d'affinité

- C'est le type de chromatographie le plus sélectif, une protéine pouvant être purifiée d'un facteur 10^3 à 10^4 en une seule fois.
- Le principe de la chromatographie d'affinité repose sur la reconnaissance entre une molécule du mélange à séparer et une molécule greffée sur la résine, que l'on appelle le ligand.



(6)

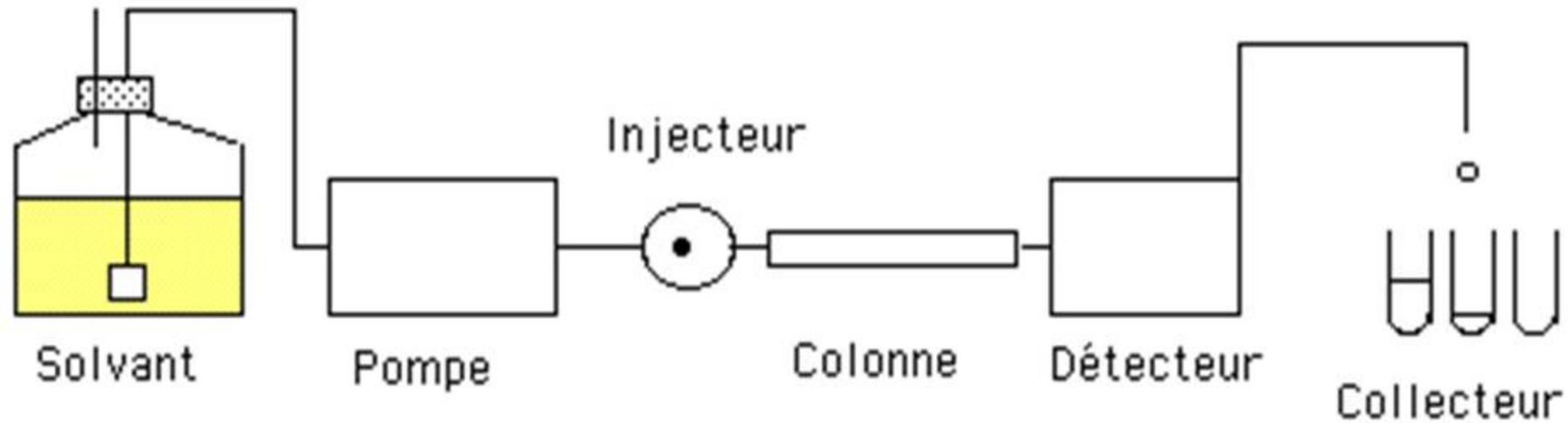
*Chromatographie Liquide
de Haute Performance
(HPLC)*

Principe

La chromatographie de partage est la méthode la plus employée actuellement en HPLC.

La phase stationnaire et la phase mobile sont liquides.

Elle est basée sur la différence de solubilité du soluté dans la phase mobile et la phase stationnaire (Partage).



1. Réservoirs de solvants

- Filtration des solvants
- Dégazages aux ultrasons

2. Dispositif de pompage

Pompes alternative (Débits utilisés : $0,1-2 \text{ ml.min}^{-1}$)

3. Dispositif d'injection (HPLC)

Dr Laib

➤ Remplissage de la boucle d'injection (V fixé 5-500 μ l)

Comme la pression dans le **circuit pompe-colonne** est très élevée, on utilise un moyen indirect pour introduire l'**échantillon** à l'entrée de la **colonne**. Celui-ci est d'abord introduit à l'aide d'une **seringue** dans un **injecteur** à **boucle** externe, en **position Load**. On injecte toujours un volume supérieur à celui de la boucle, en prenant soin de ne pas introduire de bulles d'air dans la **boucle**. En tournant la valve en **position Inject**, seul le contenu de la boucle est dirigé en tête de colonne.

Cette méthode d'injection a l'avantage de donner des résultats très reproductibles, d'une injection à l'autre.

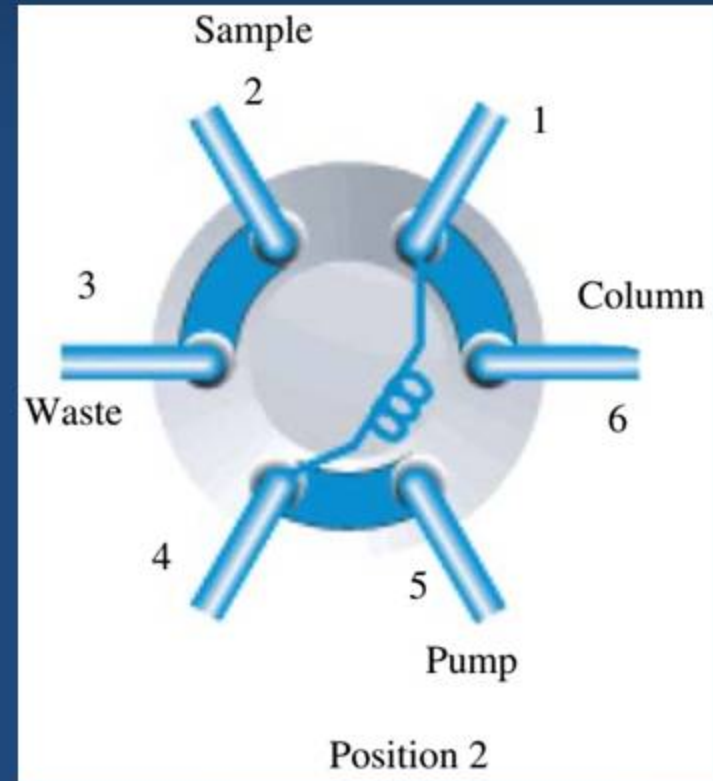
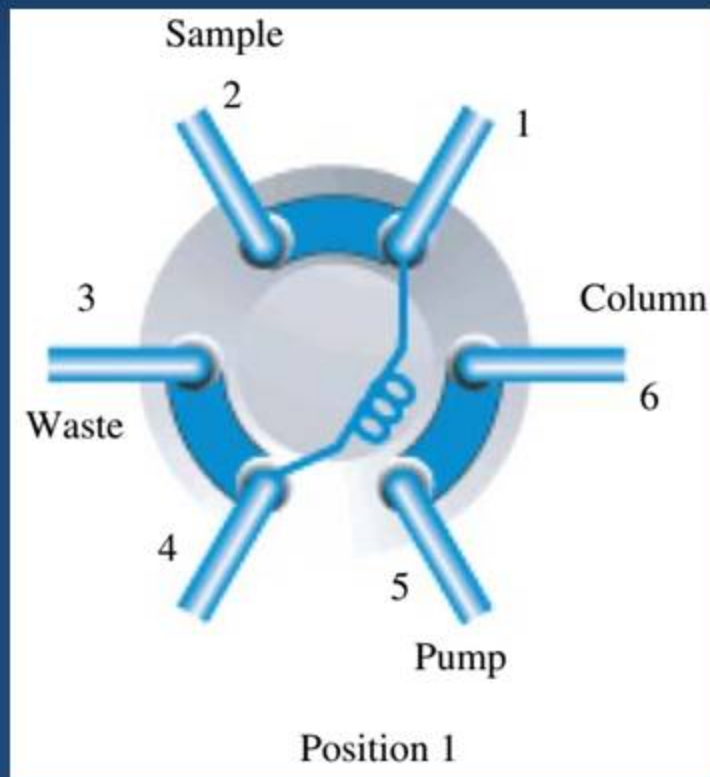


Figure 22.6. Valve switching flow paths through position A “load” and position B “inject.” (Ham & MaHam, 2024)

4. Colonnes :

Tubes en **inox** de longueur : **$L = 10$ à 25 cm.**

Micros colonnes de longueur : **$L = 3$ à $7,5$ cm.**

On distingue 2 types différents selon la polarité de la phase stationnaire et celle de la phase mobile :

1 . HPLC en phase normale

La phase stationnaire est polaire = la phase mobile est généralement apolaire (substances éluées en sens inverse de leur polarité propre) :

Les composants apolaires ont une plus grande affinité pour la phase mobile (élution rapide).

Inversement , les solutés polaire ont une plus grande affinité pour la phase stationnaire (élution lente).

2. HPLC en phase inverse

- La phase stationnaire est peu polaire ou apolaire (la phase mobile est généralement polaire) et le solvant polaire, (les substances sont alors élués dans le sens de leur polarité propre) :
- Les composants polaires ont une plus grande affinité pour la phase mobile : (élution rapide).

- Inversement, les solutés peu polaires ont une plus grande affinité pour la phase stationnaire : (élution lente) ;
- Ce sont des gels de silices comportant des greffons alkyles à 8 et à 18 atomes de carbone. (colonnes C_4 , C_8 et C_{18}).

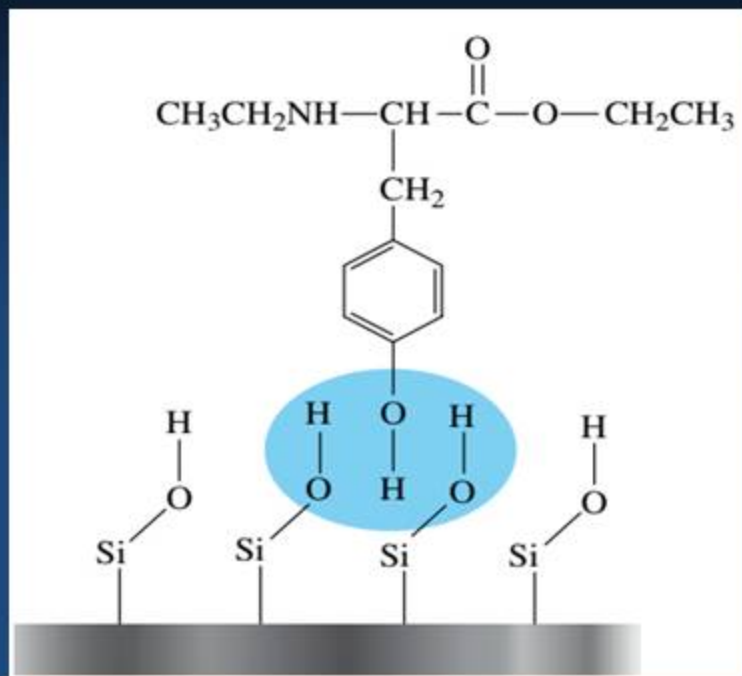


Figure 22.8. Normal phase (NP) silica column stationary phase illustrating the hydrogen bonding interaction (**oval region**) between the **silanol** ($-\text{Si}-\text{OH}$) groups of the stationary phase and the organic compounds **Hydroxyl** ($-\text{OH}$) group. (Ham & MaHam, 2024)

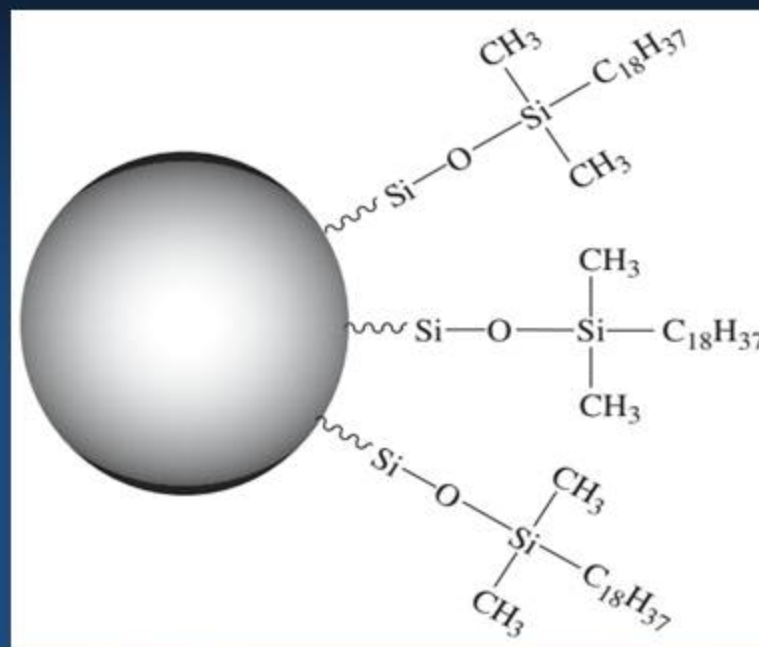
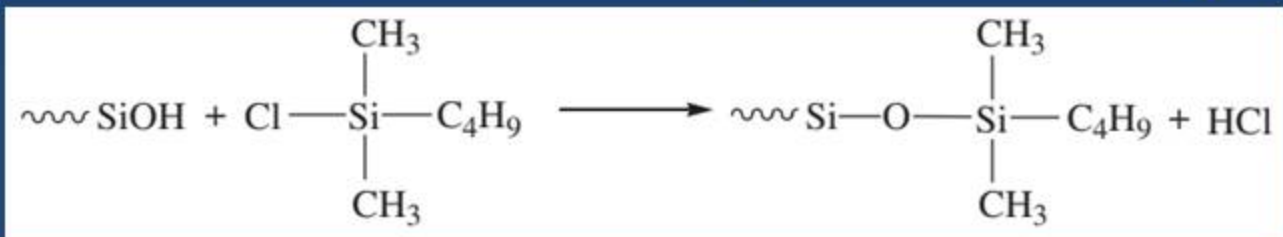


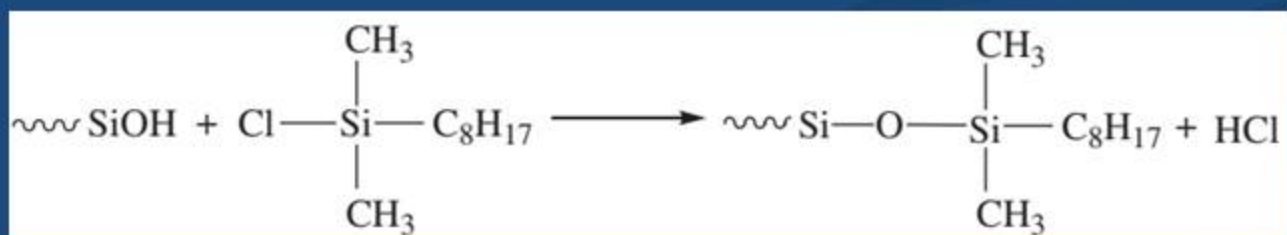
Figure 22.10. Stationary phase silica particle coated with reversed phase hydrophobic phase. The coating would actually be a complete coverage of the sphere in all directions. (Ham & MaHam, 2024)

Phase stationnaire	HPLC en phase normale Polaire	HPLC en phase normale Apolaire
Phase Mobile (Mode Gradient)	Gradient de + en + Polaire	Gradient de + en + Apolaire
Elution des Composés	Les + en + Polaires sont élués en Dernier	Les + en + Apolaires sont élués en Dernier

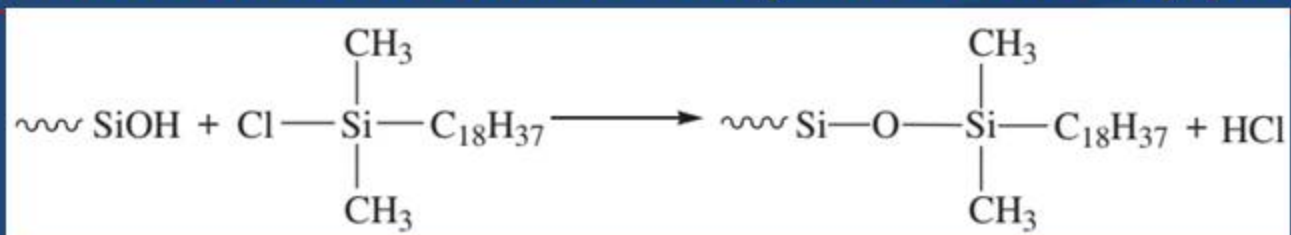
(a) Production of C-4 reversed-phase stationary phase



(b) Production of C-8 reversed-phase stationary phase



(c) Production of C-18 reversed-phase stationary phase



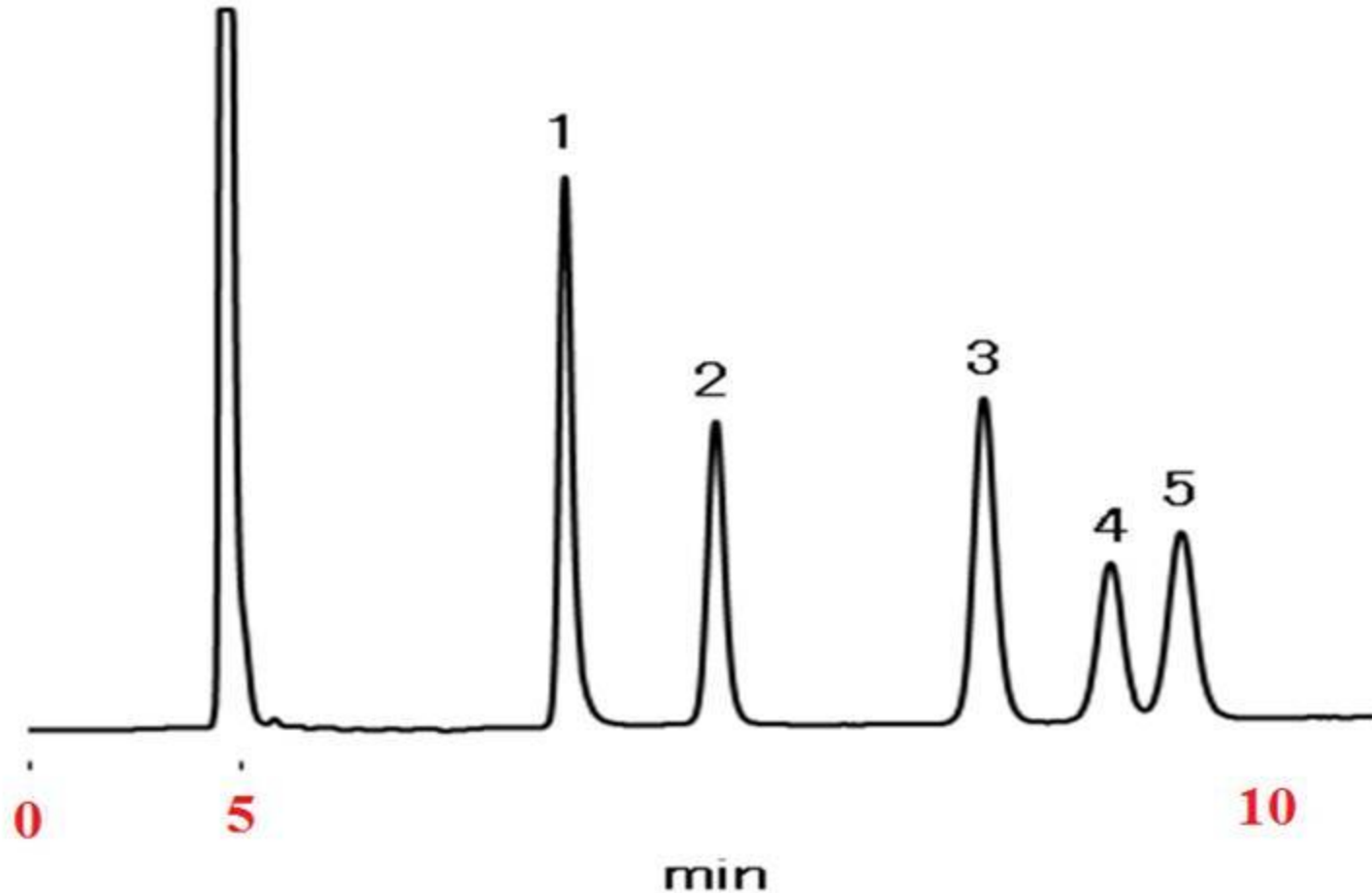
5. Détecteurs Mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne :

- ❖ **Photomètre ;**
- ❖ **UV-Visible ;**
- ❖ **Réfractomètre ;**
- ❖ **Détecteur fluorimétrique ;**
- ❖ **Détecteur électrochimique ;**
- ❖ **Conductimètre ;**
- ❖ **Diffusion de lumière.**

5. Exemples : *HPLC des Glucides* (6) *Dr Laib*

A column for saccharides analysis

(sahipak NH2P-50 4E)



Sample : 0.5 %
each, 10 μ L

1. Fructose
2. Glucose
3. Sucrose
4. Lactose
5. Maltose

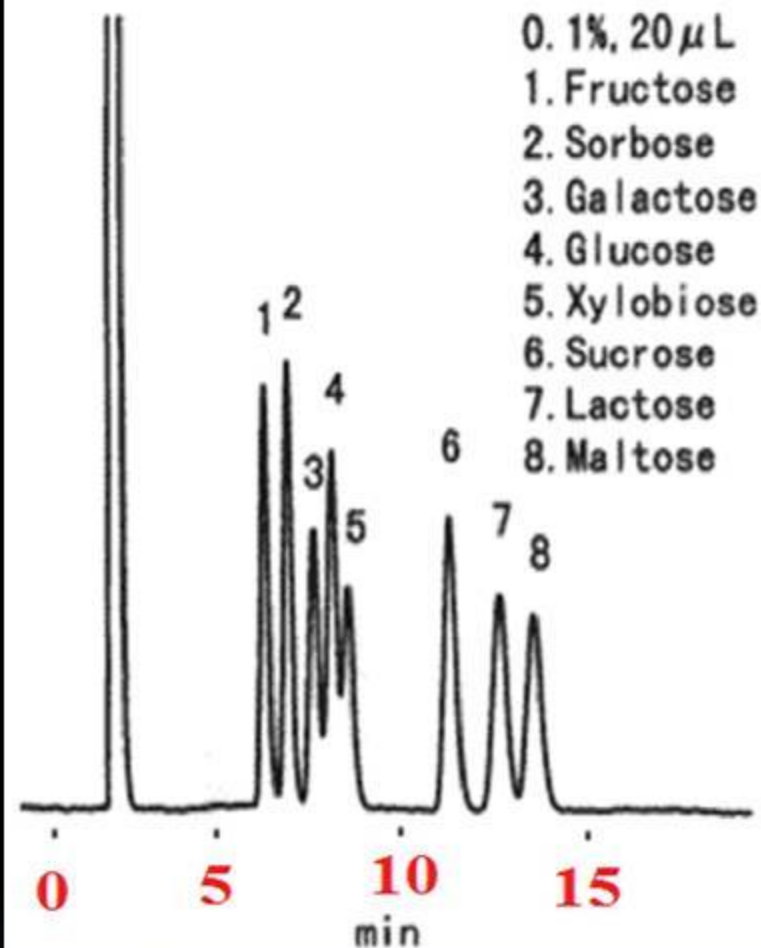
Column : ShodexAsahipak NH2P-50 4E (4.6 mm I.D. x 250 mm)

Eluent: $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}=25/75$

Flow rate: 0.6 mL/min

Detector : UV-Vis

Column temp.: 30 $^{\circ}\text{C}$



Glucide	Time	Area	Concentration
Fructose	5.78	24715776	43.7669
Glucose	6.25	12.317003	22.6511
Saccharose	7.04	8.0003512	15.0194

Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse (**CPG**) est une méthode **physique** qui permet de séparer les constituants d'un **mélange gazeux** par suite d'équilibres entre une **phase mobile gazeuse** et une **phase stationnaire**, qui peut être **liquide** (**partage**) ou **solide** (**adsorption**).

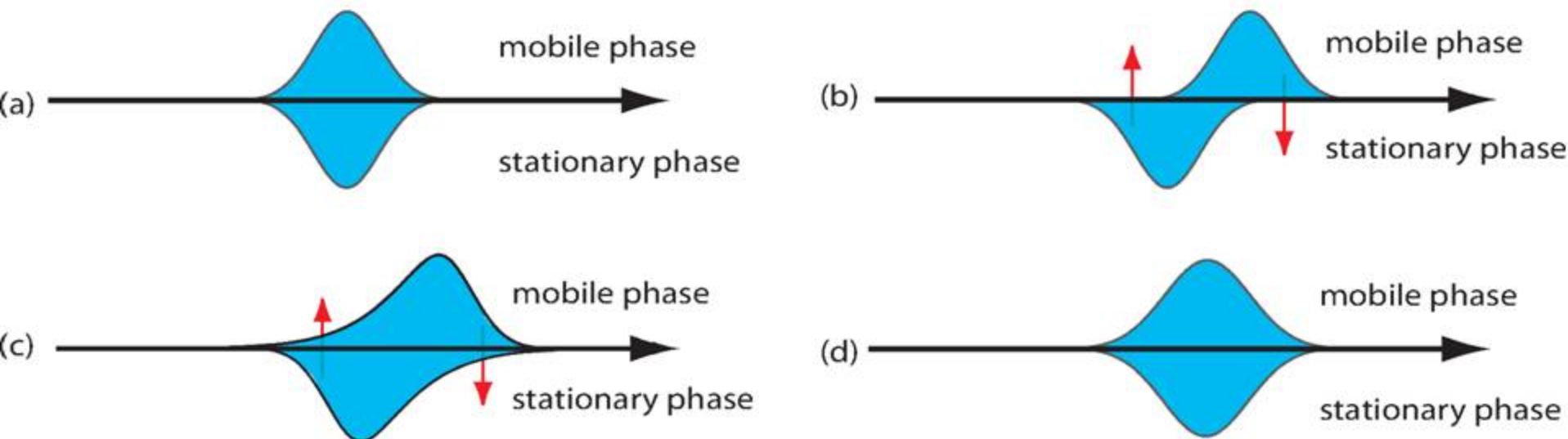
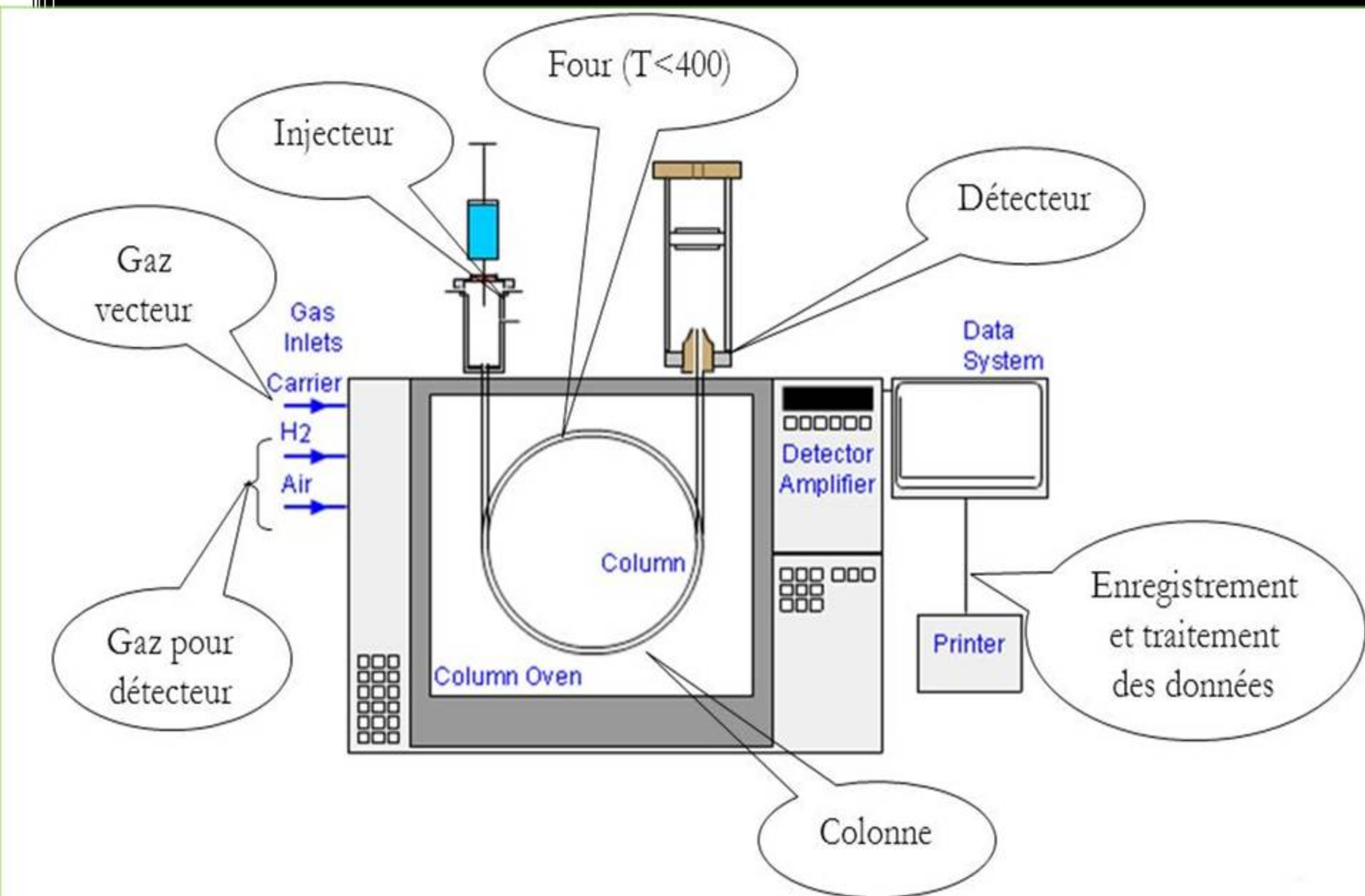


Figure 1. Effet du transfert de masse sur l'élargissement de bande : (a) **Profils gaussiens d'équilibre idéal** pour le soluté dans la phase mobile et dans la phase stationnaire. (b, c) Si nous laissons la bande du soluté se déplacer sur une petite distance vers le bas de la colonne, il n'existe plus d'équilibre entre les deux phases. Les flèches rouges montrent le mouvement du soluté – ce que nous appelons le transfert de masse du soluté – de la phase stationnaire à la phase mobile, et de la phase mobile à la phase stationnaire. (d) Une fois l'équilibre rétabli, la bande du soluté est désormais plus large.

Ce phénomène est dynamique, les molécules passant continuellement d'une phase à l'autre; ce qui crée un état d'**équilibre** entre la phase mobile et la phase stationnaire pour un constituant en particulier. À ce moment le rapport des concentrations est égal au rapport des répartitions dans les deux phases ou coefficient de partage **K**.

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad \text{où } \begin{array}{l} C_s = \text{concentration dans la phase stationnaire} \\ C_m = \text{concentration dans la phase mobile} \end{array}$$



1. Gaz vecteur

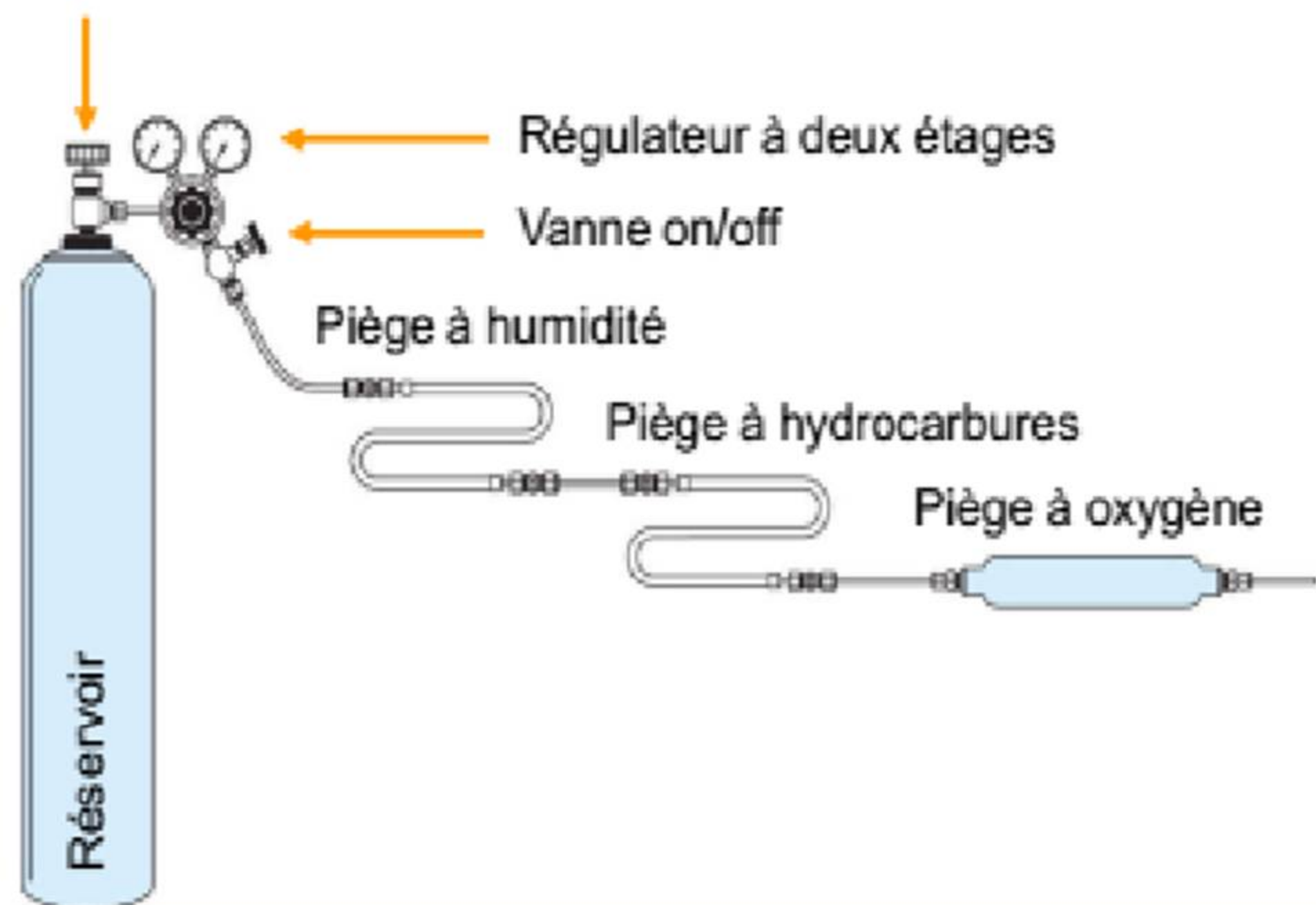
Le gaz est contenu dans des bouteilles munies de **manomètres**.

Il circule dans la colonne à **débit constant**, il doit répondre à certaines qualités :

- Faible viscosité ;
- Grande pureté (**filtres séchant et réducteur**)
(**> 99,9995 %**) ;
- Inertie vis à vis de l'échantillon et de la phase stationnaire ;
- Compatibilité avec le détecteur.

Les principaux gaz utilisés :

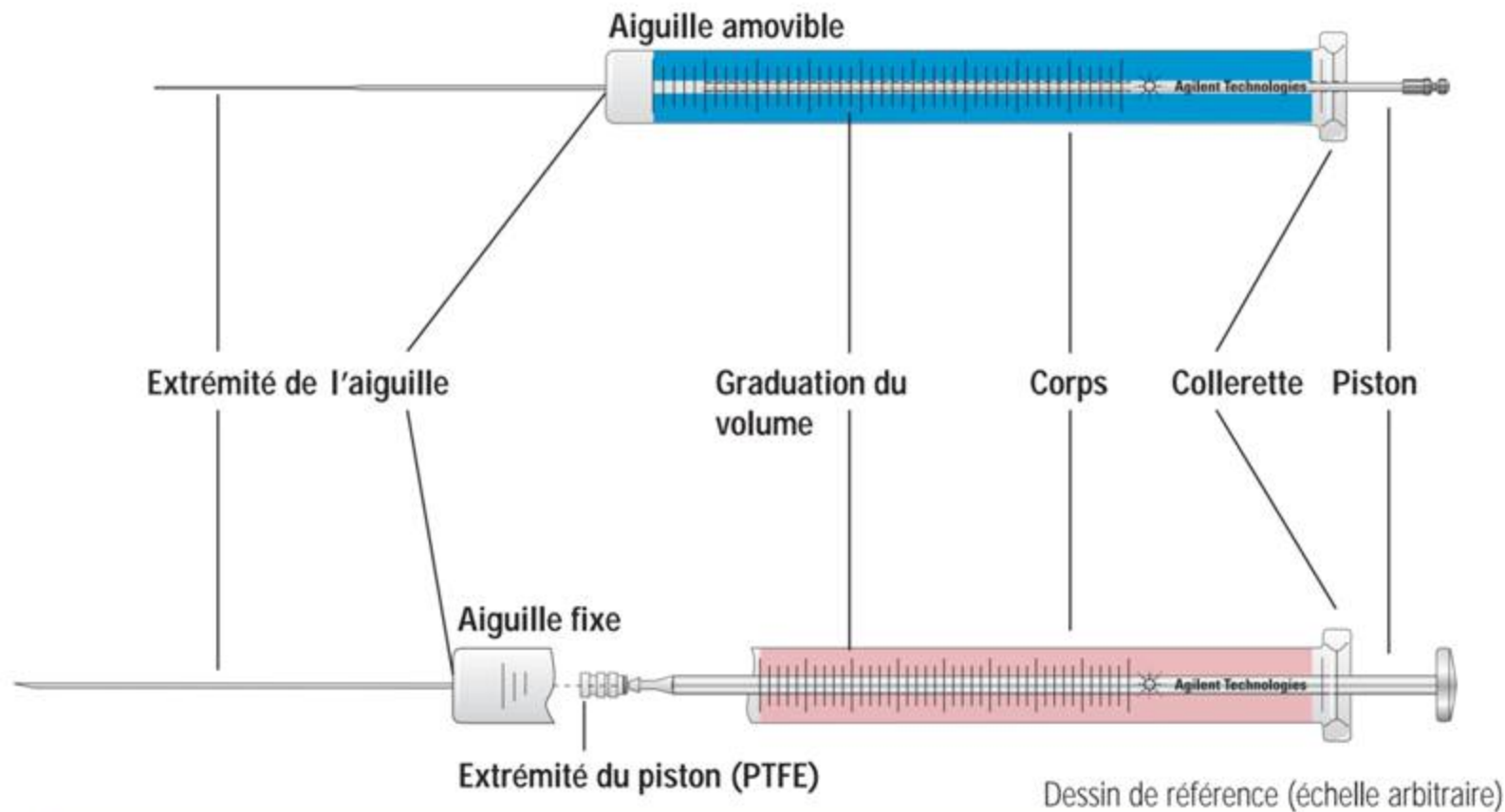
- l'azote (N_2) ;
 - l'argon (Ar) ;
 - l'hélium et (He) ;
 - l'hydrogène (H_2).
-
- H_2 ou He pour les catharomètres ;
 - N_2 , H_2 ou He pour les FID ;
 - N_2 ou Ar/CH_4 pour les ECD.



2. Seringues

Seringues pour
échantillonneurs
automatiques

Caractéristiques de la seringue



Pour injecter manuellement ou automatiquement, il y a **deux points clés** pour choisir la **seringue adaptée** :

- Qualifier le type d'échantillon ;
- Déterminer le plus petit volume à pipeter ou injecter.

Seringues manuelles à code couleur

La couleur exprime le volume.

Couleur
du corps

Volume

Dr Laib



0.5 µL



1.0 µL



2.0 µL



5.0 µL



10 µL/1.0 mL



25 µL/2.5 mL



50 µL/5.0 mL



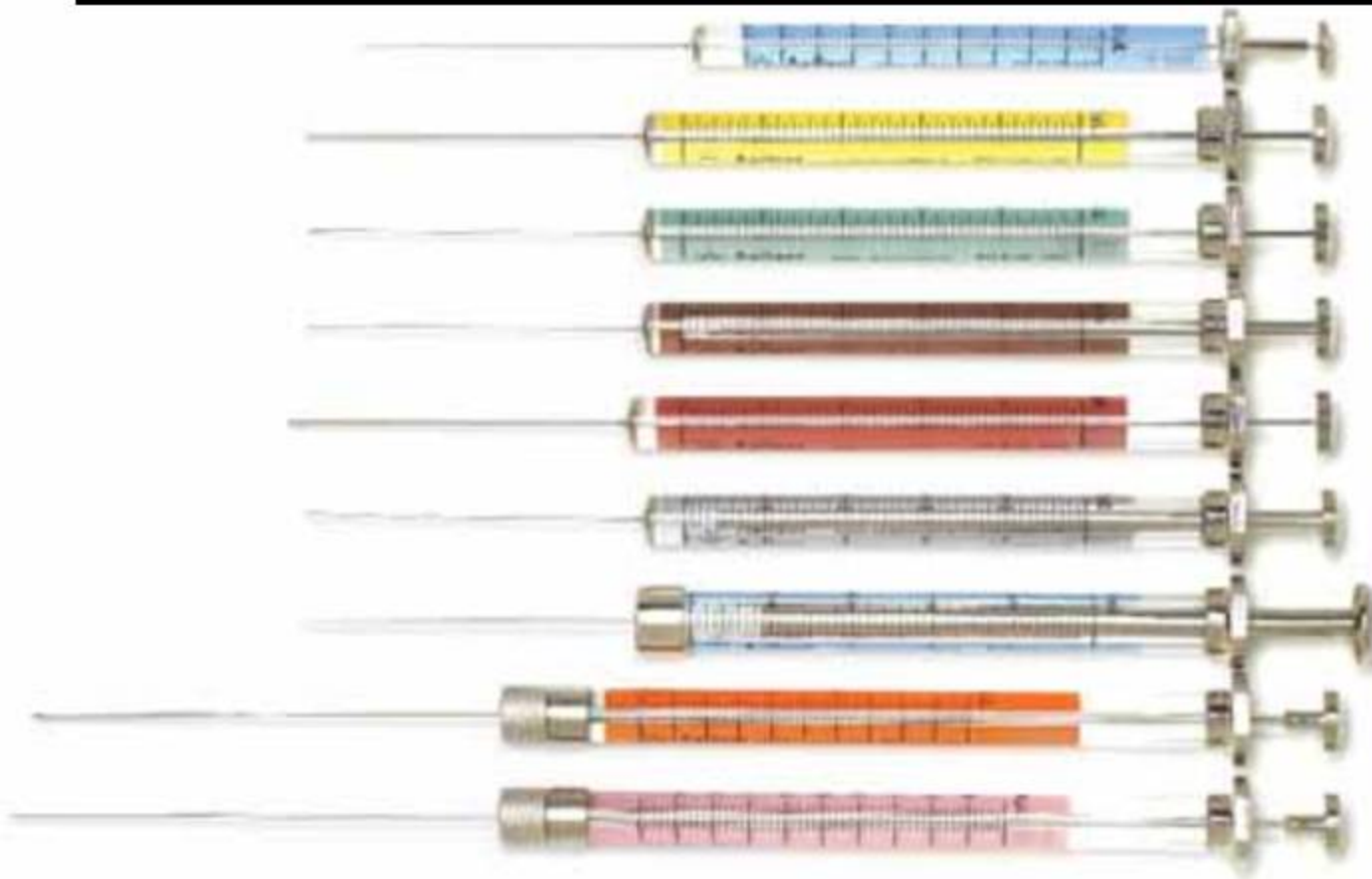
100 µL/10.0 mL



250 µL/25.0 mL



500 µL/50.0 mL



3. Injecteurs

- L'injection dans toute colonne de chromatographie doit répondre aux **2 impératifs** :
- Représenter une **quantité suffisamment petite** pour ne pas surcharger la colonne, mais **suffisamment grande** pour fournir une réponse au **détecteur** ;
- Représenter une **durée brève** pour ne pas **élargir les pics**. L'injection doit se faire dans la plus petite fraction possible de la longueur de colonne ;

Pour les molécules plus volatiles, il reste le choix de l'injection par division (**split**) où seule une fraction de l'échantillon est analysée ; il faut alors savoir qu'il existe un **risque** de **ségrégation** entre les molécules lors de l'utilisation d'un diviseur.

- Ce phénomène est évité en utilisant un injecteur « **On-column** ». Son principe est basé sur le **dépôt liquide** de l'échantillon dans la colonne. Dans ce cas, toute la partie d'injection est refroidie en permanence par une circulation d'eau ou d'air.
- Le **développement** de système de température de vaporisation programmée est appliqué principalement aux injecteurs **split/splitless**. Les avantages et les inconvénients de ces différents systèmes sont résumés dans le tableau suivant :

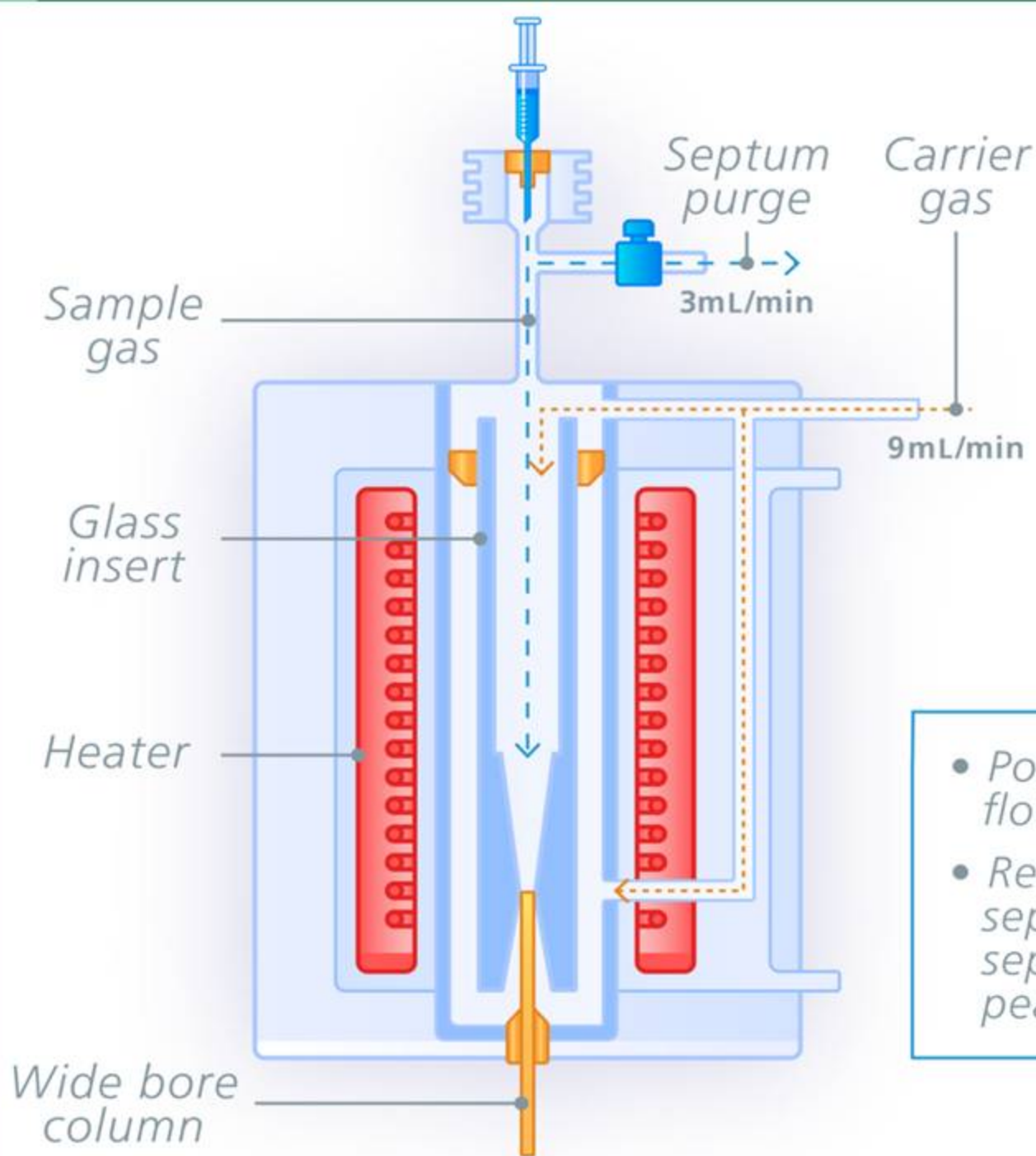
Tableau. Comparaison des différents systèmes d'injection.*Dr Laib*

Mode d'injection	Avantages	Inconvénients
Injection directe	Simple Faible quantité d'échantillon Analyse de traces	Pollution de la colonne avec risque de surcharge
Injecteur split	Adapté pour tous les types d'échantillons Bande d'injection étroite	Reproductibilité liée à la nature de l'échantillon
Injecteur splitless	Adapté pour l'analyse quantitative de traces Peu de discrimination	Choix limité de solvants et de température
Injecteur on-column	Adapté pour l'analyse quantitative Pas de discrimination	Pollution de la colonne

a. Injecteur par Vaporisation Directe

Pour les colonnes remplies et les colonnes capillaires 530 μm , qui nécessitent un débit de gaz de plus de 10 ml/minute, la méthode à « vaporisation directe » est simple. Tous les modèles dérivent d'un même montage de base correspondant à un tube métallique doublé d'un chemisage de verre (**Insert**), balayé par le gaz et chauffé à la température moyenne d'ébullition des composés à chromatographier.

L'une des extrémités de l'injecteur est **obturée** par une **pastille d'élastomère siliconé (Septum)** pour permettre le passage de l'aiguille de la **micro-seringue**, l'autre extrémité est raccordée à la **colonne**. La totalité de l'**échantillon** est introduit dans la **colonne** en **quelques secondes**.

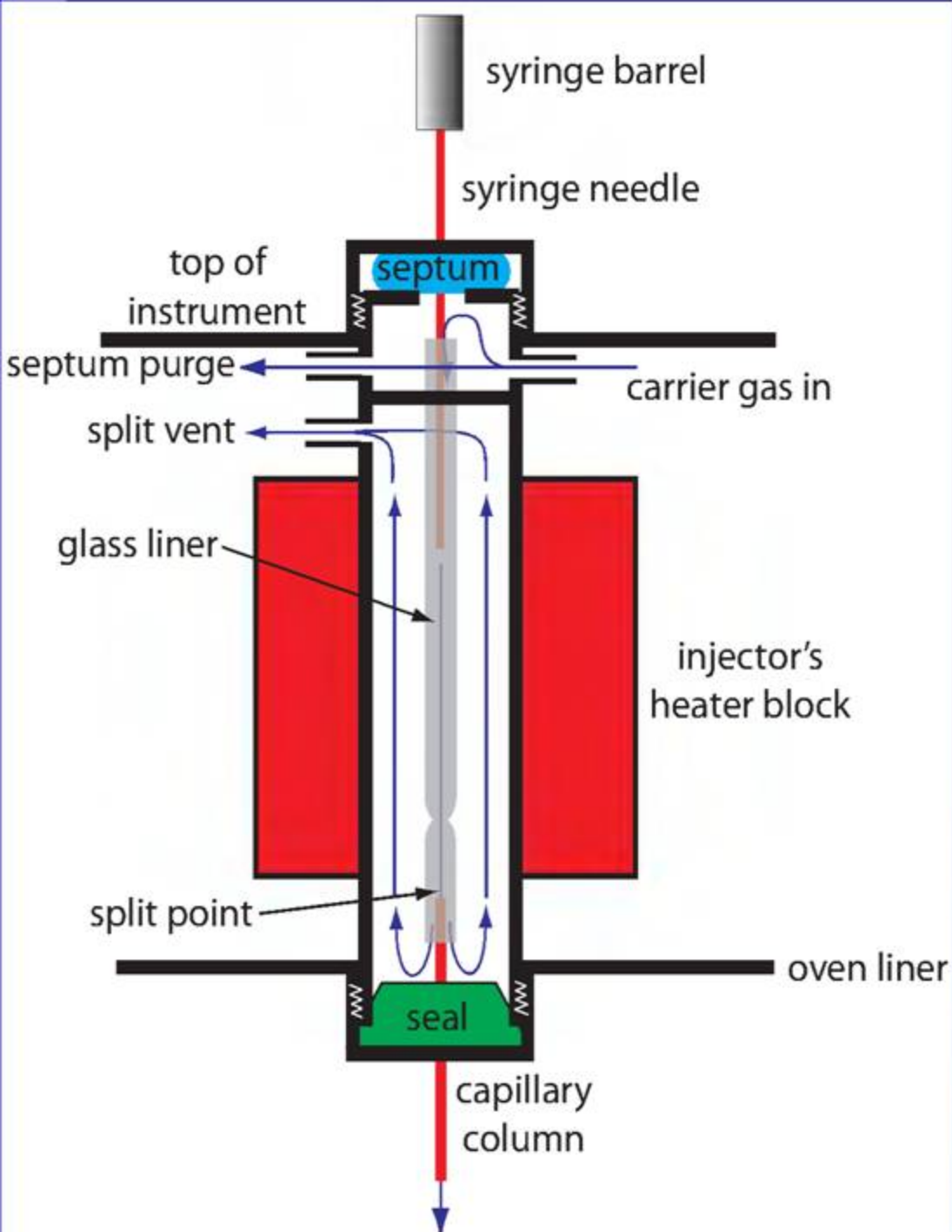


- Possible to set suitable flow rate for separation
- Reduce ghost peak from septum and improve separation with solvent peak

b . Injecteur « split/splitless »

Pour les **colonnes capillaires** à **faible débit**, les **plus petits volumes** introduits avec la **micro-seringue** peuvent **saturer** la **colonne**. Des injecteurs pouvant fonctionner suivant **deux modes** sont utilisés, **avec division (split)** ou **sans division (splitless)**

La **température** de l'**injecteur** doit être **supérieure** d'**environ 20 °C** à la **température** du **produit le moins volatile**. Le **volume injecté** est faible (**quelques microlitres**).



Dr Laib
L'aiguille perce un **septum en caoutchouc** et pénètre dans un **revêtement en verre** situé à l'intérieur d'un **bloc chauffant**.

Dans une **injection fractionnée**, l'évent divisé est **ouvert**, l'évent divisé est **fermé** pour une **injection sans Division**.

b.1. Injection Split

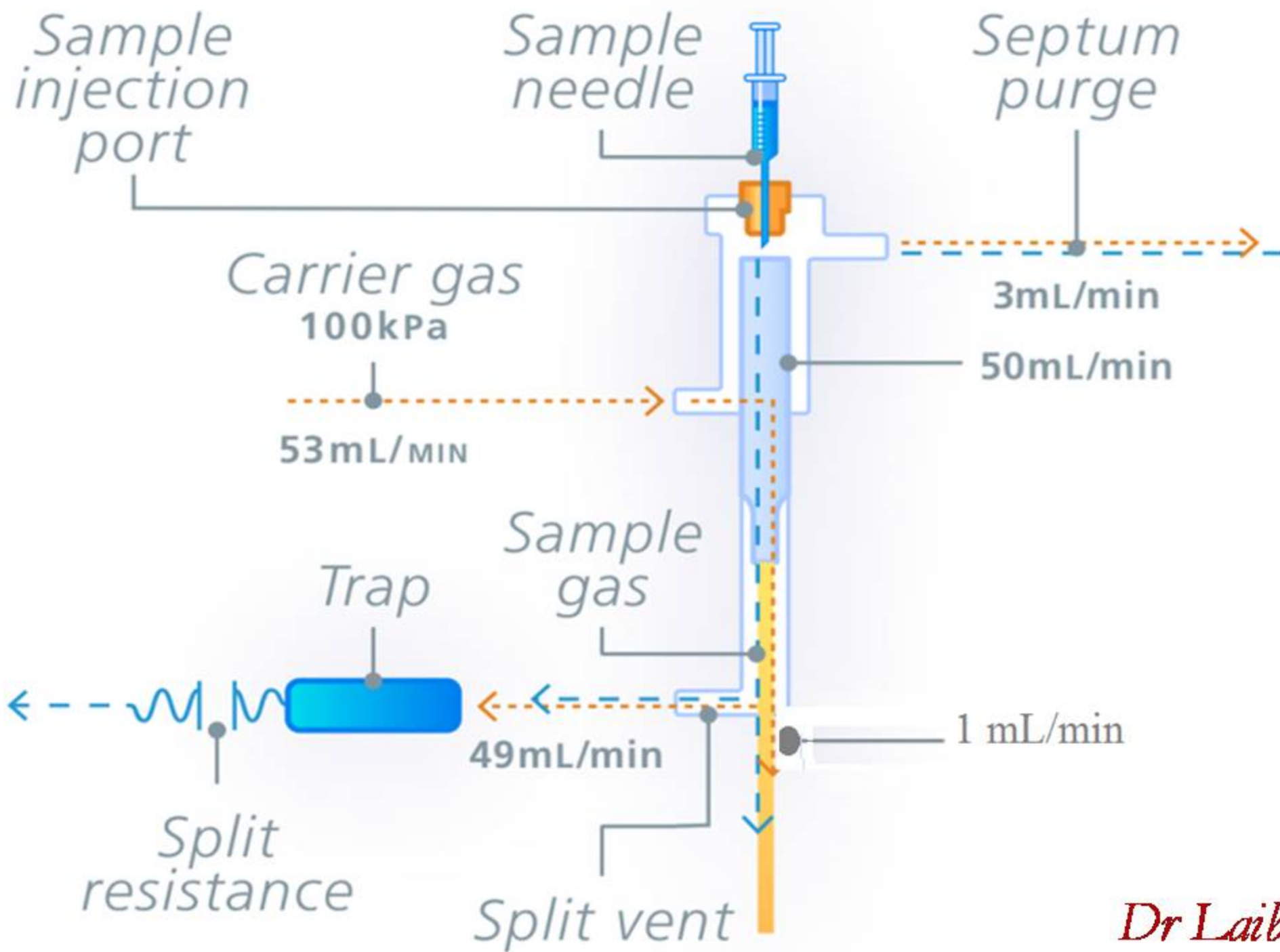
Lors d'une injection fractionnée, nous injectons l'échantillon à travers un septum en caoutchouc à l'aide d'une micro-seringue. Au lieu d'injecter l'échantillon directement dans la colonne, il est injecté dans un revêtement en verre où il se mélange au gaz vecteur.

Le gaz arrive avec un grand débit dans la chambre de vaporisation.

Au **point de division**, une **vanne de fuite** sépare le **courant gazeux** (du gaz porteur et de l'échantillon) en **2 parties** dont la **plus petite fraction** est la **seule** à entrer dans la **colonne capillaire**, le reste sortant par l'**évent divisé**.

Un **dispositif** règle le **débit de fuite** (généralement entre **50 et 100 ml/minute**) ; en contrôlant le débit du gaz porteur entrant dans l'injecteur et les débits à travers la **purge du septum** et l'**évent divisé**. Le **facteur de division (split)** varie entre **0.1 % et 10 %**.

Par exemple, si le **débit du gaz vecteur** est de **50 ml/min** et que les **débits de purge du septum** et de **ventilation séparée** sont respectivement de **2 ml/min** et de **47 ml/min**, le **débit à travers la colonne** est alors de **1 ml/min** = **(50 - 2 - 47)**. Le **rapport de l'échantillon entrant dans la colonne** est de **1/50**, soit **2 %**.



b.2. Injection splitless

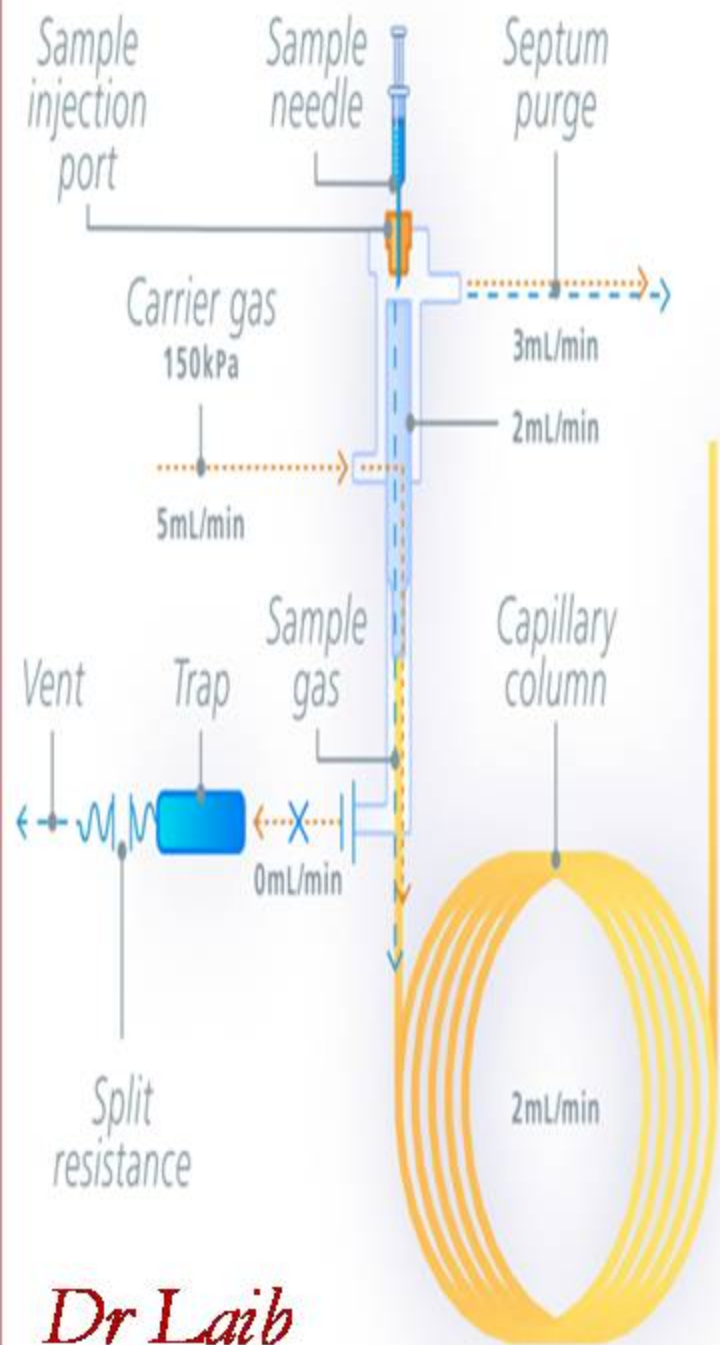
Dans une **injection sans division** qui est utile pour l'analyse des **traces**, nous fermons l'évent divisé et permettons à pratiquement tout le gaz porteur passant à travers le revêtement en verre d'entrer dans la **colonne**, ce qui permet à pratiquement tout l'échantillon d'entrer dans la **colonne**. Etant donné que le débit à travers l'injecteur est faible, un élargissement significatif de la bande de la pré-colonne constitue un problème.

Maintenir la température de la colonne à environ 20-25 °C en dessous du point d'ébullition du solvant permet au solvant de se condenser à l'entrée de la colonne capillaire, formant ainsi une barrière qui emprisonne les solutés. Après avoir laissé les solutés se concentrer, la température de la colonne est augmentée et la séparation commence.

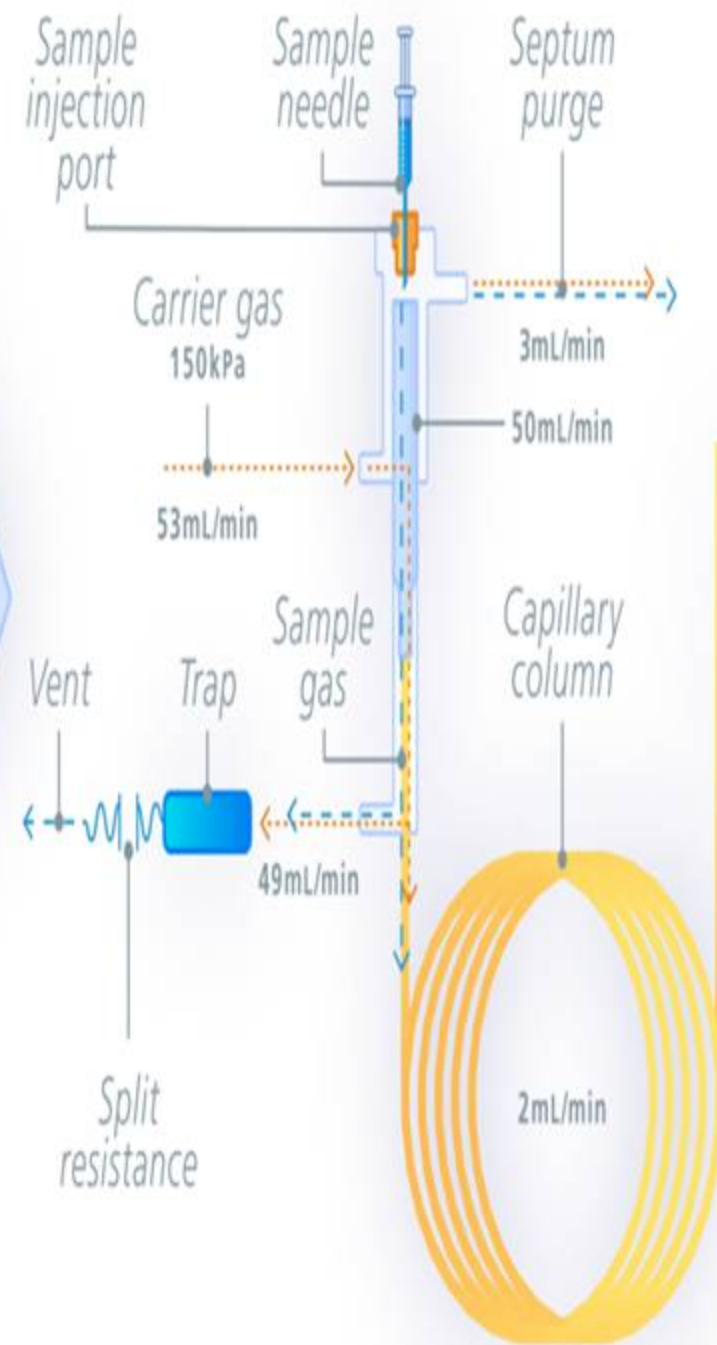


Le mode splitless sur colonne capillaire est réservé
aux échantillons en **solution très diluée**.

Les **colonnes capillaires remplies** ou « **Wide bore** »
peuvent être connectées à ce type d'injecteur.

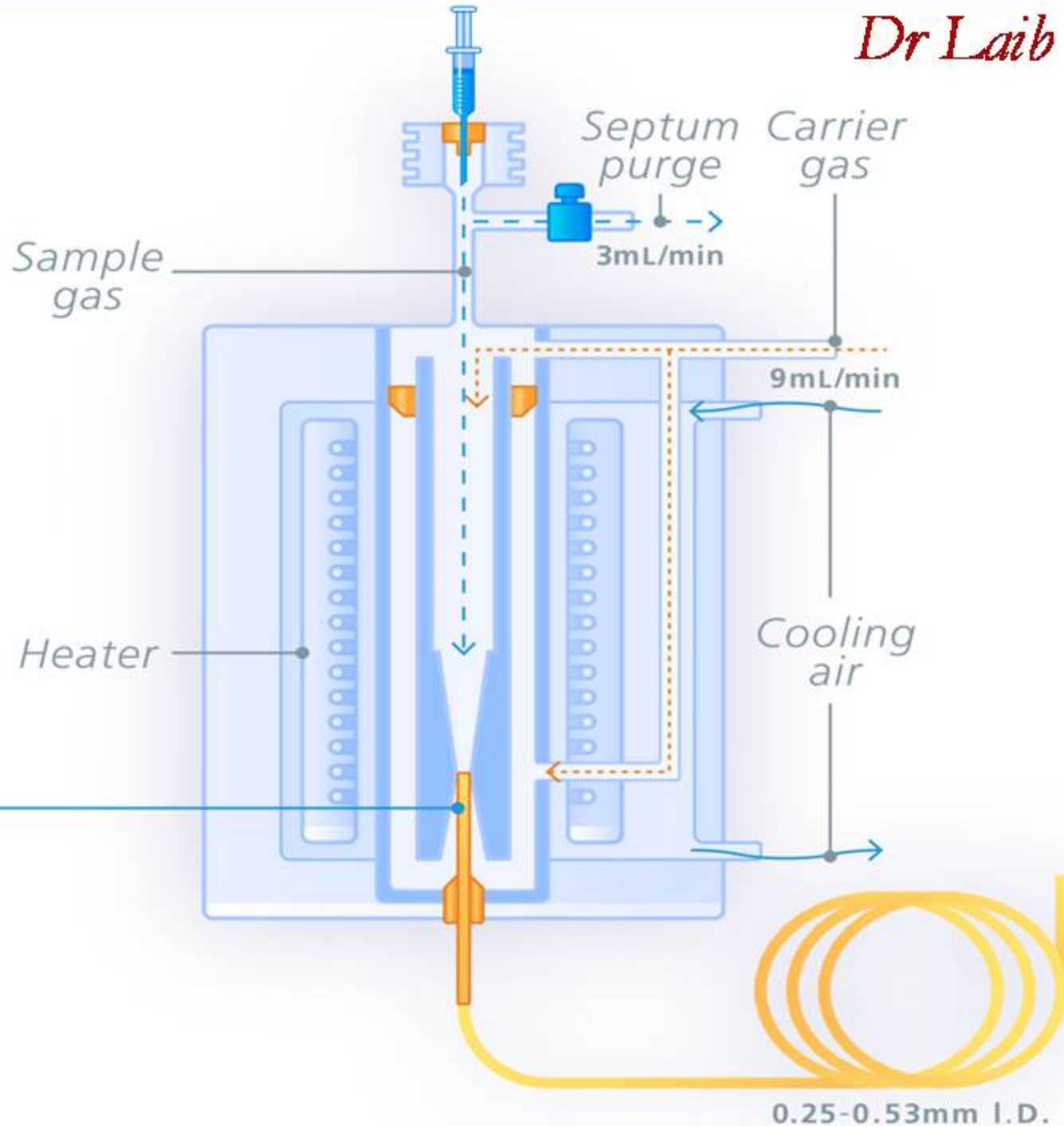


1~2 minutes



c. Injecteur « **Cold On-column** »

Ce dernier procédé consiste à injecter lentement l'échantillon, à froid, directement à l'intérieur de la colonne capillaire «**On-column**», sa vaporisation se faisant après dépôt (évitant ainsi les processus de vaporisation à haute température qui peuvent affecter de façon irréversible les résultats quantitatifs). Un refroidissement permanent du corps de l'injecteur par air froid empêche la vaporisation dans l'aiguille.



L'usage d'une micro-seringue spéciale est nécessaire. L'aiguille (acier ou silice), dont le diamètre est de l'ordre de 0,15 mm, pénètre à l'intérieur d'une pré-colonne (ou d'une colonne) refroidie vers 40 °C, avant de reprendre sa température normale.

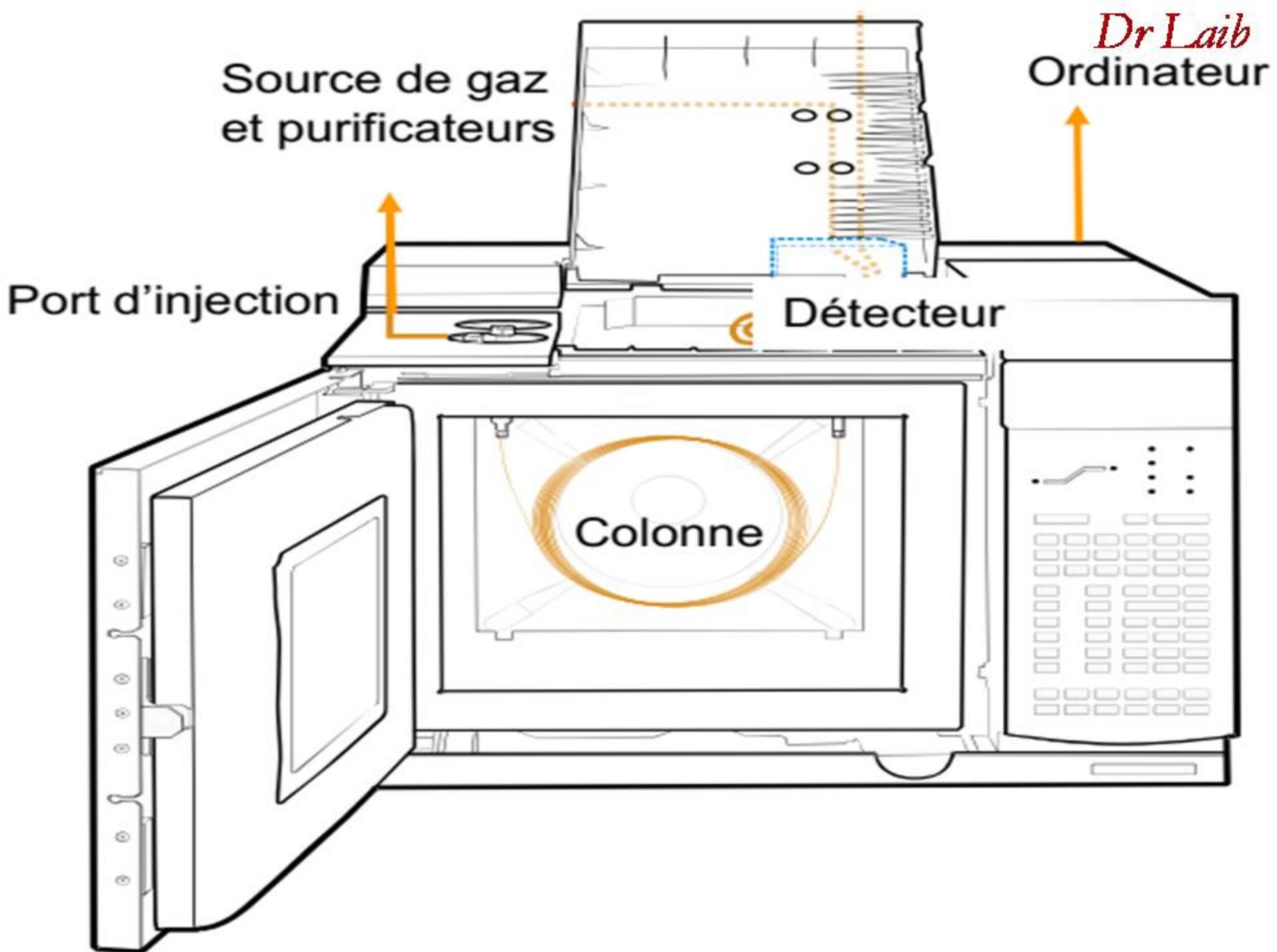
Ce procédé, utile pour les **composés fragiles** (applications en biochimie) mais difficile à maîtriser sans injecteur automatique, est réputé pour :

- Ne pas provoquer de discrimination entre les composés de volatilité différente ;
- **Éliminer les risques de décomposition** ou de **dégradation thermique** tout en permettant l'**utilisation de solvants très volatils** ;
- **Limiter la perte d'efficacité** en **prévenant l'éjection des échantillons vers l'arrière** et donc l'**élargissement des pics**.

4. Composés concernés

- Molécules volatiles naturellement ;
- Composés gazeux ;
- Molécules susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décompositions ;
- Composés qui, par des réactions de dérivation, sont rendus volatils à des températures ne provoquant pas leur décomposition.

5. Four



- La colonne se trouve dans un **four régulé**.
- L'échantillon vaporisé est transporté vers la colonne par le gaz vecteur. Les composés se répartissent sélectivement entre la phase stationnaire (**revêtement**) et la phase mobile (**gaz vecteur**).

- La **température** est un paramètre important. Elle joue un **rôle** sur la **rétention**, la **sélectivité**, l'**efficacité**;
- La **rétention augmente** quand la température diminue ;
- la **sélectivité diminue** avec la température ;
- La **séparation est meilleur** à basse température.
- **Isotherme** : la **température** est **constante** tout au long de l'analyse ;
- **Gradient** : Un **gradient de température** peut être appliqué au four pour **éluer tous les composés**.

- ❑ Pour les composés de même volatilité ;
- ❑ Rétention similaire ;
- ❑ Pour les composés dont la rétention diffère ;
- ❑ Mauvaise forme de pics ;
- ❑ Mauvaise sensibilité pour les composés fortement retenus ;
- ❑ Mauvaise séparation pour les composés dont $k < 2$;
- ❑ Pour les composés d'une série homologue la rétention varie de manière logarithmique.

- **Gradient** : Un **gradient de température** peut être appliqué au four pour **éluer tous les composés**.
 - **Température initiale faible** pour la séparation des composés à **bas point d'ébullition**
 - **Augmentation de la température** pour permettre l'**élution des autres composés** ;
 - Pour une **série homologue** la **rétenction** est **linéaire** avec la **température** ;

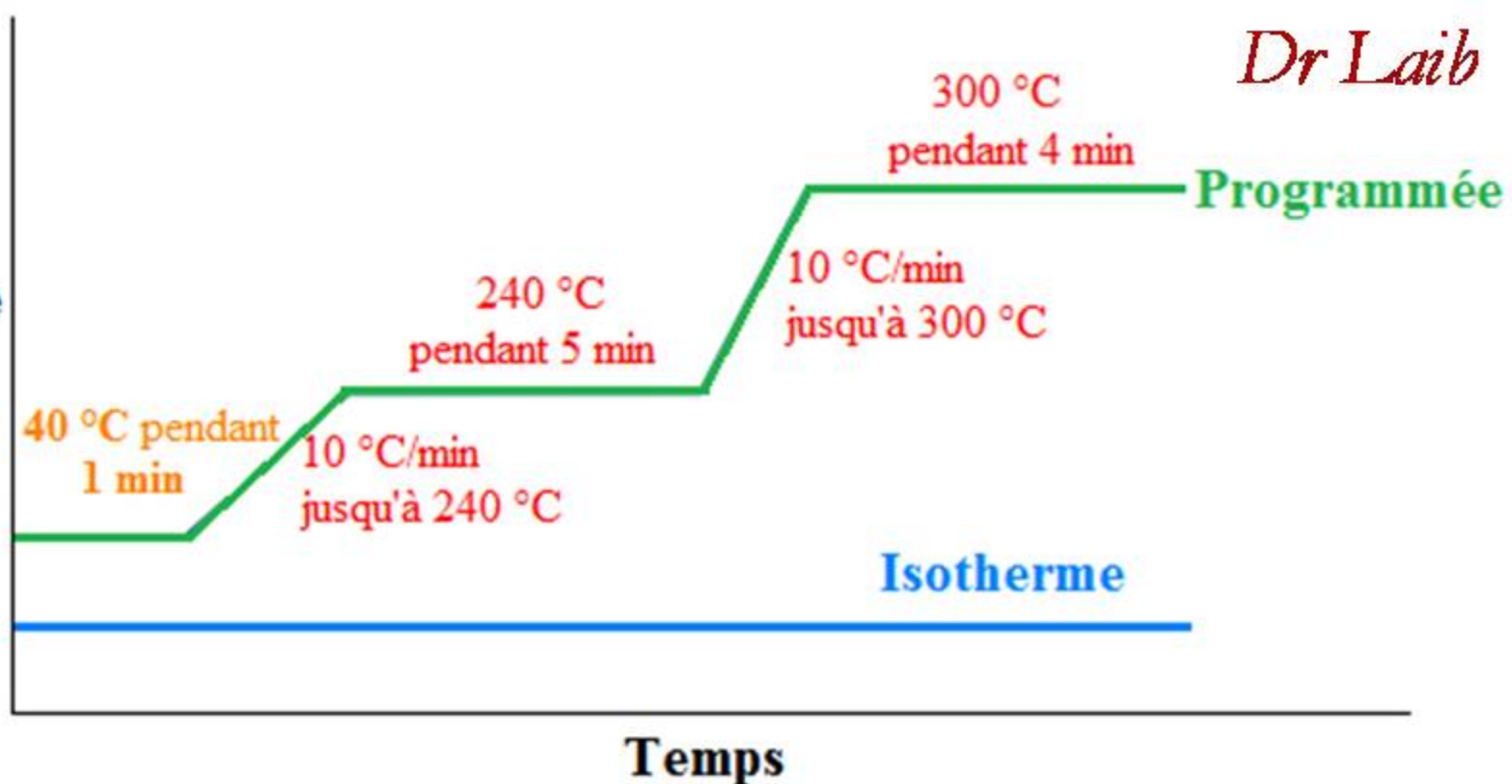
- Les composés sont élués avec à peu près la **même largeur de pic** ;
- La **sensibilité augmente** pour les **composés élués le plus tardivement**.

Théorie de la programmation de température

- ❖ En gradient de température la rétention est diminuée par 2 tous les 30 °C ;
- ❖ Les analytes sont initialement immobilisés en tête de colonne ;
- ❖ Ils stagnent jusqu'à ce que la température devienne compatible avec leur vaporisation et le partage dans la colonne ;

- ❖ Comme chaque analyte a une pression de vapeur propre, c'est le principal processus de séparation en gradient de température ;
- ❖ Une fois que le composé commence à être chromatographié, il accélère dans la colonne à la même vitesse que les autres analytes.

Température



Mise en place de la programmation

Une programmation classique est utilisée pour évaluer la nature de l'échantillon (gamme de volatilité, nombre de composés, adaptation de la phase, etc.).

En général on adopte la programmation suivante:

- La **température initiale** doit être **aussi basse que possible** ;
- Le **gradient** doit être de **10 °C/min** ;

- La **température finale** doit être **compatible** avec la **température limite** de la **colonne** ;
- Le **temps final** doit être de **10 min** pour permettre l'**élution** des **composés**.
- Si les **pics** éluent dans un **temps inférieur à 25 %** du **temps du gradient**, Il est possible de travailler en **isotherme**.

Avantages d'une programmation de température

- Utile pour découvrir la nature de l'échantillon ;
- Meilleure séparation pour des composés qui ont des rétentions différentes ;
- Amélioration de la limite de détection, la forme des pics et la précision ;
- Permet le nettoyage de la colonne ;
- Est nécessaire pour certains types d'injection **splitless**.

- ❖ Plus complexe ;
- ❖ Augmentation du bruit de fond ;
- ❖ Dégradation plus rapide de la colonne ;
- ❖ Analyse plus longues du fait du refroidissement de la température.

6. Colonne

Elles contiennent la **phase stationnaire**, et se présentent sous forme de **tubes fins enroulés**.

Il existe **2 types de colonnes** :

1. Les colonnes remplies

Chromosorb[®] ; Sphérosil[®] ; Porapak[®]

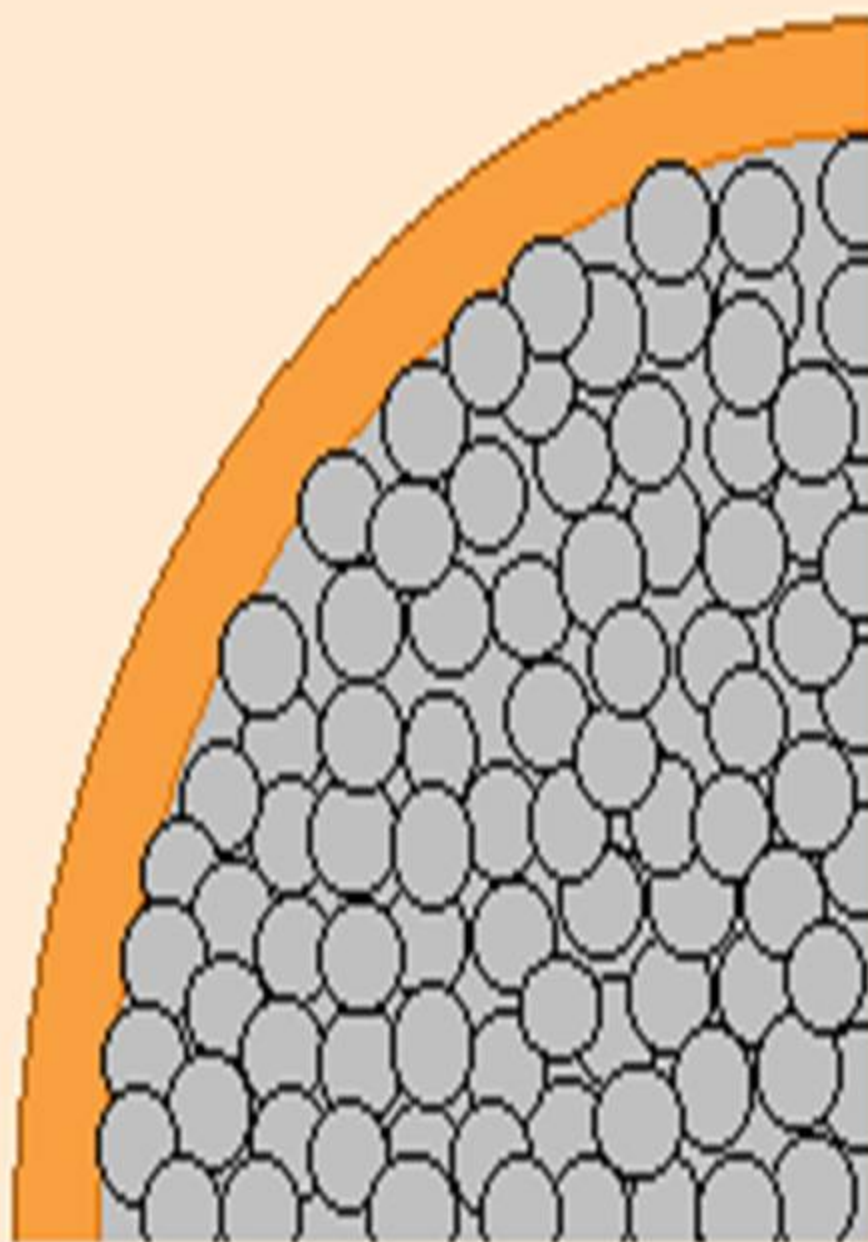
Diamètre de 2 à 6 mm et longueur de 1 à 3 m. Elles sont en tubes d'acier ou verre.

Elles sont **remplies** d'un support poreux et inerte sous forme de **grains sphériques** (**d'environ 0,2 mm de diamètre**) sur lequel est **imprégnée** la **phase stationnaire**.

Elles sont **moins résolutives** que les **colonnes capillaires** ;



colonne
capillaire



colonne
remplie

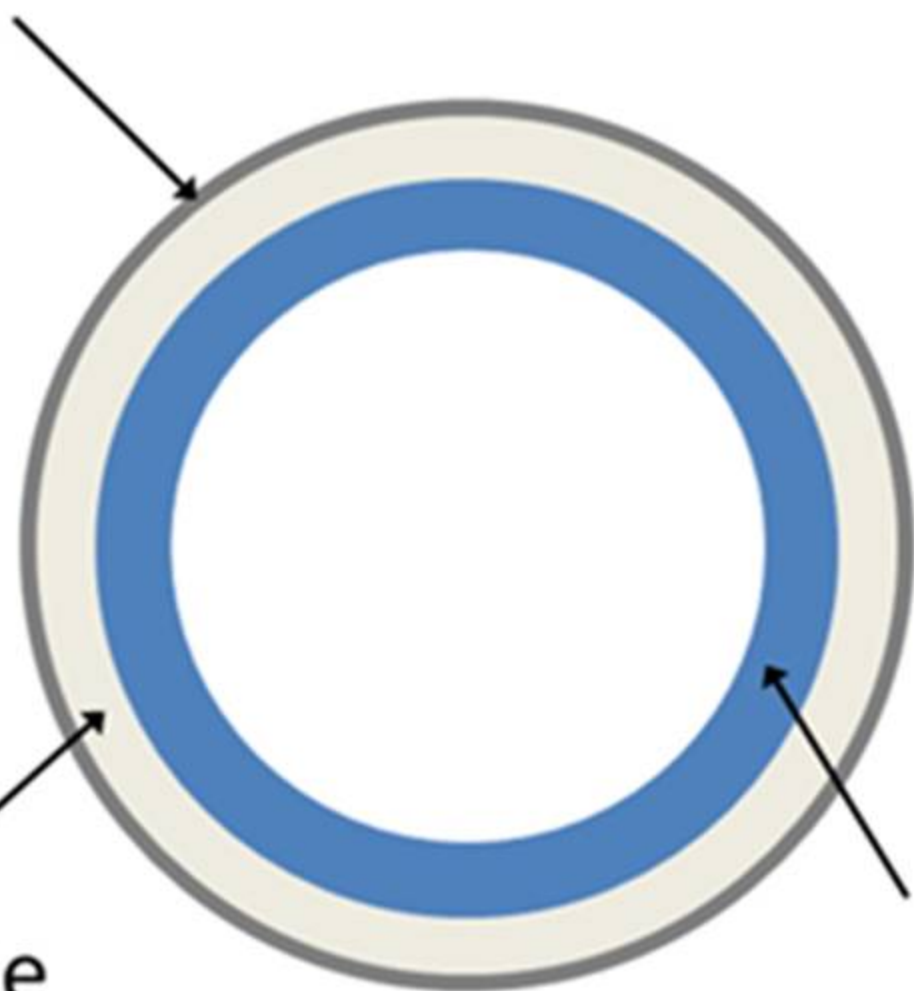
2. Les colonnes capillaires (à tube ouvert) *Dr Laib*

Diamètre de 0,1 à 0,53 mm et longueur de 10 à 100 m. Elles sont en **tube d'acier inoxydable** ou en **silice fondue** ;

La **phase stationnaire** est directement **déposée sur la paroi interne de la colonne** sur une **épaisseur de 0,05 à 5 μm .**

Revêtement en polyimide

Dr Laib



Phase
stationnaire

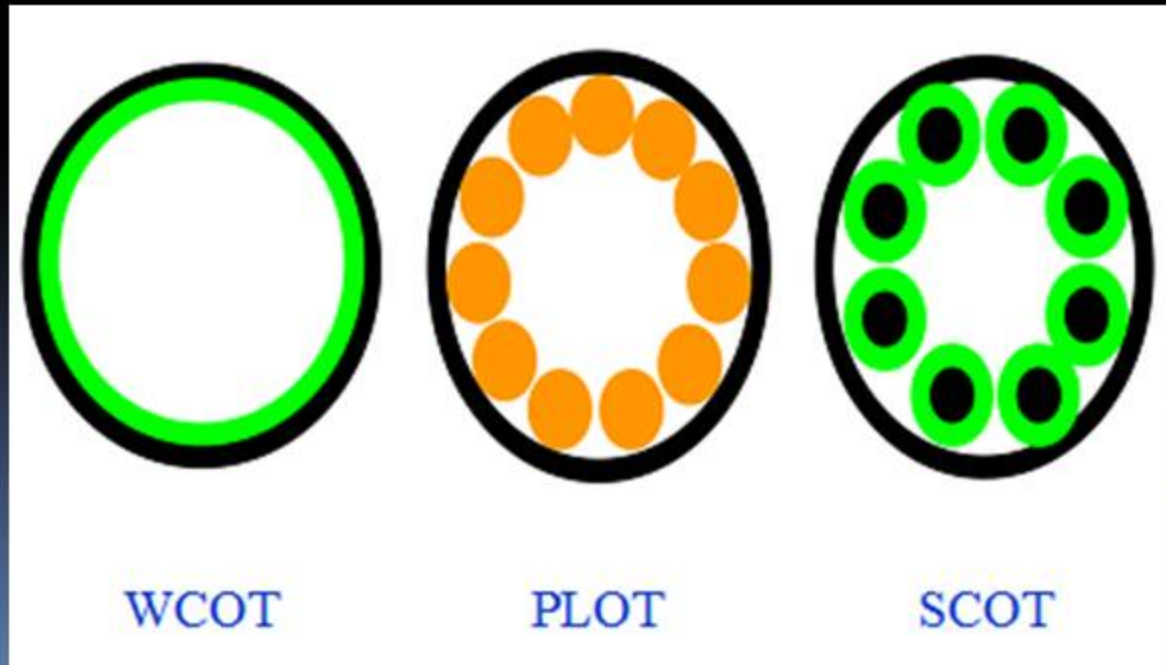
Silice fondue

On distingue les colonnes:

SCOT (Support Coated Open Tubular) : elle contient le support solide **recouvert** de la phase stationnaire liquide ;

WCOT (Wall Coated Open Tubular) : elle contient uniquement le film de la phase stationnaire = une pellicule liquide à l'intérieur du tube ;

PLOT (Porous Layer Open Tubular) : elle contient un solide poreux très finement divisé ; ce type de colonne **n'est pas adapté** pour les **huiles essentielles**, mais pour l'analyse des gaz, le phénomène mis en jeu est l'adsorption.



6.1. phase stationnaire

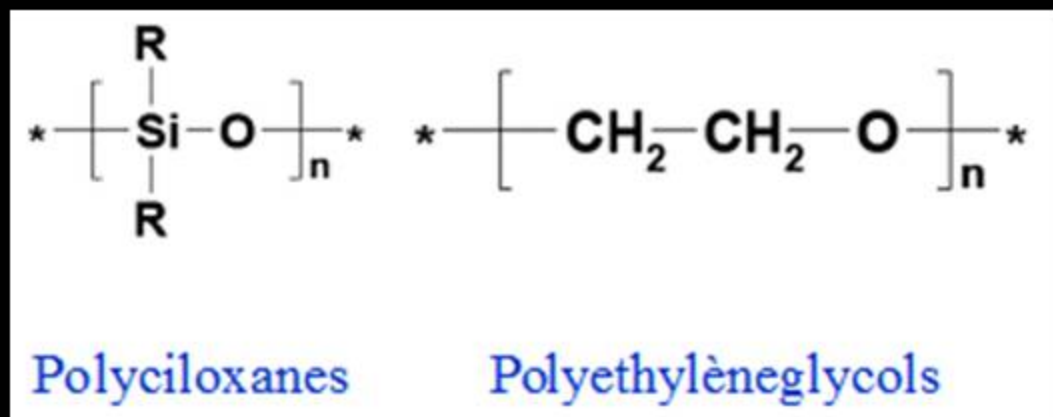
Choix de la phase stationnaire

Une phase **apolaire** retiendra d'autant plus un composé qu'il sera **apolaire** (et inversement), **Exemple : Squalane (apolaire) ; Carbowax (polaire)**

Une **phase apolaire** retiendra les **composés** dans l'ordre de leur **température d'ébullition (donc sortie des composés dans l'ordre de leur température d'ébullition croissante)**

Une **phase phénylée** retiendra mieux un **composé aromatique**.

Phases stationnaires liquides



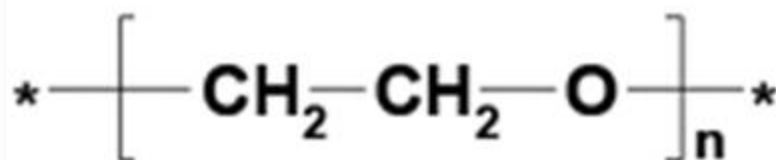
Différentes phases stationnaires

Les phases les plus courantes sont:

Les polyéthylèneglycols (PEG)

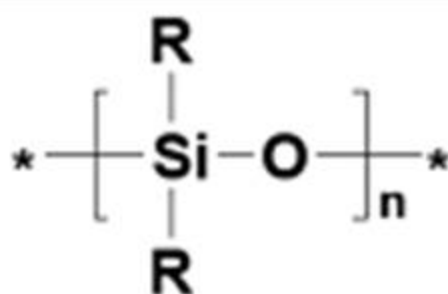
Les Polymères polaires (composés des colonnes

Carbowax[®]) de type:



Polyéthylèneglycols

Les polysiloxanes (« **huiles et gommages de silicones** ») correspondant à la **répétition** d'un motif de base de type:



Polyciloxanes

Suivant le pourcentage de groupement **R** par rapport aux groupes **CH₃**, on peut **modifier** la **polarité** de la colonne et donc ses propriétés en chromatographie.

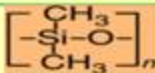
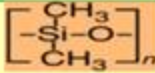
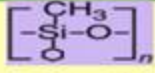
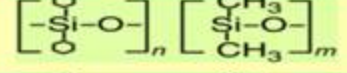
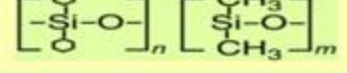
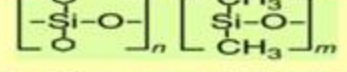
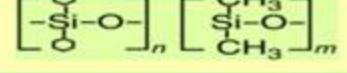
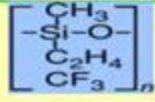
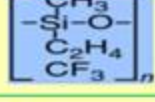
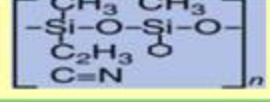
❖ Si **R= CH₃**, la colonne est **complètement apolaire** et **sépare** les **produits** suivant leur **point d'ébullition** (noms commerciaux : **DB-1, OV101, SE-30...**)

❖ Si le pourcentage de **R= Phényle** est égal à **5 %**, la colonne la plus utilisée en CPG, elle est répertoriée sous les noms commerciaux suivants: **DB5, CPsil5, OV5...**

❖ Si on incorpore un substituant cyanopropyle ($R = -CH_2-CH_2-CN$), la polarité augmente beaucoup (à cause du fort moment dipolaire du groupe $-CN$). Ce sont les phases DB 1701, CPSil 18...

Ces phases à base de **silicone** présentent **2 avantages** pour la CPG :

- Une **bonne inertie chimique**, elles ne réagissent ni avec les phases mobiles, ni avec les produits injectés ;
- Une **très bonne tenue à la température**, elles peuvent être **chauffées sans dommage** jusqu'à **300 °C**.

Name	Type	Structure	Solvent	Temp. limit (°C)
OV-1	Dimethylsilicone gum		Toluene	325–375
OV-101	Dimethylsilicone		Toluene	325–375
OV-3	Phenylmethyldimethylsilicone		Acetone	325–375
OV-7	Phenylmethylsilicone <i>Dr Laib</i>		Acetone	350–375
OV-11	Phenylmethylsilicone		Acetone	325–375
OV-17	Phenylmethyldimethylsilicone		Acetone	325–375
OV-61	Diphenyldimethylsilicone		Acetone	325–375
OV-73	Diphenyldimethylsilicone gum		Toluene	325–350
OV-22	Phenylmethyldiphenylsilicone		Acetone	350–375
OV-25	Phenylmethyldiphenylsilicone		Acetone	350–375
OV-105	Cyanopropylmethyl-dimethylsilicone		Acetone	275–300
OV-202	Trifluoropropylmethylsilicone		Chloroform	250–275
OV-210	Trifluoropropylmethylsilicone		Chloroform	275–350
OV-215	Trifluoropropylmethylsilicone gum		Ethyl acetate	250–275
OV-225	Cyanopropylmethylphenylmethyl silicone		Acetone	250–300
OV-275	Dicyanoallylsilicone		Acetone	250–275
OV-330	Silicone Carbowax copolymer		Acetone	250–275
OV-351	Polyglycolnitroterephthalic		Chloroform	250–275
OV-1701	Dimethylphenylcyano-substituted polymer		Acetone	300–325

Détecteurs

Le choix du gaz a trois conséquences directes sur le chromatogramme :

- Sensibilité du détecteur ;
- Efficacité de la colonne ;
- Forme des pics.

Le débit doit être parfaitement stabilisé même en cas de variations des conditions opératoires (programmation de température).

Détecteurs les plus courants

Dr Laib

Catharomètre

- Détecte des composés dont la conductivité thermique diffère du gaz vecteur

Détecteur à ionisation de flamme

- Détecte les composés qui brûlent ou s'ionisent dans une flamme

Détecteur à capture d'électron

- Détecte des composés capturant des électrons (par ex., composés halogénés)

Détecteur de composés azotés et phosphorés

- Détecte des composés contenant de l'azote et du phosphore

Détecteur à photométrie de flamme

- Détecte des composés contenant du soufre et du phosphore

Détecteur à émission atomique

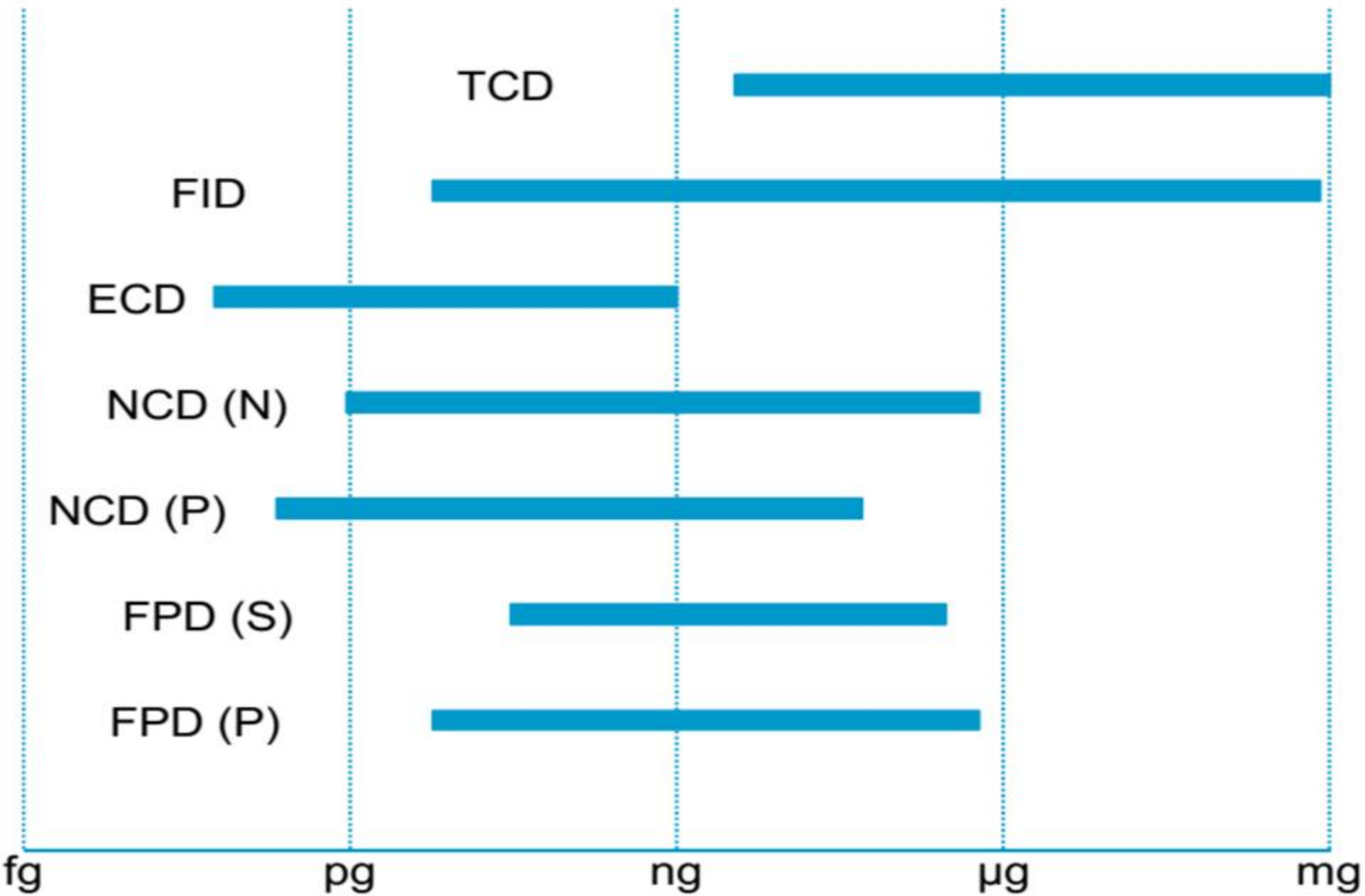
- Réglable pour de nombreux éléments

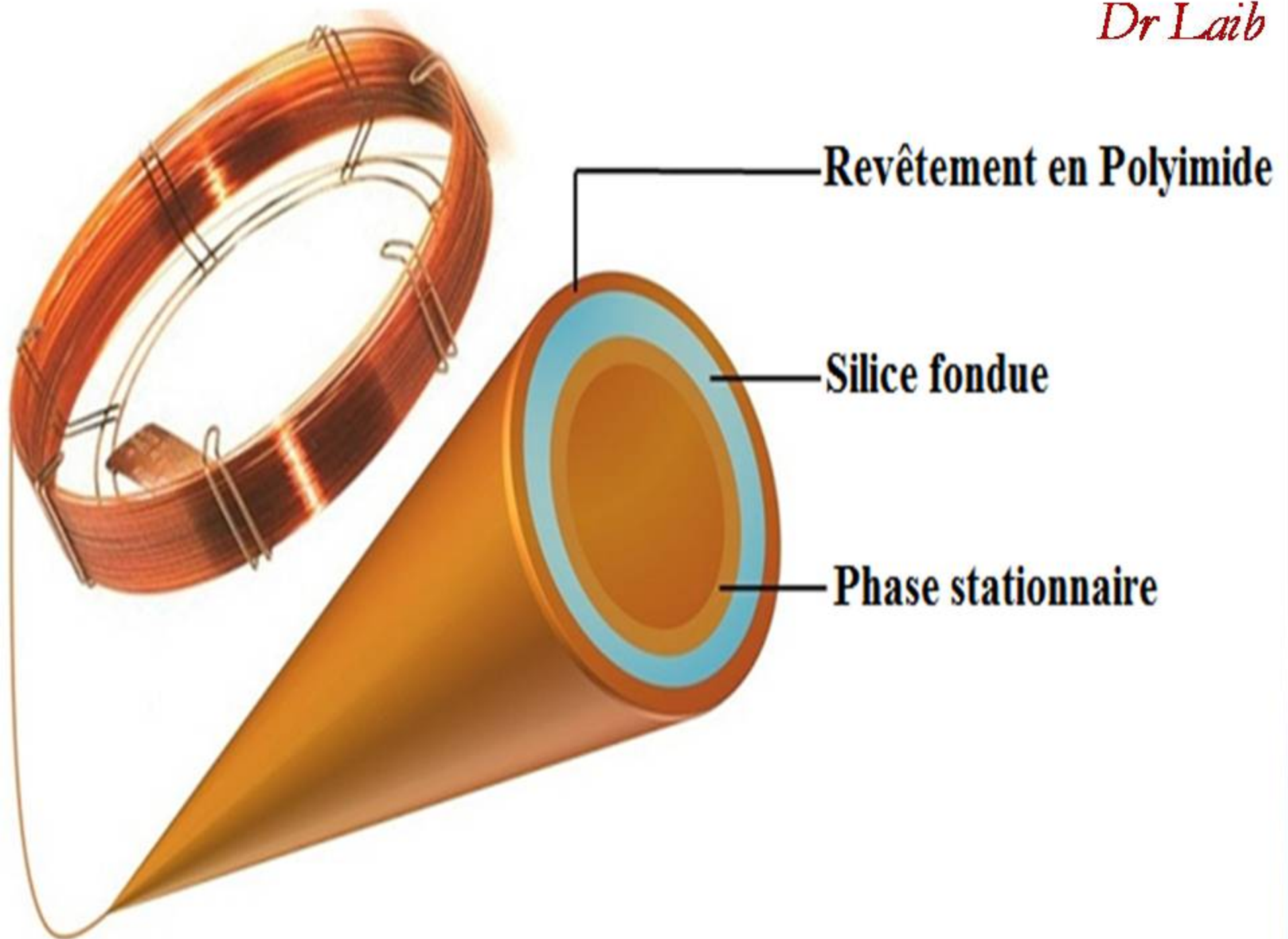
Détecteur de masse

- Identifie les composants à partir de leurs spectres de masse (outil d'identification le plus puissant actuellement disponible lorsqu'associé avec la GC)

Sensibilité des détecteurs

Dr Laib





À l'intérieur d'une colonne capillaire

Une colonne de GC capillaire est constituée par un tube étroit (**D.I. de 0,05 à 0,53 mm**) dont la surface interne est recouverte d'un revêtement mince en polymère (**0,1 à 10,0 μm**).

Il est critique de sélectionner la bonne colonne capillaire ; ce choix se fait d'après des facteurs comme la sélectivité, la polarité et la teneur en phényle.

Le **diamètre** de la colonne a un effet sur l'efficacité, la rétention de solutés, la pression de tête et le débit du gaz vecteur.

La **longueur** de la colonne a un effet sur la rétention de solutés, la pression de tête, le ressuage (**bleeding**) et le coût.

Domaine d'application

- Molécules volatiles (pression de vapeur notable en dessous de 250 °C) ;
- Dérivatisation pour augmenter la volatilité ;
- Masse moléculaire $< 500 \text{ g.mol}^{-1}$;
- Les molécules fortement polaires sont moins volatiles quand elles sont dans des solvants polaires (forces intermoléculaires).

Comparaison entre CPG & HPLC

Dr Laib

CPG

- Séparation en phase gazeuse
- Composés volatils et non thermolabiles
- Séparation à température élevée
- Sélectivité limitée
- Constante de diffusion élevée
- Viscosité faible

HPLC

- Séparation en phase liquide
- Indifférent
- Séparation à température ambiante
- Grande latitude d'ajustement des sélectivités
- Constante de diffusion faible
- Viscosité élevée