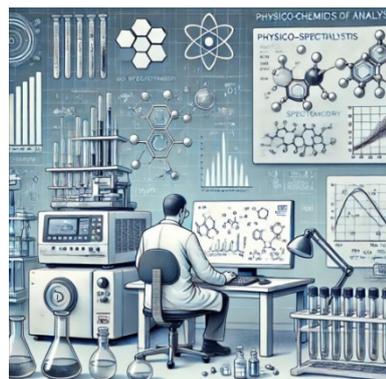


CHAPITRE II:

Méthodes de séparation en chromatographie



II.1 Généralités :

1- Introduction générale :

La chromatographie est une méthode analytique fondamentale de séparation, largement utilisée dans les laboratoires de chimie, pharmacie, et nanotechnologie. Cette technique repose sur la séparation des composants d'un mélange en fonction de leur affinité pour une phase stationnaire et une phase mobile. Elle est cruciale dans les analyses de haute précision, comme l'identification et la quantification de composés chimiques dans des échantillons complexes.

Le concept de la chromatographie a été développé au début du XXe siècle par le botaniste russe **Mikhail Tswett**, qui a découvert qu'il pouvait séparer les pigments végétaux en les faisant passer à travers un tube de craie (une colonne) avec un solvant.

Mikhaïl Semionovitch Tsvet, transcrit également comme **Tswett** (à l'allemande, orthographe la plus usuelle en botanique) **Tswet**, **Zwet** ou **Cvet**) (1872-1919) est un [botaniste russe](#) qui a inventé la [chromatographie d'adsorption](#). Son nom signifie "couleur" en [russe](#)



Cette technique a évolué et a été perfectionnée par d'autres scientifiques, notamment **Archer John Porter Martin** et **Richard Laurence Millington Synge**, qui ont reçu le Prix Nobel de chimie en 1952 pour leur travail sur la chromatographie en partition.



Archer John Porter Martin

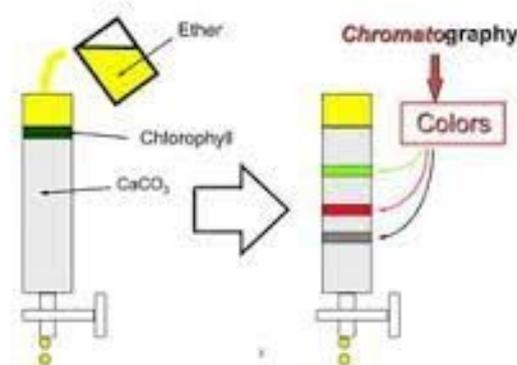


Richard Laurence Millington Synge

■ Expérience de Mikhaïl Tswett :

L'expérience de Mikhaïl Tswett en 1903 est une expérience pionnière qui a posé les bases de la chromatographie moderne. Tswett, un botaniste russe, a découvert cette technique en étudiant les pigments végétaux, notamment les chlorophylles et les caroténoïdes.

Invention of Chromatography by M. Tswett



But de l'expérience : Tswett voulait séparer et identifier les différents pigments présents dans les feuilles de plantes. Les méthodes d'analyse de l'époque ne permettaient pas d'isoler les pigments de manière efficace.

❖ Mise en place :

- Il a préparé un extrait de pigments végétaux en dissolvant des feuilles dans un solvant.
- Puis, il a rempli une colonne verticale en verre avec du carbonate de calcium finement broyé, qu'il a utilisé comme phase stationnaire.

❖ Procédure :

- Tswett a versé son extrait de pigments dans la colonne, puis il a ajouté un solvant qui a traversé la colonne par gravité.
- À mesure que l'extrait et le solvant traversaient la colonne, les différents pigments se séparaient en bandes distinctes.

❖ Résultat :

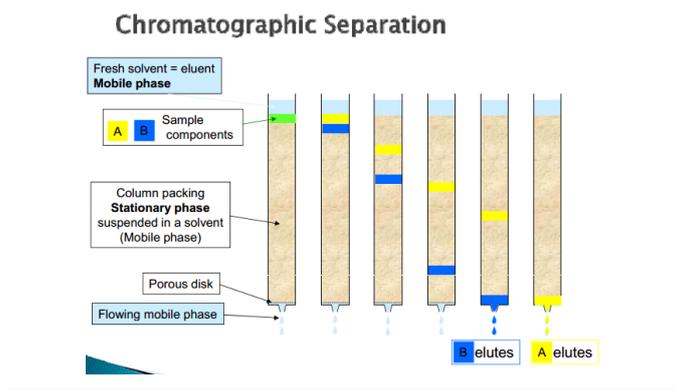
- Les pigments ont été séparés en bandes de différentes couleurs le long de la colonne, chaque bande correspondant à un pigment spécifique.
- La séparation se faisait selon les affinités des pigments avec la phase stationnaire et la phase mobile.

❖ Interprétation et terme "chromatographie" :

- Tswett a nommé cette technique "chromatographie", du grec "chroma" (couleur) et "graphein" (écrire), car il observait des "écritures" colorées sur la colonne.
- Il a ainsi découvert que différents composés peuvent être séparés par leur affinité pour une phase mobile (le solvant) et une phase stationnaire (le support dans la colonne).

2- Principe de chromatographie

La chromatographie est une méthode de séparation, tout comme l'extraction et la distillation, mais elle est particulièrement adaptée pour séparer des composés chimiques au sein d'un mélange complexe. Cette technique repose sur l'interaction entre un échantillon, une phase mobile (généralement un liquide ou un gaz) et une phase stationnaire (un solide ou un liquide fixé à une surface). L'échantillon dissous dans un solvant est injecté dans le système par une interface, puis il traverse une colonne contenant la phase stationnaire. Le mouvement de l'échantillon est facilité par le flux de la phase mobile, comme l'azote dans la chromatographie en phase gazeuse.

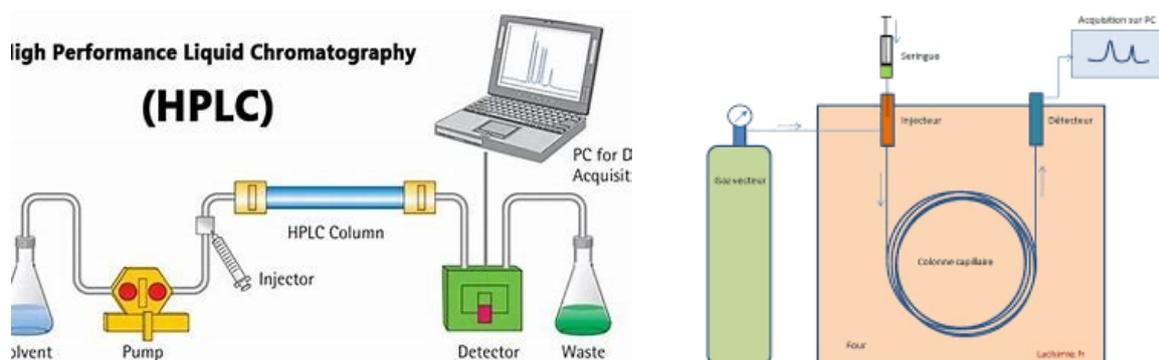


Principe de chromatographie

- ❖ **Principe général :** Le principe de base consiste en une séparation des constituants de l'échantillon selon leurs affinités respectives pour la phase mobile et la phase stationnaire. Les molécules ayant une plus grande affinité pour la phase stationnaire migreront plus lentement, tandis que celles avec une plus grande affinité pour la phase mobile migreront plus rapidement.
- ❖ **Injection et déplacement :** L'échantillon est introduit dans le système par un injecteur. Sous l'effet de la phase mobile, il se déplace à travers la colonne. La nature du gaz ou du liquide utilisé comme phase mobile dépend du type de chromatographie et du type d'échantillon à analyser.
- ❖ **Détection et analyse :** À la sortie de la colonne, les composants séparés sont détectés par différents types de détecteurs (spectromètre de masse, détecteur UV, etc.), ce qui permet de les identifier et les quantifier.
- ❖ **Utilisation pour la quantification et l'identification :** Les techniques chromatographiques permettent de quantifier les composants présents dans un échantillon et d'identifier les substances en fonction de leur temps de rétention et de leurs caractéristiques physiques.

1- Structure d'un Système Chromatographique

Un système chromatographique est composé de plusieurs éléments essentiels qui permettent la **séparation**, l'**analyse** et la **détection** des composés d'un mélange.



HPLC

CPG

Structure d'un Système Chromatographique

Un système chromatographique typique se compose des éléments suivants :

- a) **Réservoir de phase mobile**
- b) **Pompe (ou système d'entraînement de phase mobile)**
- c) **Injecteur (système d'injection de l'échantillon)**
- d) **Colonne chromatographique**
- e) **Détecteur**
- f) **Système d'acquisition de données (ordinateur et logiciel)**
- g) **Déchet ou collecteur de fraction**

■ Explication de chaque composant

a) Réservoir de phase mobile

- **Fonction** : Contient la **phase mobile**, qui est le fluide servant à transporter les analytes à travers la colonne.
- **Détails** :
 - En **chromatographie en phase liquide** (HPLC), il peut s'agir d'un solvant ou d'un mélange de solvants organiques (eau, acétonitrile, méthanol).
 - En **chromatographie en phase gazeuse** (CPG), il s'agit d'un gaz porteur (hélium, azote, hydrogène).

b) Pompe ou système d'entraînement de phase mobile

- **Fonction** : Assure le **flux** constant et contrôlé de la phase mobile à travers le système.
- **Détails** :
 - En HPLC, la pompe contrôle le débit (généralement exprimé en mL/min) et assure une haute pression pour pousser la phase mobile à travers la colonne.
 - En CPG, la pression du gaz porteur est réglée pour un débit constant.

c) Injecteur

- **Fonction** : Permet d'**introduire** l'échantillon à analyser dans la phase mobile.
- **Détails** :
 - En HPLC, l'échantillon est injecté à l'aide d'une **boucle d'injection**.
 - En CPG, l'échantillon est vaporisé et injecté dans le flux de gaz porteur.
 - L'injection doit être rapide et reproductible pour garantir une bonne séparation.

d) Colonne chromatographique

- **Fonction** : C'est le cœur du système chromatographique où la **séparation** des analytes se produit.
- **Détails** :
 - La colonne est remplie d'une **phase stationnaire** (liquide ou solide) qui interagit différemment avec chaque analyte, les séparant en fonction de leurs interactions.

- En **HPLC**, les colonnes sont souvent en acier inoxydable et remplies de particules de silice modifiée.
- En **CPG**, les colonnes sont souvent des tubes capillaires recouverts d'un film liquide de phase stationnaire.

e) Détecteur

- **Fonction** : Mesure la **concentration** des analytes après leur séparation dans la colonne.
- **Détails** :
 - Le détecteur envoie un signal électrique proportionnel à la quantité d'analyte détectée.
 - Différents détecteurs sont utilisés en fonction des analytes (UV-Vis, FID, MS, etc.).
 - Le signal généré est transformé en chromatogramme.

f) Système d'acquisition de données (ordinateur et logiciel)

- **Fonction** : Collecte et **analyse** les signaux provenant du détecteur.
- **Détails** :
 - Il permet de visualiser le **chromatogramme**, d'identifier les pics et de quantifier les analytes.
 - Les logiciels permettent des analyses statistiques et une comparaison des résultats.

g) Déchet ou collecteur de fraction

- **Fonction** : Collecte l'effluent après la détection ou permet de récupérer des fractions pour des analyses ultérieures.
- **Détails** :
 - En HPLC, le liquide est collecté dans un réservoir de déchets.
 - En CPG, les gaz sortent généralement par une évacuation.

■ Processus Général de Fonctionnement

- Préparation de la phase mobile** : La phase mobile est préparée dans le réservoir et la pompe est activée pour initier le flux à travers le système.
- Injection de l'échantillon** : L'échantillon est introduit dans la phase mobile par l'injecteur.
- Séparation dans la colonne** : Les composants de l'échantillon interagissent avec la phase stationnaire de la colonne, provoquant leur séparation en fonction de leurs propriétés physico-chimiques.
- Détection** : Les analytes séparés sont détectés en fonction de leurs propriétés spécifiques.
- Acquisition et analyse des données** : Le signal du détecteur est enregistré, générant un chromatogramme permettant d'identifier et de quantifier les analytes.
- Résultat de détection : Le chromatogramme**
- Le **chromatogramme** est la sortie graphique de l'analyse chromatographique.

- A. Il montre l'**intensité du signal** (en ordonnée) en fonction du **temps** (en abscisse).
- B. Chaque **pic** correspond à un analyte différent.
- C. Le **temps de rétention** est utilisé pour l'identification, et la **surface du pic** pour la quantification.

2- Classification des méthodes chromatographiques

La chromatographie peut être classée en fonction du type d'échantillon, de la phase mobile, de la phase stationnaire et du coefficient de partage entre les phases :

(a) Classification selon la nature des phases

- + **Chromatographie Gaz-Solide (CGS)** : Phase stationnaire solide et phase mobile gazeuse.
- + **Chromatographie Gaz-Liquide (CGL)** : Phase stationnaire liquide immobilisée sur un support solide, avec une phase mobile gazeuse.
- + **Chromatographie Liquide-Solide (CLS)** : Phase stationnaire solide, et phase mobile liquide.
- + **Chromatographie Liquide-Liquide (CLL)** : Phase stationnaire liquide immobilisée sur un support, et phase mobile liquide.
- + **Chromatographie Supercritique** : Utilise une phase mobile supercritique, généralement du CO₂.

(b) Classification selon le phénomène de séparation

- + **Chromatographie d'adsorption** : La séparation repose sur l'adsorption des composants sur la phase stationnaire solide.
- + **Chromatographie de partage** : Basée sur la différence d'affinité des composants entre deux phases liquides.
- + **Chromatographie d'échange d'ions** : Les ions des échantillons interagissent avec des sites chargés de la phase stationnaire.
- + **Chromatographie de perméation de gel (ou exclusion de taille)** : Les molécules sont séparées selon leur taille, la phase stationnaire est un gel poreux.
- + **Chromatographie d'affinité** : Exploite l'affinité spécifique entre une molécule cible et un ligand immobilisé.

(c) Classification selon les procédés utilisés

- + **Chromatographie en colonne** : L'échantillon traverse une colonne remplie de phase stationnaire.
- + **Chromatographie en couche mince (CCM)** : La phase stationnaire est un mince film sur une plaque et l'échantillon migre sur celle-ci.
- + **Chromatographie sur papier** : Utilise du papier comme phase stationnaire et le solvant migre par capillarité.
- + **Chromatographie liquide haute performance (HPLC)** : Méthode en colonne utilisant des pressions élevées pour améliorer la séparation.
- + **Chromatographie en phase gazeuse (CPG)** : L'échantillon est vaporisé et transporté dans une colonne par un gaz porteur.

(d) Classification selon les paramètres intervenant dans la séparation

- ✚ **Température** : Principalement utilisé dans la chromatographie en phase gazeuse (CPG) où les températures élevées permettent l'évaporation et la séparation des composants volatils.
 - ✚ **Pression** : Particulièrement pertinent en HPLC pour améliorer la vitesse et la résolution de la séparation.
 - ✚ **Polarisabilité et polarité** : Affectent les interactions entre la phase mobile, la phase stationnaire, et les analytes.
 - ✚ **pH** : Dans la chromatographie d'échange d'ions, il influence la charge des analytes et des résines échangeuses.
 - ✚ **Taille moléculaire** : Primordial en chromatographie d'exclusion (perméation de gel) où les molécules sont séparées par taille.
1. **Chromatographie liquide (LC)** : Utilise une phase mobile liquide pour séparer des composés solubles dans la phase mobile. Elle est souvent utilisée pour analyser des composés thermiquement instables ou non volatils.
 2. **Chromatographie en phase gazeuse (GC)** : Utilise un gaz (par exemple, l'azote ou l'hélium) comme phase mobile pour séparer des composés volatils et thermiquement stables.
 3. **Chromatographie ionique** : Conçue pour les composés ioniques ou polaires ; elle utilise des phases stationnaires capables de retenir les ions de charges opposées à ceux de l'échantillon.
 4. **Chromatographie en phase inverse (RP-LC)** : Utilise une phase mobile polaire (comme l'eau) et une phase stationnaire non polaire, permettant de séparer des composés polaires en phase mobile.
 5. **Chromatographie par paires d'ions** : Adaptée pour des composés polaires et ionisables, avec ajout de contre-ions dans la phase mobile pour améliorer la séparation.
 6. **Chromatographie supercritique** : Utilise du CO_2 supercritique comme phase mobile, permettant une séparation rapide pour des composés semi-volatils.

3- Comment choisir la technique chromatographique ?

La sélection de la méthode dépend des propriétés physico-chimiques de l'échantillon :

- **Nature de l'échantillon** : Par exemple, les composés volatils conviendront pour la GC, tandis que les composés non volatils ou thermiquement instables conviendront pour la LC.
- **Polarité** : La polarité influence le choix de la phase stationnaire et mobile.
- **Solubilité** : En fonction de la solubilité de l'échantillon dans la phase mobile.

Chaque technique a des avantages selon le type d'analyse, et le choix final repose souvent sur les besoins de quantification, d'identification et la nature de l'échantillon.

Pour la chromatographie, l'échantillon doit idéalement être **homogène** pour garantir une séparation efficace et reproductible des composants. Si un échantillon est hétérogène, il doit être préparé par dissolution, filtration ou homogénéisation pour éviter que les particules ne perturbent le processus de séparation dans la colonne.

Tableau pour le choix de la méthode chromatographique

Critère de sélection	Chromatographie liquide (LC)	Chromatographie gazeuse (GC)	Chromatographie ionique	Chromatographie en phase inverse (RP-LC)	Chromatographie par paires d'ions	Chromatographie supercritique (SFC)
État physique de l'échantillon	Solide ou liquide	Volatil ou facilement vaporisable	Solide ou liquide, ionique	Solide ou liquide	Solide ou liquide	Solide ou liquide
Volatilité	Non requis	Requis	Non requis	Non requis	Non requis	Composés semi-volatils
Température de stabilité	Composés thermosensibles	Composés thermiquement stables	Composés sensibles aux températures élevées	Composés sensibles à la chaleur	Composés thermosensibles	Modéré
Polarité	Polaire à non polaire	Non polaire à légèrement polaire	Ionique	Polaire à légèrement polaire	Ionique	Semi-polaire
Type de phase mobile	Liquide	Gaz (azote, hélium)	Liquide (électrolyte)	Liquide (polaire, souvent eau)	Liquide (avec contre-ion)	Gaz supercritique (CO ₂)
Type de phase stationnaire	Solide ou liquide	Solide	Solide	Solide non polaire	Solide	Solide ou liquide
Type d'analyse	Quantification, identification	Quantification, identification	Quantification des ions	Quantification de composés polaires	Quantification de composés ionisables	Identification et séparation rapide
Applications principales	Produits pharmaceutiques, biomolécules	Composés organiques volatils	Anions, cations, composés polaires	Produits pharmaceutiques, composés polaires	Produits biologiques, polaires	Composés organiques et polymères

■ Considérations supplémentaires

- **Préparation de l'échantillon** : L'échantillon doit être préparé de manière à être compatible avec la phase mobile et la phase stationnaire.
- **Objectifs analytiques** : La précision et la sensibilité nécessaires pour l'analyse influencent le choix de la méthode. Par exemple, pour une analyse qualitative rapide, la GC est idéale pour les composés volatils. Pour les composés thermosensibles, la LC est préférable.

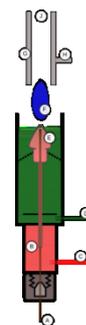
■ Intérêt et avantages de la chromatographie

- **Haute précision** : Permet une séparation et une identification de haute précision des composants dans des mélanges complexes.
- **Rapidité** : Certaines techniques, comme la CPG et la HPLC, permettent des analyses rapides, essentielles en production pharmaceutique.
- **Flexibilité** : La diversité des techniques permet de l'adapter aux propriétés chimiques et physiques des échantillons.
- **Possibilité d'étudier une quantité infime, échantillon d'ordre de nono-gramme.**

6- Détecteur :

6.1 Définition : Détecteur chromatographique

Un **détecteur chromatographique** est un instrument placé à la sortie de la colonne qui permet de **mesurer** la concentration des solutés présents dans l'effluent de la colonne. Il convertit cette mesure en un **signal électrique** proportionnel à la concentration du soluté, produisant ainsi un **chromatogramme**.



■ Principe de la détection :

Le principe de la détection est basé sur la mesure d'une **propriété physique** ou **chimique** du soluté lorsque celui-ci passe dans le détecteur. Ces propriétés peuvent inclure :

- **Absorption de la lumière** (UV-visible)
- **Conductivité**
- **Réfractométrie**
- **Ionisation** ou **variation de la masse**.

Les variations dans ces propriétés sont converties en **signaux** par le détecteur, qui sont ensuite enregistrés sous forme de **chromatogramme**.

6.2 Les différents types de détecteurs en chromatographie :

Il existe plusieurs types de détecteurs utilisés en fonction du type de chromatographie et des propriétés des solutés. Les détecteurs peuvent être classés en deux catégories principales : **détecteurs universels** et **détecteurs spécifiques**.

a) Détecteurs pour Chromatographie en Phase Liquide (HPLC) :

1. Détecteur UV-Visible (UV-Vis) :

- **Principe** : Mesure l'absorption de la lumière UV ou visible par les solutés. Les composés absorbant la lumière génèrent un signal proportionnel à leur concentration.
- **Avantages** : Sensible et largement utilisé pour les composés aromatiques ou conjugués.
- **Inconvénients** : Moins efficace pour les composés qui n'absorbent pas la lumière UV.

2. Détecteur à Réfractométrie Différentielle (RID) :

- **Principe** : Mesure les variations de l'indice de réfraction entre la phase mobile pure et la phase mobile contenant le soluté.
- **Avantages** : Détecteur universel, fonctionne pour les composés qui n'absorbent pas la lumière UV.
- **Inconvénients** : Moins sensible que le détecteur UV-Vis.

3. Détecteur de Fluorescence :

- **Principe** : Mesure l'émission de lumière par les solutés après excitation par une source lumineuse.
- **Avantages** : Très sensible et sélectif pour les composés fluorescents.

- **Inconvénients** : Limité aux composés fluorescents ou aux composés marqués par des agents fluorescents.

4. Détecteur de Conductivité Electrochimique :

- **Principe** : Mesure la conductivité électrique de la solution en présence de composés ioniques.
- **Avantages** : Sensible pour les composés ioniques.
- **Inconvénients** : Nécessite une phase mobile conductrice.

b) Détecteurs pour Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) :

1. Détecteur à Ionisation de Flamme (FID) :

- **Principe** : Brûle les solutés organiques dans une flamme d'hydrogène, générant des ions qui sont détectés comme un courant électrique.
- **Avantages** : Sensible pour les composés organiques. Détecteur universel pour les hydrocarbures.
- **Inconvénients** : Ne détecte pas les composés inorganiques ou non ionisables.

2. Détecteur à Capture d'Électrons (ECD) :

- **Principe** : Mesure la capture d'électrons par les composés électronégatifs (souvent des halogènes).
- **Avantages** : Très sensible pour les pesticides, PCB, et autres composés halogénés.
- **Inconvénients** : Sélectif pour certains composés.

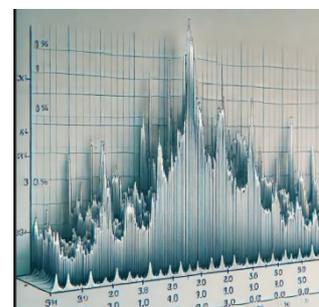
3. Détecteur de Masse (MS) :

- **Principe** : Ionise les solutés et les sépare en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).
- **Avantages** : Très sensible et permet l'identification précise des composés.
- **Inconvénients** : Complexe et coûteux.

Conclusion : Résultats de la détection : Le chromatogramme Un chromatogramme est le graphique produit par le détecteur. Il représente le **signal** en fonction du **temps**.

6.1 Chromatogramme

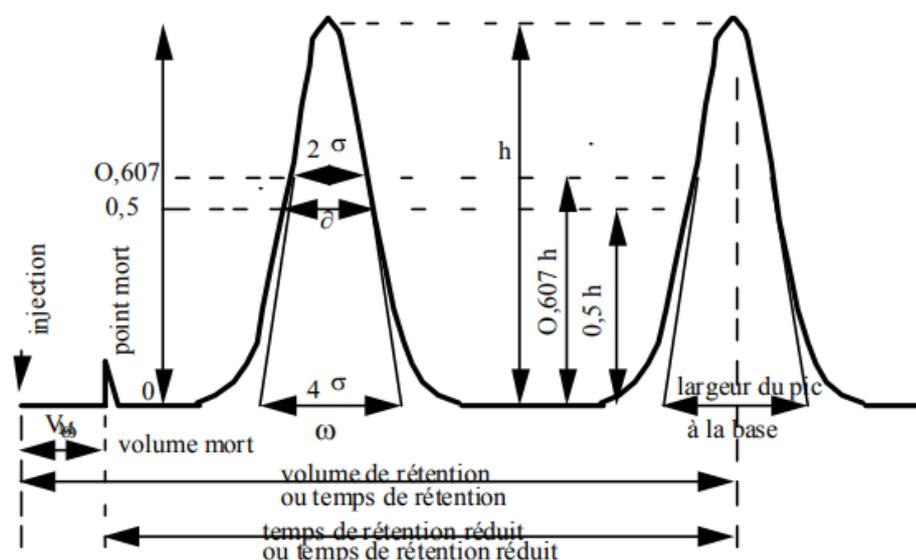
Un chromatogramme est le résultat graphique d'une analyse chromatographique, permettant de visualiser la séparation des composants d'un mélange en fonction de leur temps de rétention dans la colonne. Voici une explication détaillée de ses éléments et de la façon de l'interpréter.



(a) Définition d'un Chromatogramme

Un chromatogramme est une représentation graphique où l'intensité du signal détecté (généralement par un détecteur UV, de fluorescence, ou de masse) est tracée en fonction du

temps. Il permet d'observer la séparation des composés d'un mélange, chaque composé apparaissant sous la forme d'un pic distinct.



Chromatogramme : Variations et Axe des Coordonnées

Dans un chromatogramme, l'axe des **ordonnées** représente l'intensité du signal détecté, qui est souvent relié à la concentration ou à la quantité d'un composé dans l'échantillon. L'axe des **abscisses** représente le temps, et chaque pic sur le chromatogramme correspond à un moment précis de détection, c'est-à-dire au temps de rétention du composé.

- **Variation du signal en fonction du temps** : Le chromatogramme montre comment le signal détecté varie en fonction du temps, où chaque pic apparaît au moment où un composant spécifique est détecté.
- **Interprétation des résultats** : En comparant les temps de rétention obtenus aux temps de rétention connus pour des composés standards, on peut identifier chaque pic.

Signification d'une Ligne Droite (Absence de Pics)

- Une ligne droite sur un chromatogramme (absence de pics) signifie qu'aucun composé n'a été détecté pendant cette période. Cela peut indiquer une phase où il n'y a pas de composants retenus par la phase stationnaire ou une période où les composants sont soit très faiblement concentrés, soit indétectables par le détecteur utilisé.
- Une ligne droite peut également apparaître avant l'injection de l'échantillon, pendant la période d'équilibrage ou de stabilisation du signal.

■ Identification des Composés

Pour déterminer l'identité d'un composé :

- ✓ **Temps de rétention** : Le premier indicateur est le temps de rétention du pic. En le comparant à des standards connus, il est possible de faire une première identification.
- ✓ **Analyse du spectre ou d'autres caractéristiques** : Dans certaines techniques (comme la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse), le spectre de chaque pic peut être analysé pour fournir une identification plus précise.
- ✓ **Intensité du pic** : L'intensité et la forme du pic peuvent aussi donner des indices sur la nature et la concentration du composé.

En conclusion, le chromatogramme est une méthode puissante pour analyser et quantifier les composants d'un mélange, chaque pic correspondant à un composé distinct et son temps de rétention aidant à identifier les composés en comparaison avec des standards.

❖ **Temps de rétention (t_R):** Le **temps de rétention** est le temps écoulé entre l'injection de l'échantillon dans la colonne chromatographique et l'apparition du pic correspondant au soluté détecté. Il représente le temps nécessaire pour que le soluté migre à travers la colonne sous l'influence de la phase mobile : **Interprétation** : Un temps de rétention élevé indique que le soluté a interagi plus longuement avec la phase stationnaire, tandis qu'un temps de rétention court indique une interaction faible.

❖ **Volume de rétention (V_R):** Le **volume de rétention** est le volume de phase mobile nécessaire pour éluer (faire sortir) un soluté spécifique de la colonne. Il est calculé en multipliant le temps de rétention par le débit volumétrique de la phase mobile (F) :

$$V_R = t_R \times F$$

$$V_R = t_R \times v \times s$$

- (v): vitesse lineaire de la phase mobile
- (s) : section reduite de la colonne
- $s = s' \times \varepsilon$
- (s') : section de la colonne

$$\varepsilon = V_M / V_T$$

- ε : porosité

$$V_M = F \times t_0$$

❖ **V_M : volume de la phase mobile dans la colonne**

- les espaces non retenues par la phase stationnaire apparaissent dans l'effluent après le temps (t_0) correspondant à l'écoulement du volume interstitiel de la colonne ou volume de phase mobile (V_M) contenu dans la colonne.

Le volume de rétention (V_R) est relié directement au coefficient de distribution K par la relation :

$$V_R = V_M + K \cdot V_S$$

(V_S) : volume de la phase stationnaire (ou masse ou surface spécifique selon les unités de K) ; cette relation ne s'applique que dans le cas d'élution linéaire c'est-à-dire quand K varier linéairement avec la concentration du compose dans chaque phase.

❖ **Définition du temps mort (t_0) :**

- *Le temps mort est aussi appelé temps de passage du volume interstitiel ou temps d'écoulement de la phase mobile.*
- *Les molécules non retenues sont celles qui n'ont aucune interaction ou une interaction négligeable avec la phase stationnaire. Elles se déplacent donc uniquement avec la phase mobile.*

(c) **Volume interstitiel (Volume mort ou V_M) :**

Exemple :

Si vous effectuez une chromatographie et observez un pic très précoce à un temps $t_0=2min$, cela signifie que la phase mobile a mis 2 minutes pour traverser la colonne. Les

solutés qui ont des interactions avec la phase stationnaire apparaîtront après cette période, par exemple à $t_R=5$, $t_R=7$ min, etc.

En résumé, t_0 vous donne une idée de la **vitesse** de la phase mobile et sert de **référence** pour estimer le temps de rétention réel des solutés qui interagissent avec la phase stationnaire.

ω : largeur du pic a la base, distance entre les points d'intersection des tangents au point d'inflexion avec la ligne de base

δ : largeur du pic a mi-hauteur

❖ Temps de rétention réduit ($t_{R'}$)

Le **temps de rétention réduit** est défini comme le temps de rétention du soluté moins le temps mort (t_M) :

$$t_{R'} = t_R - t_M$$

- **Interprétation** : Il représente le temps pendant lequel le soluté interagit effectivement avec la phase stationnaire, en excluant le temps que la phase mobile met pour traverser la colonne.

❖ Volume de rétention réduit ($V_{R'}$)

Le **volume de rétention réduit** est calculé de la même manière que le temps de rétention réduit, en tenant compte du volume mort (V_M) :

$$V_{R'} = V_R - V_M$$

- **Interprétation** : Il correspond au volume de phase mobile que le soluté a parcouru en interagissant avec la phase stationnaire.

❖ Point mort (Temps mort ou Temps mort (t_M))

Le **point mort** ou **temps mort** est le temps nécessaire à une molécule non retenue (ou peu retenue) par la phase stationnaire pour traverser la colonne. Ce temps est pris comme référence pour calculer le temps de rétention réduit :

- **Interprétation** : Il représente le temps que met un composé non retenu (n'interagissant pas avec la phase stationnaire) à parcourir la colonne, et donne une idée de la vitesse de la phase mobile.

❖ Volume mort (V_M)

Le volume mort correspond au volume de phase mobile nécessaire pour traverser la colonne sans interaction avec la phase stationnaire.

$$V_M = F \times t_M$$

- **F** : débit volumétrique de la phase mobile (mL/min).
- **t_M** : temps mort (en minutes).

Si on connaît la section de la colonne et la vitesse de la phase mobile, on peut exprimer le volume mort par :

$$V_M = V \times S \times \epsilon$$

- **S** : section transversale de la colonne, avec r le rayon de la colonne.
- **V** : vitesse linéaire de la phase mobile

- ϵ : porosité de la colonne, qui représente la fraction du volume occupé par la phase mobile.

❖ Section réduite de la colonne

La section réduite de la colonne fait référence à la surface de la colonne prise en compte après la réduction par la présence de particules de la phase stationnaire.

(b) Coefficient de partage (K)

Le **coefficient de partage** (*Coefficient de distribution*) est le rapport entre la concentration du soluté (analyte) dans la phase stationnaire (C_s) et dans la phase mobile (C_m) :

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

- **Interprétation** : Un coefficient de partage élevé signifie que le soluté a une forte affinité pour la phase stationnaire, augmentant ainsi le temps de rétention.

■ Analyse du Chromatogramme : Identification et Quantification des Analytes

a) Identification :

- **Temps de rétention:**

- Le **temps de rétention** est le temps nécessaire pour qu'un analyte atteigne le détecteur après injection.
- Chaque composé a un temps de rétention spécifique, qui dépend de ses interactions avec la phase stationnaire et la phase mobile.
- En comparant le t_{Rt_RtR} d'un pic avec celui d'une **substance standard** connue, on peut identifier l'analyte.

- **Comparaison avec des standards :**

- On injecte des solutions standards (échantillons de référence) et on compare leurs temps de rétention avec ceux des analytes de l'échantillon pour les identifier.

b) Quantification :

Pour quantifier la concentration des analytes, deux méthodes sont principalement utilisées :

- **Méthode de la hauteur du pic** : on utilise la hauteur du pic (h) pour estimer la concentration si la relation est linéaire.
- **Méthode de la surface du pic** : La **surface du pic** (A) est calculée comme l'intégrale du pic (aire sous la courbe).

7- Colonnes/ phase stationnaire/ Nombre de plateaux théoriques

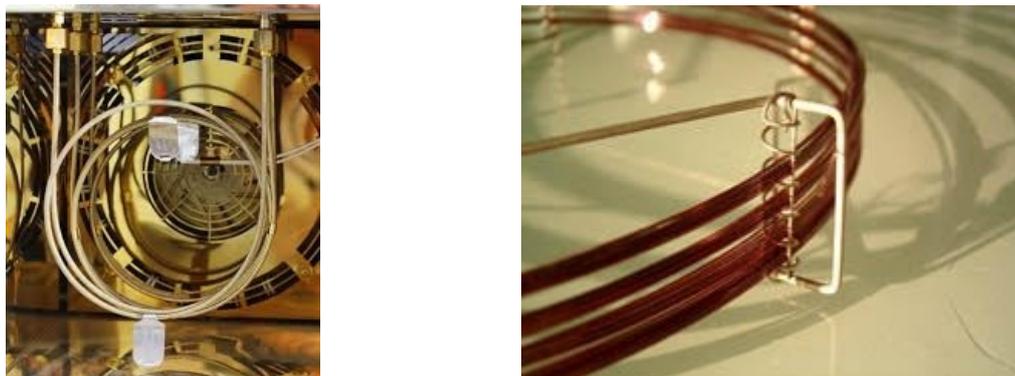


Fig : Colonnes chromatographie

7.1. Colonne Chromatographique

Une colonne chromatographique est un tube cylindrique contenant la **phase stationnaire**, par laquelle la **phase mobile** transporte les analytes. La colonne est essentielle pour la séparation des composés dans un mélange.

a) Types de Colonnes

- **Colonnes remplies (packed columns) :**
 - Utilisées en chromatographie liquide (HPLC) et en chromatographie en phase gazeuse (GC).
 - Elles sont remplies de particules de **phase stationnaire** ou de matériau support recouvert de phase stationnaire.
 - Diamètre interne typique : 2-4 mm, longueur : 10-30 cm pour HPLC.
- **Colonnes capillaires (open tubular columns) :**
 - Principalement utilisées en chromatographie en phase gazeuse (GC).
 - Tube capillaire avec une fine couche de **phase stationnaire** sur la paroi interne.
 - Diamètre interne : 0,1-0,5 mm, longueur : 10-100 m.

b) Paramètres de la colonne

- **Longueur de la colonne (L) :** Affecte le nombre de plateaux théoriques et la résolution de la séparation.
- **Diamètre interne :** Plus le diamètre est petit, meilleure est la résolution, mais cela peut entraîner une augmentation de la pression.
- **Type de matériau :** Acier inoxydable, verre, ou polymères, en fonction des besoins analytiques.

7.2 Phase Stationnaire

La **phase stationnaire** est le composant de la colonne avec lequel les analytes interagissent. Elle peut être solide ou liquide (supportée par un solide) et détermine le mécanisme de séparation.

a) Types de Phases Stationnaires

- **Phase stationnaire polaire :**
 - Capable de retenir les composés polaires.
 - Exemple : Silice (SiO₂), cyano (CN).
- **Phase stationnaire apolaire :**
 - Capable de retenir les composés apolaires.
 - Exemple : C18 (octadécylsilane, ODS), C8.
- **Phase stationnaire chirale :**
 - Utilisée pour séparer des énantiomères.
 - Composée de matériaux qui interagissent différemment avec chaque énantiomère.

b) Choix de la Phase Stationnaire

- Dépend de la nature des analytes et de l'objectif de la séparation.
- Une phase stationnaire apolaire est choisie pour les composés apolaires, et une phase polaire pour les composés polaires.

7.3 Nombre de Plateaux Théoriques (N)

Le **nombre de plateaux théoriques** est une mesure de l'efficacité de la colonne chromatographique. Il reflète le degré de séparation que la colonne peut atteindre.

a) Définition

- Le nombre de plateaux théoriques (N) indique le nombre de zones d'équilibre dans une colonne où l'analyte se distribue entre la phase mobile et la phase stationnaire.
- Plus N est élevé, plus la séparation est efficace et plus les pics chromatographiques sont étroits.

b) Formule de Calcul

Le nombre de plateaux théoriques est calculé par :

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t_R}{\delta} \right)^2$$

c) Hauteur Équivalente d'un Plateau Théorique (HEPT ou H)

- La **HEPT** ou **H** est une autre mesure de l'efficacité de la colonne, donnée par :

$$HEPT = \frac{L}{N}$$

- **L** : Longueur de la colonne.
- Plus la valeur de H est petite, meilleure est l'efficacité de la colonne.

d) Facteurs influençant N et H

- **Taille des particules** : Des particules plus petites augmentent N.

- **Longueur de la colonne** : Une colonne plus longue augmente N , mais peut nécessiter une pression plus élevée.
- **Débit de la phase mobile** : Un débit optimal maximise N .

e) Applications du Nombre de Plateaux Théoriques

- **Évaluation de la performance** : N est utilisé pour comparer l'efficacité des colonnes.
- **Optimisation de la séparation** : Les paramètres de la colonne peuvent être ajustés pour maximiser N .
- **Qualité des pics chromatographiques** : Une valeur NNN élevée correspond à des pics plus étroits et mieux définis.

■ Exemple d'Application : Séparation de l'Aniline et du Toluène

Supposons que nous analysons un mélange d'aniline et de toluène. Le chromatogramme montre deux pics distincts, avec :

- **Temps de rétention** pour l'aniline $t_R=5.2\text{min}$.
- **Temps de rétention** pour le toluène $t_R 7.8 \text{ min}$.
- **Largeur à mi-hauteur** de l'aniline $\omega_{1/2}= 0.12 \text{ min}$.
- **Largeur à mi-hauteur** du toluène $\omega_{1/2}=0.15 \text{ min}$.
- En appliquant la formule N

• Conclusion

- La compréhension des paramètres de la colonne, de la phase stationnaire et du nombre de plateaux théoriques est cruciale pour optimiser une méthode chromatographique. L'efficacité de la colonne peut être ajustée en modifiant des paramètres tels que la taille des particules, la longueur de la colonne et le débit de la phase mobile, pour obtenir des séparations optimales et des résultats analytiques précis.

f) Facteur de Symétrie

■ Définition

Le facteur de symétrie (ou facteur d'asymétrie) est une mesure de la forme d'un pic chromatographique. Idéalement, un pic chromatographique doit être symétrique et en forme de gaussienne, mais en pratique, les pics peuvent être asymétriques. Le facteur de symétrie (A_S) permet de quantifier cette déviation par rapport à la symétrie idéale.

■ Formule

Le facteur de symétrie est donné par:

$$A_S = \frac{b}{a}$$

- ▣ **a**: Distance du début du pic jusqu'au point d'inflexion gauche (mesuré à 10 % de la hauteur du pic).
- ▣ **b** : Distance de la fin du pic jusqu'au point d'inflexion droit (mesuré à 10 % de la hauteur du pic).

■ Interprétation

- $A_s=1$: Le pic est parfaitement symétrique.
- $A_s>1$: Le pic est étalé à droite (queue de pic ou "tailing").
- $A_s<1$: Le pic est étalé à gauche (front de pic ou "fronting").

■ Importance

- **Optimisation** : Un facteur de symétrie proche de 1 est souhaitable pour une bonne séparation et une quantification précise des analytes.
- **Diagnostic** : Un pic asymétrique peut indiquer des problèmes de colonne chromatographique, comme une surcharge d'échantillon ou des interactions indésirables avec la phase stationnaire.

■ Exemples d'utilisation

En chromatographie HPLC et GC, le facteur de symétrie est utilisé pour évaluer la qualité des pics. Des facteurs de symétrie élevés (ex. $A_s>2$) peuvent nécessiter une optimisation des conditions chromatographiques ou un nettoyage de la colonne.

(g) Facteur de Capacité (ou Facteur de Rétention) en Chromatographie

Le facteur de capacité, également appelé facteur de rétention (symbolisé par k'), est une mesure fondamentale utilisée en chromatographie pour décrire le comportement d'un analyte lors de la séparation. Il indique combien de temps une molécule passe dans la phase stationnaire par rapport à la phase mobile. C'est un paramètre essentiel pour évaluer l'efficacité de la séparation.

■ Définition : Le facteur de capacité k' est défini comme le rapport entre le temps que passe un soluté dans la phase stationnaire et le temps qu'il passe dans la phase mobile. Il est également interprété comme le nombre de fois qu'une molécule interagit avec la phase stationnaire avant d'être éluée : La formule du facteur de capacité est donnée par :

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

- t_R : Temps de rétention du soluté (temps pris par le soluté pour être élué de la colonne).
- t_0 : Temps mort ou temps de rétention du composé non retenu (c'est le temps nécessaire à la phase mobile pour traverser la colonne sans interaction avec la phase stationnaire).

■ Principe

- Si $k'=0$, le composé n'est pas retenu et s'écoule directement avec la phase mobile.
- Si k' est élevé, cela signifie que le soluté interagit fortement avec la phase stationnaire et passe plus de temps dans celle-ci, augmentant ainsi le temps de rétention.
- En général, une valeur optimale de k' se situe entre **1 et 10** pour garantir une bonne séparation sans prolonger excessivement le temps d'analyse.

■ Exemple

Prenons un exemple simple pour illustrer le calcul du facteur de capacité :

Supposons que lors d'une analyse chromatographique, nous avons les données suivantes :

- **(temps de rétention du soluté)** : 10 minutes

- **(temps mort)** : 2 minutes

Le facteur de capacité $k' = 4$: Cela signifie que le soluté passe 4 fois plus de temps dans la phase stationnaire que dans la phase mobile.

■ Importance du Facteur de Capacité

- **Évaluation de l'efficacité** : Un k' trop faible indique une mauvaise rétention, ce qui peut entraîner un chevauchement des pics. Un k' trop élevé allonge le temps d'analyse inutilement.
- **Optimisation de la séparation** : Le facteur de capacité aide à ajuster les conditions chromatographiques (type de phase stationnaire, choix de la phase mobile) pour obtenir une séparation efficace des composés.
- **Comparaison de méthodes** : En utilisant le facteur de capacité, on peut comparer différentes colonnes et phases mobiles pour évaluer laquelle offre une meilleure rétention et séparation.

■ Relation avec d'autres paramètres chromatographiques

Le facteur de capacité est souvent utilisé en conjonction avec d'autres paramètres tels que le **facteur de sélectivité** (α) et le **nombre de plateaux théoriques** (N) pour décrire et optimiser le processus de séparation.

- **Facteur de sélectivité (α)** : Défini par le rapport des facteurs de capacité de deux composés, il permet d'évaluer la résolution entre deux pics.

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \quad [k'_2 > k'_1]$$

■ Exemples d'application

- **Chromatographie en phase liquide (HPLC)** : En ajustant la polarité de la phase mobile, le facteur de capacité des analytes peut être modifié pour améliorer la séparation.
- **Chromatographie en phase gazeuse (GC)** : En modifiant la température de la colonne, on peut influencer le facteur de capacité des analytes.

■ Avantages et inconvénients

- **Avantages** :
 - Permet une estimation rapide de la rétention des analytes.
 - Aide à optimiser les conditions chromatographiques.
- **Inconvénients** :
 - Un k' trop élevé allonge le temps d'analyse et peut nuire à l'efficacité de la séparation.
 - Un k' trop faible peut entraîner une mauvaise séparation des composés.

■ Conclusion

Le facteur de capacité est un outil essentiel en chromatographie pour évaluer et optimiser les conditions de séparation. En jouant sur les variables expérimentales comme la nature de la phase stationnaire ou la composition de la phase mobile, on peut ajuster le facteur

de capacité pour obtenir des séparations optimales et des analyses plus rapides et plus précises.

(h) Facteur de Sélectivité (α) en Chromatographie

■ Définition

Le facteur de sélectivité, noté α , est un paramètre clé en chromatographie qui mesure la capacité d'une colonne chromatographique à distinguer deux composés différents. Il indique la différence de rétention entre deux analytes sur une même colonne et permet d'évaluer leur séparation.

■ Formule

Le facteur de sélectivité est défini par le rapport des facteurs de capacité (k') de deux analytes distincts :

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

- k'_2 : Facteur de capacité du composé le plus retenu ($k'_2 > k'_1$).
- k'_1 : Facteur de capacité du composé le moins retenu.

Le facteur de sélectivité est toujours supérieur à 1 ($\alpha > 1$)

■ Principe

Le facteur de sélectivité permet de quantifier la différence de rétention entre deux solutés. Plus le facteur de sélectivité est élevé, plus la différence de rétention est importante, ce qui se traduit par une meilleure séparation des deux composés.

- ($\alpha \approx 1$): Les analytes sont faiblement séparés ou ne sont pas du tout séparés (pics qui se chevauchent).
- ($\alpha > 1$): Indique une bonne séparation des analytes.
- α très élevé : Indique une séparation plus nette, mais si α est trop grand, cela peut entraîner un temps d'analyse prolongé pour le composé le plus retenu.

■ Exemple de Calcul

Supposons que nous ayons deux composés, A et B, analysés par chromatographie avec les paramètres suivants :

- Temps de rétention du composé A (t_{R1}) : 5 minutes
- Temps de rétention du composé B (t_{R2}) : 10 minutes
- Temps mort (t_0) : 2 minutes

Calculons d'abord les facteurs de capacité :

$$k'_2 = \left(\frac{10 - 2}{2} \right) = 4 \quad \text{and} \quad k'_1 = \left(\frac{5 - 2}{2} \right) = 1.5 \quad \text{So: } \alpha = 2.67$$

Interprétation : Un facteur de sélectivité de 2.67 signifie que le composé B est significativement plus retenu que le composé A, indiquant une bonne séparation.

■ Importance du Facteur de Sélectivité

- **Optimisation des Séparations** : Le facteur de sélectivité est utilisé pour ajuster les conditions expérimentales afin d'améliorer la séparation des analytes.
- **Choix de la Phase Stationnaire** : La sélectivité dépend de la nature de la phase stationnaire. En changeant de colonne, on peut obtenir une meilleure séparation des analytes en augmentant α .
- **Comparaison des Analytes** : Le facteur de sélectivité permet de comparer la rétention de plusieurs composés sur la même colonne.

■ Amélioration de la Sélectivité

- **Modification de la phase mobile** : En changeant la polarité ou la composition de la phase mobile, on peut influencer la rétention des analytes et augmenter le facteur de sélectivité.
- **Changement de la phase stationnaire** : Utiliser une phase stationnaire avec des interactions chimiques différentes peut augmenter la différence de rétention entre deux analytes.
- **Température** : En chromatographie en phase gazeuse (GC), l'ajustement de la température peut affecter les temps de rétention et améliorer la sélectivité.

■ Exemple Pratique

Supposons une analyse HPLC où l'on souhaite séparer deux isomères : l'ibuprofène et le naproxène.

- En utilisant une colonne C18 avec une phase mobile aqueuse acétonitrile (50:50), on observe que les temps de rétention sont très proches, et $\alpha \approx 1.05$.
- En ajustant la composition de la phase mobile à 60 % d'acétonitrile, le temps de rétention du naproxène augmente plus que celui de l'ibuprofène, et α passe à 1.2.
- Cette amélioration de la sélectivité (α) permet une meilleure séparation des pics sur le chromatogramme.

■ Relation avec la Résolution (R_s)

Le facteur de sélectivité est un composant clé de la formule de résolution (R_s), qui mesure la séparation entre deux pics chromatographiques :

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{k_2'}{1 + k_2'}$$

- **N** : Nombre de plateaux théoriques
- **α** : Facteur de sélectivité
- **k_2'** : Facteur de capacité du composé le plus retenu

■ Avantages :

- Permet d'évaluer et d'optimiser la séparation des analytes.
- Utilisé pour comparer l'efficacité de différentes colonnes et conditions expérimentales.

■ Limitations :

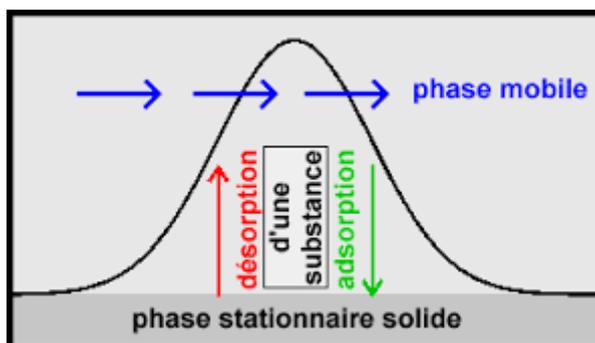
- Un α proche de 1 rend difficile la séparation et peut nécessiter des ajustements importants des conditions chromatographiques.
- Si α est très élevé, le temps d'analyse peut être prolongé inutilement pour certains analytes.

Conclusion

Le facteur de sélectivité (α) est un paramètre essentiel pour évaluer et optimiser la séparation des analytes en chromatographie. Il permet de comprendre et d'ajuster les interactions entre les analytes et la phase stationnaire, influençant directement la qualité de la séparation et la résolution des pics chromatographiques. L'ajustement de la phase mobile, le choix de la phase stationnaire et la modification des conditions expérimentales sont des méthodes clés pour optimiser la sélectivité et ainsi obtenir des analyses précises et fiables.

7.2 Phase mobile :

En chromatographie, l'éluant, ou phase mobile, est le liquide ou gaz qui circule à travers la colonne chromatographique et transporte les composants de l'échantillon à analyser. Sa fonction principale est d'entraîner ces molécules le long de la phase stationnaire, qui est fixée à l'intérieur de la colonne.



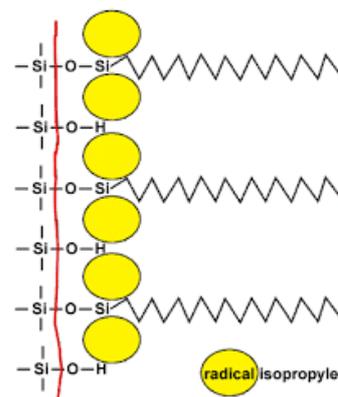
- ❑ **Interaction avec la phase stationnaire :** Dans la colonne, l'échantillon est séparé en fonction de son interaction avec la phase stationnaire et la phase mobile. Les composants qui interagissent faiblement avec la phase stationnaire sont entraînés plus rapidement par la phase mobile et ont donc un temps de rétention plus court, tandis que ceux qui interagissent plus fortement restent plus longtemps dans la colonne.
- ❑ **Polarité de l'éluant :** Dans la chromatographie liquide, par exemple, la polarité de l'éluant est cruciale, car elle peut influencer la séparation des composants. Par exemple, en chromatographie en phase normale, un éluant moins polaire favorise la rétention des composés polaires sur la phase stationnaire polaire. En revanche, en chromatographie en phase inverse, une phase mobile plus polaire entraîne plus facilement les composés polaires.
- ❑ **Vitesse de séparation :** La vitesse de déplacement de la phase mobile influe aussi sur la résolution de la séparation. Une phase mobile rapide réduit le temps d'analyse, mais peut entraîner une moindre séparation des composants (pics moins bien résolus).

Ainsi, la phase mobile est essentielle pour le mouvement des analytes dans la colonne et affecte directement l'efficacité de la séparation et la qualité des résultats analytiques.

7.3 Phase Stationnaire :

■ Définition :

La phase stationnaire est une composante clé dans les techniques de chromatographie. Il s'agit du matériau solide ou liquide immobilisé dans une colonne ou sur une surface où les différents composés de l'échantillon interagissent. Son rôle est de permettre la séparation des différents analytes en fonction de leurs interactions avec elle, et avec la phase mobile (le solvant ou le gaz qui traverse la phase stationnaire)



■ Principe :

Le principe de la phase stationnaire repose sur l'interaction différentielle des analytes (molécules présentes dans l'échantillon) avec la phase stationnaire. Lorsqu'un échantillon traverse la phase stationnaire avec l'aide de la phase mobile, les molécules qui interagissent fortement avec la phase stationnaire se déplacent plus lentement, tandis que celles qui interagissent moins passent plus rapidement. Cela conduit à une séparation des composants selon leur affinité avec la phase stationnaire.

■ Types de Phase Stationnaire :

Il existe plusieurs types de phases stationnaires utilisées selon le type de chromatographie employé :

+ Phase Stationnaire Solide (Chromatographie d'Adsorption) :

- Utilisée principalement dans la chromatographie d'adsorption, elle se compose de solides adsorbants tels que le gel de silice, l'alumine, ou le charbon actif.
- Les analytes se fixent temporairement à la surface des particules de la phase stationnaire, ce qui entraîne leur séparation.

+ Phase Stationnaire Liquide (Chromatographie de Partition) :

- Dans la chromatographie de partition, la phase stationnaire est une couche de liquide immobilisé sur un support solide.
- Exemples : l'octadécylsilane (C18) utilisé dans la chromatographie liquide haute performance (HPLC) est une phase stationnaire liquide commune.

+ Phase Stationnaire Polymère :

- Utilisée principalement dans la chromatographie d'échange d'ions.
- Composée de résines polymériques chargées qui interagissent avec les ions en fonction de leurs charges opposées.

+ Phase Stationnaire Gazeuse (Chromatographie en Phase Gazeuse - CPG) :

- La phase stationnaire est un liquide immobilisé ou un polymère recouvrant l'intérieur de la colonne capillaire.
- Les analytes se dissolvent dans ce liquide avant de se redistribuer dans la phase mobile.

■ Formes de Phase Stationnaire :

+ Colonnes Remplies :

- Les colonnes remplies contiennent des particules de phase stationnaire sous forme de poudre ou de gel.
- Utilisées dans la chromatographie en phase liquide.

✚ **Colonnes Capillaires :**

- Dans les colonnes capillaires (surtout pour la CPG), une fine couche de phase stationnaire est recouverte sur les parois internes d'un tube capillaire.

■ **Interactions avec la Phase Stationnaire :**

Les interactions analyte-phase stationnaire dépendent de plusieurs phénomènes physiques et chimiques :

✚ **Adsorption :** Interaction des analytes avec la surface d'une phase stationnaire solide.

- Exemples : Les interactions de Van der Waals, forces de London.

✚ **Partition :** Distribution des analytes entre la phase stationnaire liquide et la phase mobile.

- Les molécules se dissolvent temporairement dans la phase stationnaire avant de retourner dans la phase mobile.

✚ **Échange d'Ions :** Les analytes chargés échangent leurs ions avec les ions de la phase stationnaire chargée opposée.

- Utilisé pour les composés ioniques, acides aminés, protéines.

✚ **Exclusion Stérique :** La séparation se fait en fonction de la taille des molécules.

- Les petites molécules pénètrent dans les pores de la phase stationnaire et sont retenues plus longtemps.

■ **Lois Régissant les Interactions :**

✚ **Loi de Nernst (Partition) :**

- Décrit la distribution d'un analyte entre deux phases (stationnaire et mobile).

✚ **Isothermes d'Adsorption (Langmuir, Freundlich) :**

- Décrivent comment un analyte s'adsorbe à la surface d'une phase stationnaire solide.

■ **Choix de la Phase Stationnaire :**

✚ Le choix de la phase stationnaire dépend de plusieurs facteurs :

✚ **Nature des Analytes :** La polarité, la taille, la charge des analytes.

- Exemples :
 - Les analytes polaires utilisent souvent des phases stationnaires polaires comme la silice.
 - Les analytes non polaires utilisent des phases apolaires comme le C18.

✚ **Type de Chromatographie :**

- Pour la chromatographie d'adsorption, les solides comme la silice sont courants.
- Pour la chromatographie en phase inverse (HPLC), les phases comme C8 ou C18 sont choisies.

✚ Compatibilité avec la Phase Mobile :

- La phase stationnaire doit être stable et insoluble dans la phase mobile pour éviter la contamination et la détérioration.

■ Distribution de la Phase Stationnaire dans la Colonne :

✚ Sur la Surface :

- Dans la chromatographie en phase liquide, la phase stationnaire liquide est immobilisée sur une surface solide comme des billes de silice.

✚ À l'Intérieur des Pores :

- Pour la chromatographie d'exclusion stérique, la phase stationnaire comporte des pores dans lesquels les petites molécules peuvent pénétrer.

■ Exemples Pratiques :

✚ Chromatographie en Phase Inverse (HPLC) :

- Phase stationnaire : Octadécylsilane (C18)
- Phase mobile : Eau/méthanol
- Application : Séparation de composés organiques non polaires comme les huiles essentielles.

✚ Chromatographie d'Échange d'Ions :

- Phase stationnaire : Résine de sulfonate pour échange cationique.
- Application : Analyse des acides aminés.

7.4 Isotherme de sorption

Les **isothermes de sorption** sont des modèles mathématiques qui décrivent comment un soluté (ou un analyte) interagit avec une surface adsorbante (la phase stationnaire) à une température constante. Ces isothermes montrent la relation entre la quantité de soluté adsorbée par unité de masse d'adsorbant et la concentration du soluté en phase mobile.

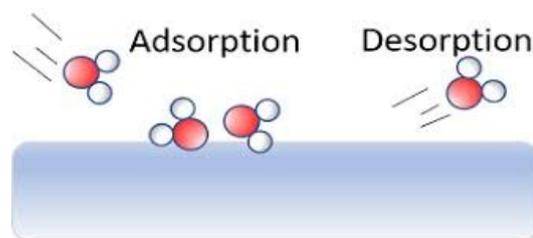


Fig : Phénomène de sorption

Les isothermes de sorption sont particulièrement importantes en chromatographie et en analyse des matériaux, car elles aident à comprendre le comportement de l'adsorption et à optimiser les processus de séparation.

■ Types d'Isothermes de Sorption :

Il existe plusieurs types d'isothermes d'adsorption qui sont couramment utilisés pour modéliser l'interaction entre l'adsorbant et l'adsorbé :

1. Isotherme de Langmuir :

• Principe :

- L'isotherme de Langmuir suppose que l'adsorption se produit sur une surface homogène avec un nombre fini de sites d'adsorption, où chaque site est équivalent.

- Une fois qu'une molécule est adsorbée sur un site, il n'y a pas d'interaction supplémentaire avec les molécules voisines, et chaque site ne peut accueillir qu'une seule molécule.

■ **Équation :**

$$q_e = \frac{K_L \cdot C_e \cdot q_{\max}}{1 + K_L \cdot C_e}$$

- q_e : Quantité adsorbée à l'équilibre (mg/g).
- q_{\max} : Capacité maximale d'adsorption (mg/g).
- K_L : Constante de Langmuir (L/mg).
- C_e : Concentration du soluté en phase mobile à l'équilibre (mg/L).

■ **Applications :**

- Utilisé pour les systèmes où l'adsorption atteint une saturation, par exemple dans la chromatographie d'adsorption pour la purification des composés organiques.

(a) **Isotherme de Freundlich :**

■ **Principe :**

- L'isotherme de Freundlich est un modèle empirique qui suppose une surface hétérogène avec des sites d'adsorption de différentes énergies. Ce modèle permet une adsorption multilayer.
- Il est souvent utilisé pour décrire des systèmes où l'adsorption est non linéaire et s'applique aussi bien pour les concentrations élevées que faibles.

■ **Équation :**

$$q_e = K_F \cdot C_e^{1/n}$$

- K_F : Capacité d'adsorption (mg/g)(L/mg).
- $1/n$: Indice d'hétérogénéité (sans unité).

Si $(1/n) < 1$, l'adsorption est favorable.

■ **Applications :**

- Utilisée pour les systèmes hétérogènes, par exemple dans la séparation des composés aromatiques complexes.

(b) **Isotherme de BET (Brunauer, Emmett, Teller) :**

■ **Principe :**

- L'isotherme de BET étend le modèle de Langmuir pour les adsorptions multilayers. Il considère que les molécules adsorbées sur la surface forment

plusieurs couches et que l'adsorption dans les couches successives suit une distribution géométrique.

■ **Équation :**

$$q_e = \frac{q_{\max} \cdot C_e \cdot K_{\text{BET}}}{(1 - C_e)[1 + (K_{\text{BET}} - 1) \cdot C_e]}$$

K_{BET} : Constante de BET.

■ **Applications :**

- Utilisé dans l'analyse des surfaces des solides, par exemple pour déterminer la surface spécifique des catalyseurs.

(c) **Isotherme de Temkin :**

■ **Principe :**

- L'isotherme de Temkin prend en compte les interactions entre l'adsorbant et l'adsorbat. Il suppose que la chaleur d'adsorption diminue de manière linéaire en raison des interactions.

■ **Équation :**

$$q_e = \frac{RT}{b} \ln(K_T C_e)$$

- b : Constante de Temkin.
- K_T : Constante d'équilibre d'adsorption.

■ **Applications :**

- Utilisée pour les systèmes où les interactions moléculaires sont significatives, par exemple dans la séparation des produits chimiques volatils.

■ **Applications Pratiques des Isothermes de Sorption en Chromatographie :**

Les isothermes d'adsorption aident à comprendre comment les analytes se distribuent entre la phase mobile et la phase stationnaire en chromatographie. Cela permet de prédire la rétention, l'élution et l'efficacité de la séparation.

- **Optimisation des conditions chromatographiques :** En connaissant l'isotherme, il est possible d'ajuster la phase mobile pour obtenir une séparation optimale.
- **Analyse de la capacité de la phase stationnaire :** Les isothermes fournissent des informations sur la capacité d'adsorption maximale de la phase stationnaire.
- **Conception de colonnes chromatographiques :** Les isothermes permettent de choisir le type et la quantité de phase stationnaire pour une séparation efficace.

■ **Exemple Pratique :**

Supposons que l'on souhaite séparer un mélange de deux composés A et B à l'aide de chromatographie liquide sur une colonne remplie de gel de silice (adsorbant solide). L'isotherme de Langmuir peut être utilisé pour modéliser la rétention des composés. Si le composé A présente une interaction plus forte avec la silice, son facteur de rétention sera plus élevé et il sera élué plus lentement que le composé B. En ajustant la polarité de la phase mobile, on peut moduler ces interactions pour obtenir une séparation efficace.

■ **Conclusion :**

Les isothermes de sorption sont des outils essentiels pour comprendre et prédire les interactions entre les analytes et la phase stationnaire en chromatographie. Les modèles de Langmuir, Freundlich, BET et Temkin fournissent des cadres mathématiques pour décrire ces interactions et optimisent ainsi le processus de séparation analytique.

7.5 Interaction intermoléculaire :

En chromatographie, les interactions intermoléculaires jouent un rôle clé dans le processus de séparation. Ces interactions se manifestent sous différentes formes, telles que les forces électrostatiques et les forces de Van der Waals. Voici une explication plus détaillée des principales forces intermoléculaires et leur rôle en chromatographie.

(a) Forces Électrostatiques :

■ **Définition :** Les forces électrostatiques sont des forces d'attraction ou de répulsion entre deux particules chargées. Elles résultent de l'interaction entre des charges positives et négatives.

■ **Principe :**

- En chromatographie, les forces électrostatiques se manifestent principalement dans les phases stationnaires d'échange d'ions.
- Les ions présents dans la phase mobile interagissent avec les sites chargés de la phase stationnaire.
- Plus l'interaction ionique est forte, plus la rétention de l'analyte est élevée.

■ **Exemple :**

En chromatographie d'échange cationique, les cations présents dans la solution interagissent avec les groupes sulfonates ($-\text{SO}_3^-$) fixés sur la phase stationnaire.

(b) Forces de Van der Waals :

Les forces de Van der Waals regroupent plusieurs types d'interactions intermoléculaires faibles, mais cumulatives, entre des molécules neutres. Elles se divisent en trois catégories principales : **forces de dispersion de London**, **forces d'induction de Debye**, et **forces d'orientation de Keesom**.

b.1. Forces de Dispersion de London :

Définition : Les forces de London sont des forces d'attraction qui apparaissent entre des molécules apolaires en raison de la formation de dipôles instantanés et temporaires.

Principe :

- Ces forces sont dues à une fluctuation temporaire de la distribution des électrons dans une molécule, créant un dipôle instantané.
- Elles augmentent avec la taille et la polarisation des molécules.

Exemple : En chromatographie sur phase inverse (HPLC C18), les composés apolaires tels que les hydrocarbures interagissent avec la phase stationnaire apolaire via des forces de dispersion de London, augmentant leur rétention.

b.2. Forces d'Induction de Debye :

Définition: Les forces de Debye (ou forces d'induction) sont des forces d'attraction entre une molécule polaire (ayant un dipôle permanent) et une molécule apolaire.

Principe :

- La molécule polaire induit un dipôle temporaire dans la molécule apolaire par attraction des électrons.
- Ces forces sont influencées par la polarité de la molécule polaire et la capacité de polarisation de la molécule apolaire.

Exemple : Lors de l'analyse de mélanges avec des solvants polaires (comme l'éthanol), la molécule de solvant induit un dipôle dans l'analyte, augmentant les interactions de Debye et la rétention.

b.3. Forces d'Orientation de Keesom :

Définition : Les forces de Keesom (ou interactions dipôle-dipôle) sont des forces d'attraction entre deux molécules polaires possédant des dipôles permanents.

Principe :

- Les dipôles permanents de deux molécules s'alignent de manière à minimiser l'énergie, créant une attraction entre les pôles opposés.
- Ces forces dépendent de la température : elles diminuent lorsque la température augmente.

Exemple : Dans une phase stationnaire polaire (comme la silice), les analytes polaires tels que les cétones ou les alcools sont retenus par des interactions dipôle-dipôle avec les groupes silanol (Si-OH).

(c) Liaisons Hydrogène :

Définition : La liaison hydrogène est une interaction forte entre un atome d'hydrogène lié à un atome électronégatif (comme O, N, ou F) et un autre atome électronégatif possédant un doublet libre d'électrons.

Principe :

- La liaison hydrogène influence fortement la rétention des analytes en chromatographie.
- Plus il y a de possibilités de liaison hydrogène, plus l'analyte est retenu dans la colonne.

Exemple : Dans la chromatographie en phase normale (HPLC), un analyte contenant des groupes hydroxyles (par exemple, le glucose) formera des liaisons hydrogène avec la phase stationnaire, augmentant sa rétention.

(d) Interactions Hydrophobes :

Définition : Les interactions hydrophobes se produisent lorsque des molécules apolaires se regroupent pour éviter le contact avec une phase aqueuse.

Principe :

- Ces interactions jouent un rôle important en chromatographie sur phase inverse (HPLC), où les analytes apolaires sont retenus par la phase stationnaire hydrophobe (comme C18).
- Plus l'analyte est apolaire, plus l'interaction hydrophobe est forte et plus la rétention est élevée.

Exemple : Dans l'analyse des hydrocarbures aromatiques, ceux-ci montrent une forte rétention dans une colonne C18 à cause des interactions hydrophobes.

☒ Choix de la Phase Stationnaire :

Le choix de la phase stationnaire dépend des interactions intermoléculaires souhaitées pour la séparation :

- **Phases apolaires** (C18, C8) pour des analytes apolaires (hydrocarbures).
- **Phases polaires** (silice, cyano) pour des analytes polaires (alcools, amines).
- **Phases d'échange d'ions** pour des analytes ionisés (acides aminés, protéines).

☒ Distribution dans la Colonne :

La répartition des analytes entre la phase mobile et la phase stationnaire dépend de :

- **L'affinité** de l'analyte pour la phase stationnaire (basée sur les interactions intermoléculaires).
- **La vitesse d'écoulement** de la phase mobile.
- **Le type de phase stationnaire** utilisé (surface recouverte d'un film, particules solides).

Les analytes s'adsorbent et désorbent en continu à la surface de la phase stationnaire, ce qui permet la séparation au fur et à mesure de l'avancement dans la colonne.

■ Conclusion :

Les interactions intermoléculaires sont déterminantes dans les mécanismes de séparation en chromatographie. Comprendre ces forces permet de sélectionner la phase stationnaire adéquate et d'optimiser les conditions de la phase mobile pour une séparation efficace des analytes, tout en améliorant la résolution et l'efficacité de l'analyse.

Cela inclut une compréhension approfondie des forces de London, de Debye et de Keesom, ainsi que des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogène, qui influencent la rétention et la sélectivité des analytes dans une analyse chromatographique.

7.6 Introduction à la théorie cinétique en chromatographie

La théorie cinétique en chromatographie explique comment les solutés se séparent en fonction de différents facteurs influençant l'efficacité de séparation. L'efficacité est mesurée en termes de nombre de plateaux théoriques. Les équations de **Van Deemter, Knox et Giddings** sont des modèles mathématiques utilisés pour décrire l'effet de ces facteurs sur la hauteur équivalente d'un plateau théorique (HETP).

(a) Équation de Van Deemter

- **Formule :**

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

$$B = 2\gamma D_M$$

- Où :

- H : Hauteur équivalente d'un plateau théorique (HETP)
- A : Terme d'éddy (diffusion turbulente)
- B: Terme de diffusion longitudinale
- C : Terme de transfert de masse
- u : Vitesse linéaire de la phase mobile : *vitesse réduite*
- γ facteur de **tortuosité** > 1
- D_M : Coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile

- **Explication :**

- **Terme A (Diffusion en tourbillons) :** Lié aux chemins multiples que les molécules peuvent emprunter à travers les particules de la phase stationnaire.
- **Terme B/u (Diffusion longitudinale) :** Plus significatif à basse vitesse de la phase mobile. Les molécules diffusent le long de la colonne, ce qui élargit les pics.
- **Terme C·u (Transfert de masse) :** Plus important à haute vitesse. Le transfert de masse est la résistance au déplacement des solutés entre les phases mobile et stationnaire.

▣ **Application :** Cette équation aide à déterminer la vitesse optimale de la phase mobile qui minimise H et maximise l'efficacité de la séparation.

(b) Équation de Knox

- **Formule :**

$$H = A' + B' \cdot u^{0.5} + C' \cdot u$$

- Où A', B' and C' sont des constantes spécifiques liées à la nature de la colonne et des solutés.
- **Application :** L'équation de Knox est utile pour des colonnes modernes à haute performance (HPLC) où le transfert de masse est un facteur limitant à haute vitesse.

(c) Équation de Giddings

Formule :

$$H = A + \frac{B}{u} + C_1 \cdot u + C_2 \cdot u^2$$

➤ Où C_1 et C_2 représentent différents termes de transfert de masse dans la phase mobile et stationnaire.

■ **Explication :**

- Ajoute un terme supplémentaire ($C_2 \cdot u^2$) pour représenter la dispersion supplémentaire à des vitesses très élevées.
- Prend en compte les effets complexes du transfert de masse et des interactions moléculaires dans des conditions extrêmes.

■ **Application :** Utile pour décrire le comportement des solutés dans des colonnes utilisant des phases stationnaires modernes ou des phases mobiles à haute viscosité.

■ **Application de la théorie cinétique dans l'analyse des chromatogrammes**

- **Lecture d'un chromatogramme :** En utilisant ces équations, on peut estimer la hauteur des pics, leur largeur à mi-hauteur, et évaluer la qualité de séparation.
 - Une faible valeur de HHH indique une colonne efficace avec des pics étroits.
 - Une grande efficacité se traduit par un nombre élevé de plateaux théoriques.
- **Exemple :** Lors de l'analyse d'un mélange complexe, l'optimisation de la vitesse de la phase mobile en utilisant l'équation de Van Deemter permet de réduire le temps d'analyse tout en conservant une bonne résolution.

7.7 Perte de charge dans une colonne : (loi de DARCY)

La **perte de charge** dans une colonne chromatographique est une diminution de la pression à travers la colonne lorsque la phase mobile s'écoule à travers la phase stationnaire. Cette perte de pression est essentielle à comprendre car elle influence directement le débit, la durée d'analyse et l'efficacité de la séparation.

Introduction à la perte de charge

Dans le contexte de la chromatographie, la perte de charge se réfère à la différence de pression entre l'entrée et la sortie de la colonne. Cette diminution de pression est due à la résistance de l'écoulement de la phase mobile à travers les particules de la phase stationnaire.

■ **Principe de la perte de charge (Loi de Darcy)**

La **loi de Darcy** est utilisée pour décrire l'écoulement des fluides dans un milieu poreux, et elle s'applique aux colonnes chromatographiques pour modéliser la perte de charge.

Équation de Darcy :

$$\Delta P = \frac{\eta L v}{K^0} \quad \text{and} \quad K^0 = \frac{d_p^2}{180} \times \frac{\varepsilon^3}{(1 - \varepsilon)^2}$$

- ΔP : Perte de charge ou différence de pression (Pa)
- η : Viscosité de la phase mobile (Pa.s)
- L : Longueur de la colonne (m)

- v : Vitesse linéaire de la phase mobile (m/s)
- k^0 : Perméabilité de la phase stationnaire (m^2)
- dp : Diamètre des particules de la phase stationnaire (m)
- ❑ **Viscosité (η)** : Mesure de la résistance de la phase mobile à l'écoulement. Une viscosité plus élevée entraîne une perte de charge plus importante.
- ❑ **Longueur de la colonne (L)** : Plus la colonne est longue, plus la perte de charge est élevée.
- ❑ **Vitesse linéaire (v)** : Plus la vitesse de la phase mobile est élevée, plus la perte de charge augmente.
- ❑ **Perméabilité (k)** : Mesure de la capacité de la phase stationnaire à laisser passer la phase mobile. Une perméabilité faible (due à des particules fines et denses) entraîne une perte de charge élevée.
- ❑ **Diamètre des particules (dp)** : Des particules de diamètre plus petit augmentent la surface de contact et la résistance à l'écoulement, ce qui accroît la perte de charge.

■ Relation entre la perte de charge et l'efficacité de séparation

La perte de charge influence directement le débit et la pression maximale qu'une colonne peut supporter. Si la pression devient trop élevée :

- Il peut y avoir une déformation ou une rupture de la colonne.
- Le débit optimal de la phase mobile ne peut pas être maintenu, ce qui affecte l'efficacité et la résolution des pics chromatographiques.

■ Optimisation de l'écoulement :

- **Choix de la phase stationnaire** : L'utilisation de particules plus grandes ou de phases stationnaires avec une plus grande perméabilité peut réduire la perte de charge.
- **Vitesse de la phase mobile** : Il est crucial d'ajuster la vitesse pour éviter une augmentation excessive de la pression tout en maintenant une bonne efficacité de séparation.

■ Application pratique de la loi de Darcy en chromatographie

En chromatographie HPLC, la perte de charge est un facteur critique lors du choix des paramètres d'analyse. Par exemple :

- Pour une séparation rapide avec un débit élevé, on utilise des colonnes courtes avec des particules plus grandes pour minimiser la perte de charge.
- Dans les analyses nécessitant une haute résolution, des particules de phase stationnaire plus fines sont utilisées, ce qui augmente la perte de charge. Dans ce cas, les systèmes doivent être équipés de pompes capables de supporter des pressions élevées.

7.8 Optimisation des conditions d'une analyse :

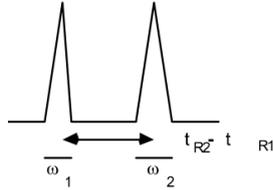
L'idéal est d'obtenir une résolution élevée en temps très courts :

- ❑ On peut envisager d'augmenter la longueur de la colonne (la vitesse d'analyse va augmenter ainsi que la perte de charge)
- ❑ On peut diminuer le diamètre des particules (HEPT diminue, mais la perte de charge augmente)

- ❑ On peut augmenter la vitesse de la phase mobile (HEPT augmente la pression aussi).

La résolution R_s entre deux pics est définie par la relation :

$$R = 2 \times \left(\frac{t_{R1} - t_{R2}}{\sigma_1 + \sigma_2} \right)$$



- Optimisation de la résolution :

Il faut augmenter R_s

$$\begin{cases} R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{k_2'}{1 + k_2'} \\ R_s = \frac{\sqrt{N_{ef}}}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \end{cases} \quad \text{with } N_{ef} = 16 \left(\frac{t_R - t_0}{\sigma} \right)^2$$

N_{ef} nombre des plateaux efficaces

- La capacité de pics d'une colonne est définie par :

$$n = 1 + \sqrt{N/16} \ln \left(\frac{t_0}{t_\alpha} \right)$$

$(t_\alpha; t_0)$ Temps de rétention du premier et du dernier pic du chromatogramme, d'après HERMAN (1985) : Montre pour $n = 60$, on a 90% de probabilité de séparer 9 composés.

7.8 Optimisation des Conditions d'une Analyse Chromatographique

L'optimisation des conditions analytiques en chromatographie est essentielle pour obtenir des séparations efficaces, des analyses rapides et des résultats reproductibles. Cette étape vise à ajuster divers paramètres chromatographiques afin d'améliorer la résolution, réduire le temps d'analyse et assurer une sensibilité optimale.

- Objectifs de l'optimisation :

- Améliorer la résolution (R) : Séparer efficacement les composés proches.
- Réduire le temps d'analyse (tR) : Accélérer le processus analytique.
- Obtenir une reproductibilité maximale : Garantir des résultats cohérents sur plusieurs analyses.
- Augmenter la sensibilité : Assurer une détection précise des faibles concentrations.

- Paramètres influençant l'optimisation :

- ❑ Phase mobile :

- Composition de la phase mobile :

- En chromatographie liquide (HPLC), varier le ratio eau/solvant organique (acétonitrile, méthanol, etc.) pour ajuster la polarité.

- En chromatographie gazeuse (GC), modifier le type de gaz vecteur (hélium, azote, hydrogène) ou son débit.

➤ **pH et concentration des tampons** : En chromatographie liquide, le pH influence la charge des analytes et la phase stationnaire. Il doit être ajusté pour éviter la dégradation des composés sensibles.

❑ Phase stationnaire :

➤ **Nature de la phase stationnaire** : Adapter le type de phase stationnaire (polaire, apolaire, chirale, etc.) selon la polarité ou la chiralité des analytes.

➤ **Dimensions de la colonne** : Une colonne de faible diamètre et une faible taille de particules (en HPLC) augmentent l'efficacité, mais augmentent aussi la pression.

❑ **Débit de la phase mobile** : En chromatographie liquide ou gazeuse, ajuster le débit permet de réduire les temps de rétention et d'améliorer la résolution. Cependant, un débit trop élevé peut diminuer l'efficacité (effet sur le nombre de plateaux théoriques).

❑ Température :

➤ En chromatographie gazeuse, une température élevée réduit les temps de rétention, mais peut affecter la stabilité des analytes thermolabiles.

➤ En chromatographie liquide, l'augmentation de la température peut diminuer la viscosité de la phase mobile, facilitant le débit.

❑ **Longueur de la colonne** : Une colonne plus longue augmente la résolution, mais au prix d'un temps d'analyse plus long.

❑ **Volume d'injection** : Un volume d'injection trop important peut saturer la colonne et réduire l'efficacité de la séparation.

8. Injecteurs/injection

8.1 Définition : Un injecteur est un composant essentiel du système HPLC qui permet d'introduire l'échantillon dans le flux de phase mobile avant son entrée dans la colonne. Il assure une injection précise et reproductible.

8.2 Principe :

L'injecteur introduit une quantité contrôlée d'échantillon dans la phase mobile en mouvement. Cela se fait sans perturber le débit ni la pression du système. L'échantillon est généralement mélangé à la phase mobile avant de passer dans la colonne.

8.3 Différents Types d'Injecteurs :

✓ Selon le type d'échantillon :

- Échantillons liquides : injecteurs classiques.
- Échantillons gazeux : injecteurs spécifiques (en chromatographie en phase gazeuse - GC).

✓ Selon le type de chromatographie :

- **HPLC classique** : injecteurs manuels et automatiques.
- **Chromatographie UHPLC** : injecteurs haute précision adaptés aux pressions élevées.

✓ Types courants d'injecteurs :

- **Boucle d'injection (Loop Injector)** : Permet une injection reproductible d'un volume fixe.
- **Injecteurs automatiques (Autosampler)** : Automatisent l'injection pour plusieurs échantillons, réduisant les erreurs humaines.
- **Injecteurs en ligne** : Intégrés dans le flux de phase mobile pour des échantillons continus.

8.4 Méthodologie d'Injection :

- Préparer une seringue ou utiliser un échantillonneur automatique.
- Introduire l'échantillon dans la boucle d'injection ou directement dans le système en fonction du type d'injecteur.
- Activer le système pour que l'échantillon soit entraîné par la phase mobile vers la colonne.

8.5 Comment Injecter l'Échantillon :

- ✓ **Quantité d'échantillon injecté :**
 - Dépend de la capacité de la colonne et de la concentration de l'échantillon.
 - Généralement entre 1 et 100 μL pour les colonnes HPLC standard.
- ✓ **Astuces pour une injection optimale :**
 - Utiliser une seringue propre et sans bulles d'air.
 - S'assurer que l'échantillon est homogène.
 - Injecter lentement pour éviter les perturbations dans le système.

8.5 Préparation de l'Échantillon :

- ✓ **Filtration** : Utiliser des filtres de 0,22 μm ou 0,45 μm pour éliminer les particules qui pourraient obstruer la colonne.
- ✓ **Dissolution** : Dissoudre l'échantillon dans un solvant compatible avec la phase mobile.
- ✓ **Équilibrage** : Vérifier que la concentration est adaptée pour éviter les saturations ou les interférences.

8.6 Normes de l'Échantillon :

- ✓ **Pureté** : Les échantillons doivent être exempts de contaminants pouvant affecter les résultats.
- ✓ **Compatibilité** : Le solvant de dissolution doit être compatible avec la phase mobile pour éviter la précipitation ou les mélanges incompatibles.
- ✓ **Concentration** : Ajustée selon les besoins analytiques et les limites de détection du détecteur.

8.7 Standards et Leur Préparation :

- **Définition** : Les standards sont des substances de référence utilisées pour la calibration de l'instrument.
- **Préparation** :

- Peser avec précision une quantité connue de standard.
- Dissoudre dans un solvant approprié pour obtenir une concentration exacte.
- **Normes :**
- Stocker les standards dans des conditions appropriées pour éviter leur dégradation.
- Préparer des solutions étalons à partir du standard pour calibrer le système.

9. Phase Mobile

9.1 Définition : La phase mobile est le liquide en mouvement dans le système HPLC. Elle transporte les analytes à travers la colonne et joue un rôle crucial dans leur séparation.

9.2 Différents Types de Phases Mobiles :

✓ Selon la polarité :

- **Polaire :** Eau, acides faibles, tampons (utilisés en phase normale).
- **Apolaire :** Solvants organiques comme le méthanol ou l'acétonitrile (utilisés en phase inversée).
- **Mixte :** Mélange d'eau et de solvants organiques pour moduler la polarité.

✓ Selon le type d'échantillons :

- Échantillons polaires : phases mobiles apolaires.
- Échantillons apolaires : phases mobiles polaires.
- Biomolécules : Tampons spécifiques pour maintenir la stabilité des molécules.

9.3 Comment Régler le Débit de la Phase Mobile :

- Utiliser une pompe pour ajuster le débit.
- Le débit est exprimé en mL/min et doit être adapté à la colonne utilisée (généralement 0,5 à 2 mL/min).
- Équilibrer la colonne avec la phase mobile avant l'injection de l'échantillon.

9.4 Les Pompes :

✓ Rôle des Pompes :

- Maintenir un débit constant et précis de phase mobile.
- Résister à des pressions élevées jusqu'à 600 bar.

✓ Types de Pompes :

- **Pompes isocratiques :** Utilisent une seule composition de phase mobile.
- **Pompes gradient :** Permettent de varier la composition de la phase mobile pendant l'analyse (utilisées pour les mélanges complexes).