

Centre universitaire Abdelhafid Boussouf, Mila
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie

Instrumentation et Maintenance en Biotechnologie

1^{ère} Année Master Biotechnologies Et Amélioration des Plantes

2021-2022

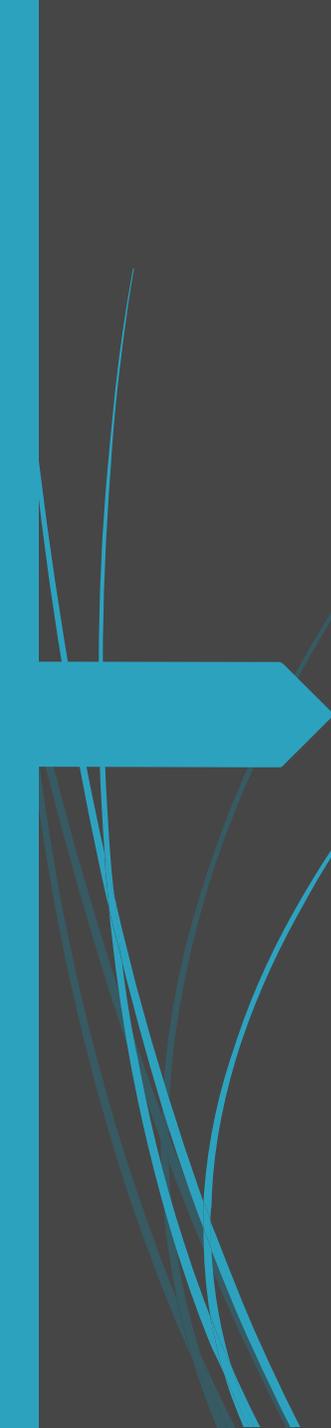
Dr. Bouchekrit M.



Les techniques chromatographiques

chromatographiques

Les techniques



La chromatographie est un procédé de séparation et d'analyse des constituants d'un mélange gazeux, liquide ou solide à l'aide d'un solvant mobile (phase mobile) qui les entraîne à travers une phase stationnaire fixe.



Techniques chromatographiques



HPLC

CPG



CPG

CBC

Définitions

La chromatographie en phase gaz (CPG) est une méthode de séparation de composés susceptibles d'être vaporisés par chauffage (sans décomposition). La séparation se fait dans une colonne soit par partage soit par adsorption. Elle permet :

- 1 • • • • ➤ **La microanalyse (du μg au mg)**
- 2 • • • • ➤ **La séparation de mélanges complexes**
- 3 • • • • ➤ **Une analyse qualitative et quantitative**
- 4 • • • • ➤ **Des analyses dans de nombreux domaines d'applications.**

Principe

Le principe de séparation repose sur une différence de répartition des composés d'un mélange entre deux phases:

- Une phase mobile (le gaz vecteur),
- Une phase stationnaire.

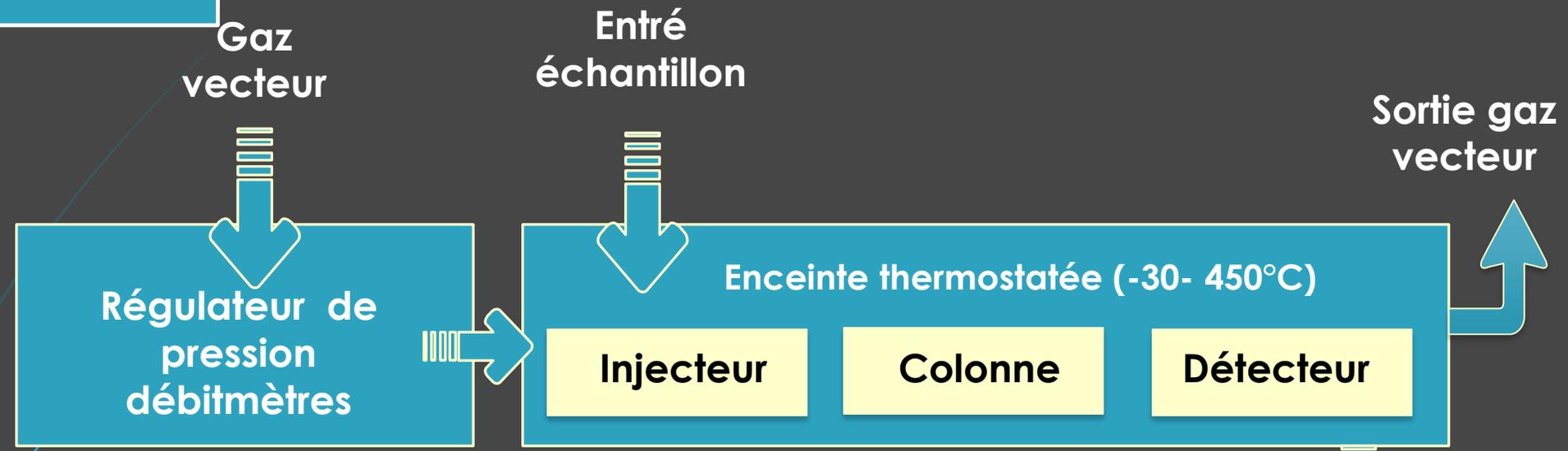
La séparation est en fonction de la polarité et la volatilité



COMMENT FONCTIONNENT LES COLONNES GC

Le gaz vecteur entraîne l'échantillon dans la colonne de séparation thermostatée.

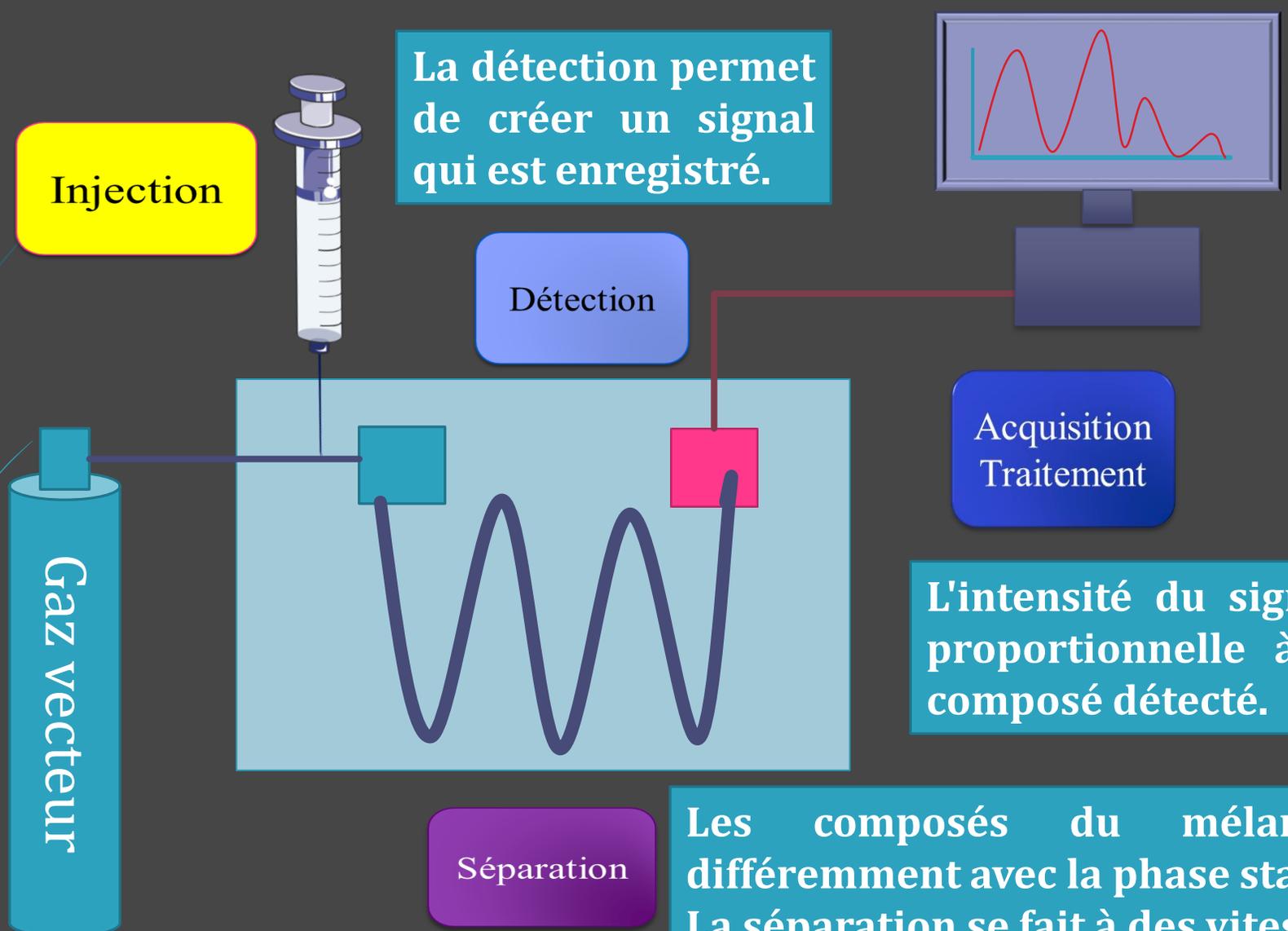
L'échantillon est injecté sous forme d'un fluide et vaporisé dans l'injecteur.



Les composés se répartissent différemment dans les 2 phases, se déplacent donc à des vitesses différentes puis sortent à des temps différents.

Traitement de signal

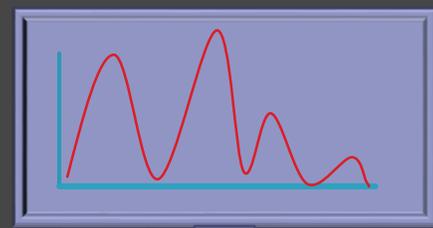
A leur sortie, ils sont détectés et un pic apparaît sur l'enregistreur.



Injection

La détection permet de créer un signal qui est enregistré.

Détection



Acquisition
Traitement

L'intensité du signal de sortie est proportionnelle à la quantité de composé détecté.

Gaz vecteur

Séparation

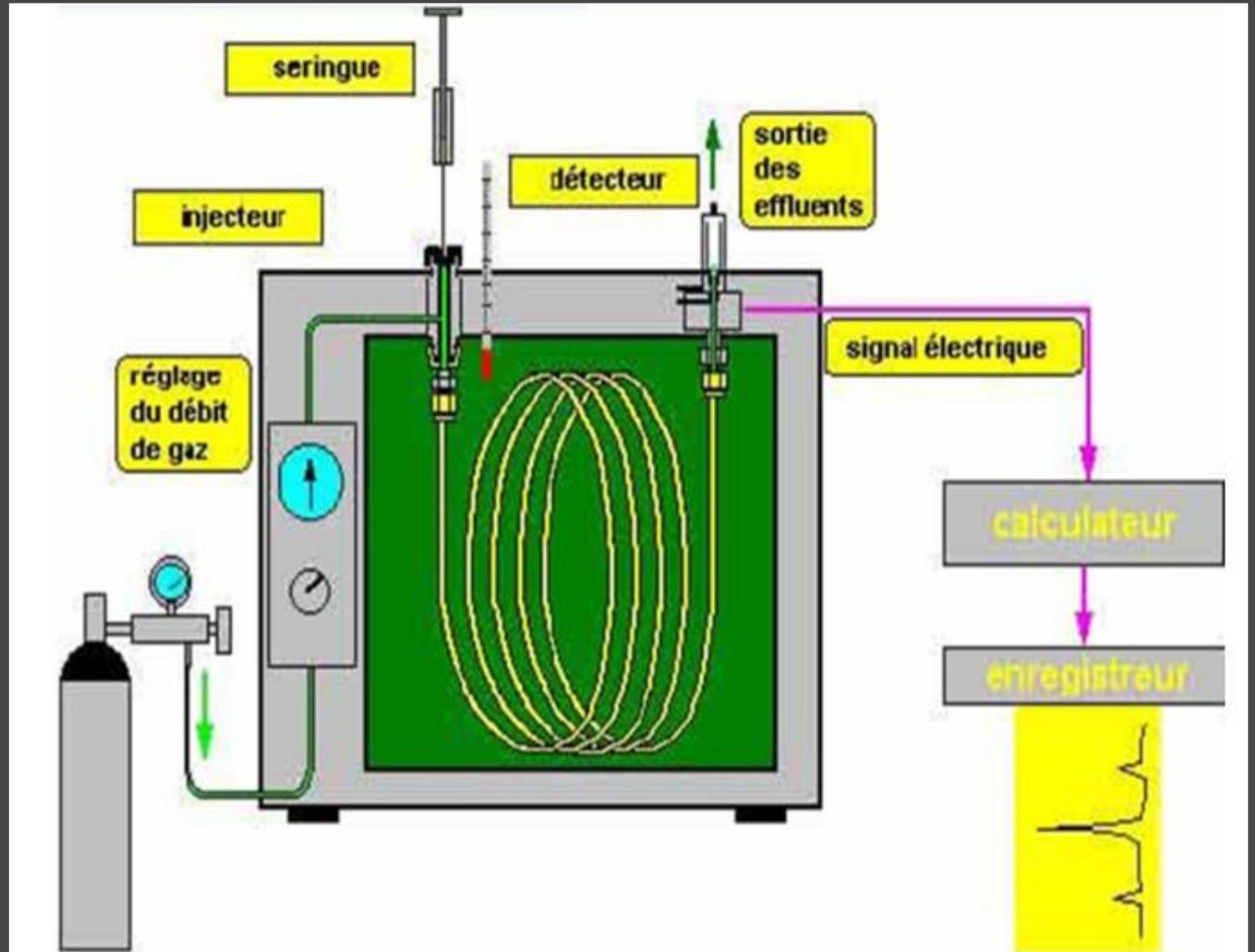
Le gaz vecteur pousse le mélange injecté dans la colonne

Les composés du mélange interagissent différemment avec la phase stationnaire et La séparation se fait à des vitesses différentes. La séparation est en fonction de l'affinité à la PS et la solubilité dans la PM

Matériels

Un appareil de CPG comprend:

1. Un injecteur,
2. une colonne contenue dans une enceinte thermostatée (four)
3. Un détecteur relié à Un intégrateur ou un ordinateur sur lequel apparaît le chromatogramme.



Les gaz



Gaz vecteur

Un gaz inerte: l'hélium, le N_2 ou le H_2 .

L'absence d'interaction entre le gaz et les solutés.

Il sert à entrainer le soluté depuis son injection jusqu'à sa sortie de la colonne.



Gaz de combustion

les plus utilisés sont l'hydrogène et l'oxygène.

la combustion de la matière organique et la détection.

Le four

Le four est destiné à recevoir les colonnes et à les porter à la température désirée

C'est un four à bain d'air, contient
Une résistances chauffantes
Un système de ventilation
Un système de brassage pour l'homogénéisation de la température.



Le four

La température du four peut-être :

stable et identique du début
à la fin de la manipulation

programmée par palier successif



conditions isothermes



en gradients

La colonne



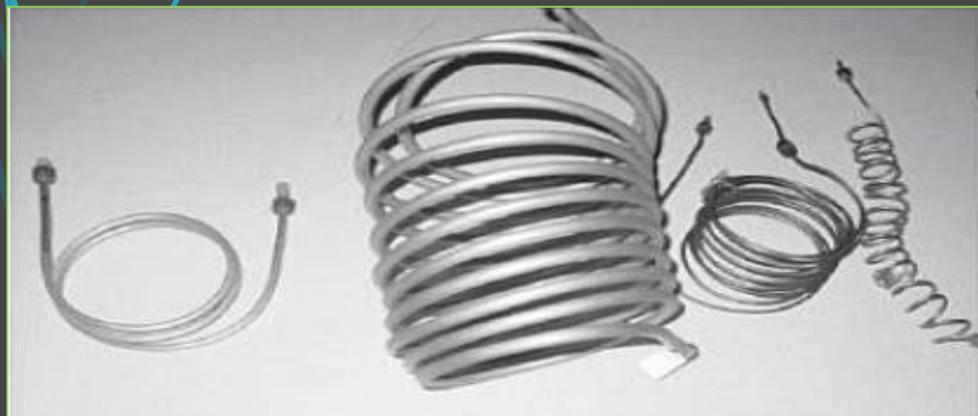
**Les colonnes ordinaires
(remplies)**



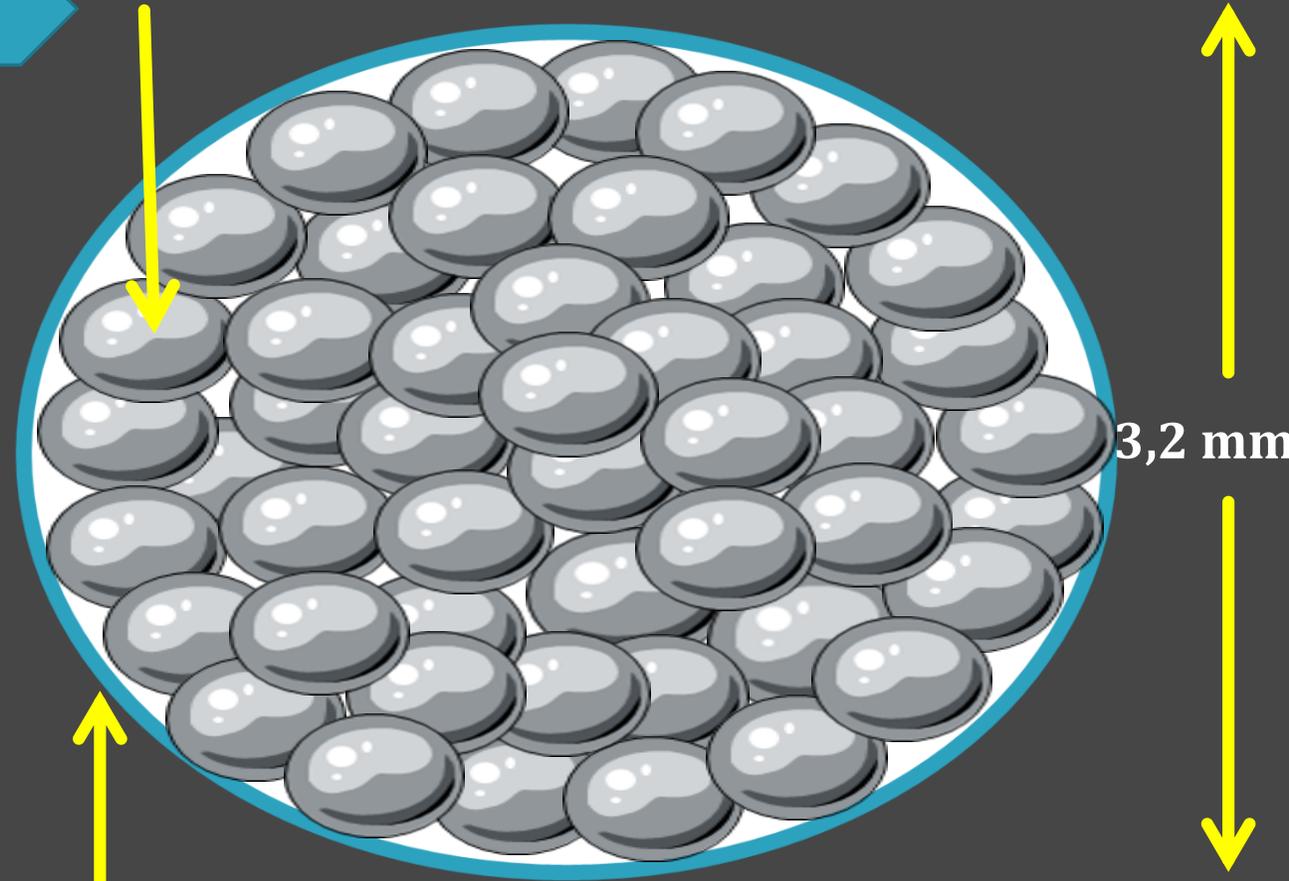
**Les colonnes capillaires
(à tube ouvert)**

Les colonnes remplies

Elles sont en tubes d'acier ou verre. Elles sont remplies d'un support poreux et inerte sous forme de grains sphériques sur lequel est imprégnée la phase stationnaire.



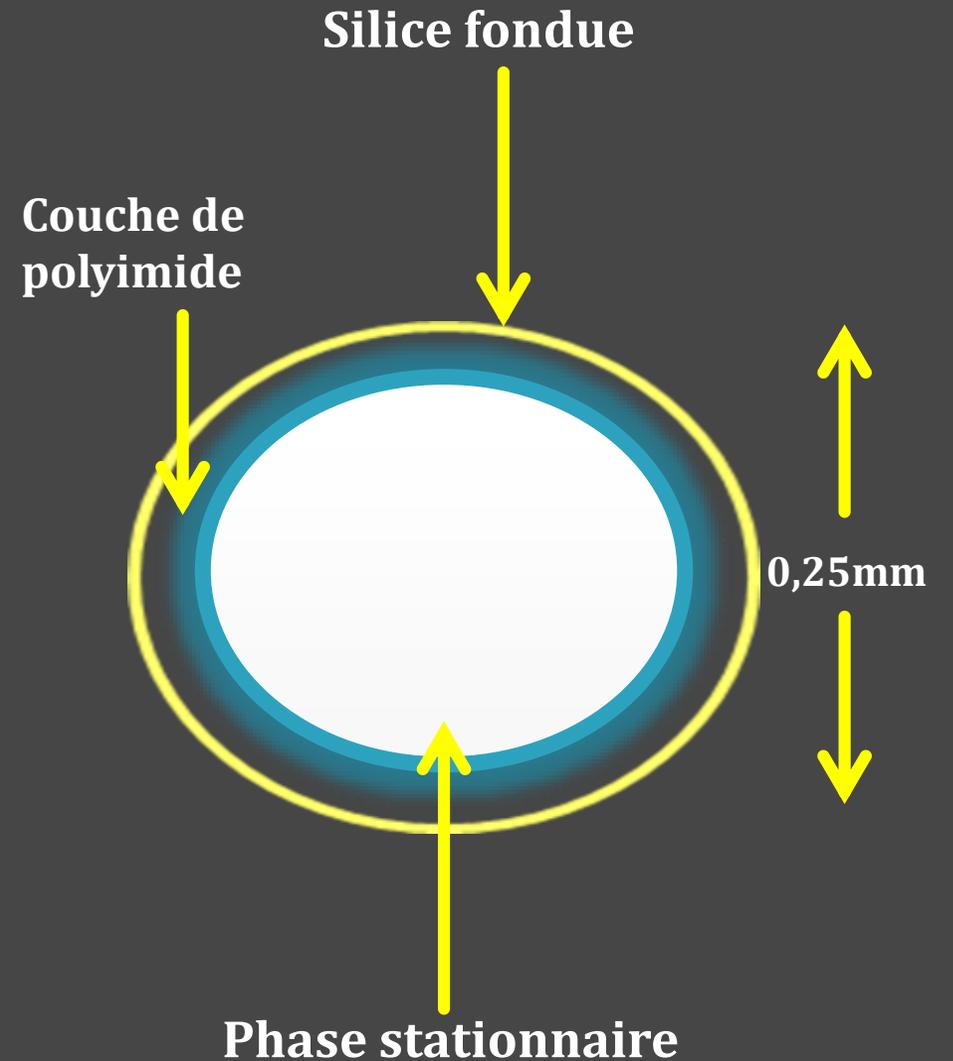
Granules de phase stationnaire



Tube en acier
ou verre

Les colonnes capillaires

Elles sont en tubes 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



Les injecteurs

1



Injecteur à vaporisation directe

2



Injecteur avec système de fuite

3



Injecteur à température programmable (PTV)

L'injecteur à vaporisation directe

Pour les colonnes capillaires à faible débit.

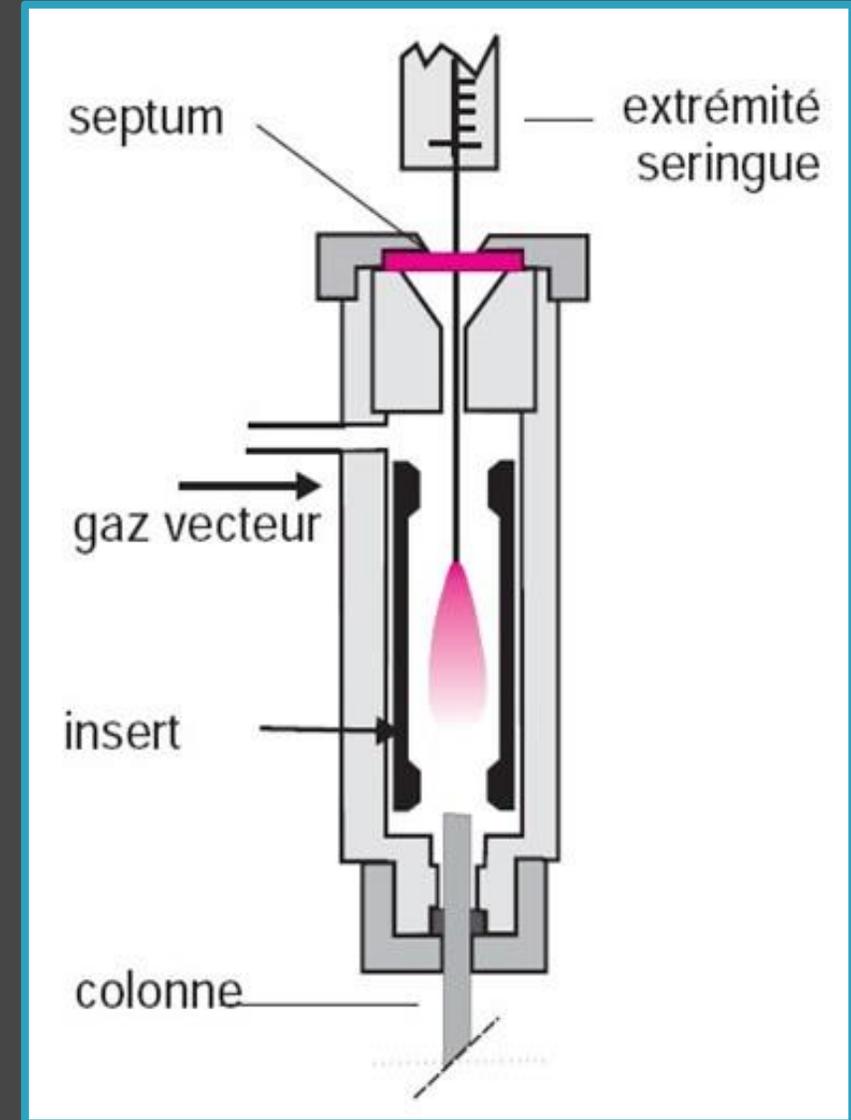


Les quantités de composés dans la colonne doivent être très petites pour éviter la saturation des colonnes.

pour les colonnes remplies et les colonnes capillaires de gros diamètre.



Tout l'échantillon introduit par la seringue est entraîné dans la colonne



L'injecteur à vaporisation directe

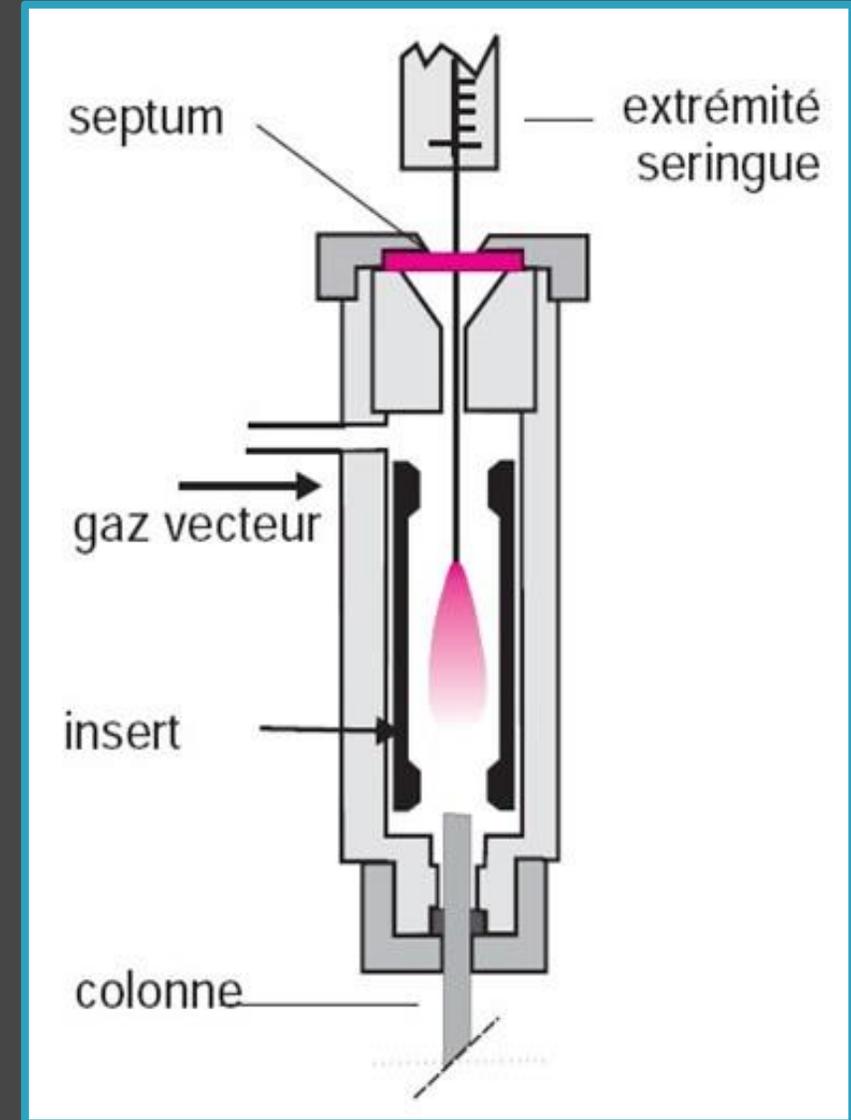
Pour les colonnes capillaires à faible débit.



pour les colonnes remplies et les colonnes capillaires de gros diamètre.



Les volumes injectés doivent être très faibles (saturation même pour des $v_{\text{injectés}} = 0,1\mu\text{L}$).
l'utilisation de solutions très diluées entraîne des perturbations dues à l'excès de vapeur de solvant.



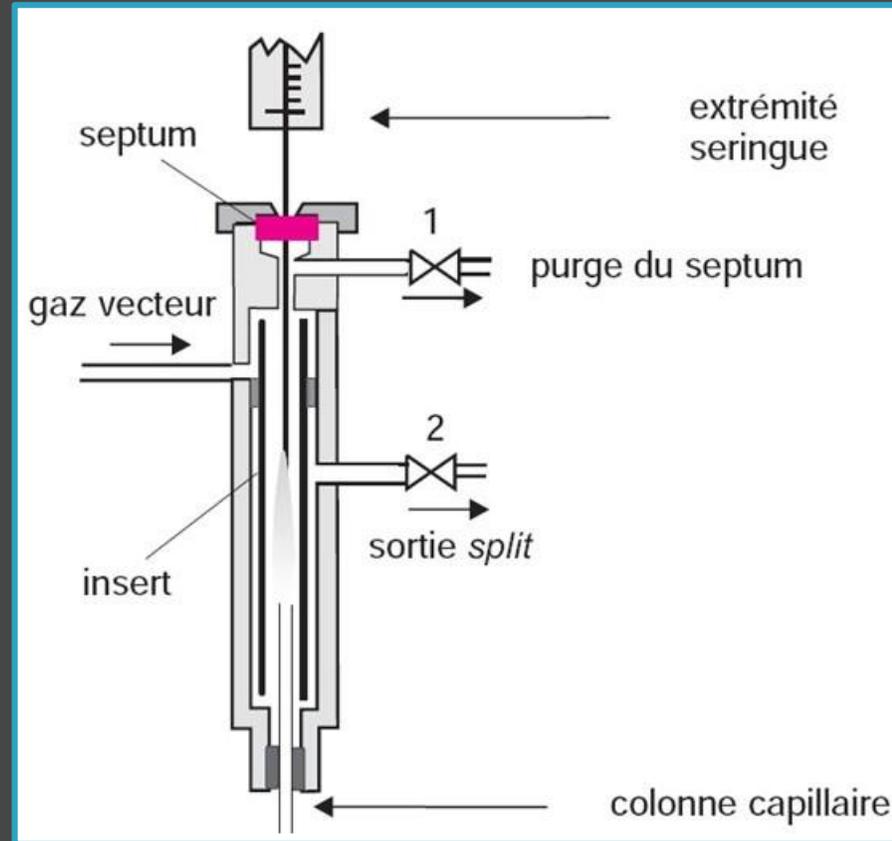
L'injecteur avec système de fuite

Une grande partie de l'échantillon injecté, vaporisé et mélangé au gaz vecteur est éliminée de l'injecteur par une vanne de fuite. Donc, une petite fraction du mélange pénètre dans la colonne.



**Avec division
(mode split)**

**Injection avec une
vanne de fuite ouverte**



**Sans division
(mode splitless)**

**La vanne de fuite fermée
environ 1 minute après
l'injection**

Les détecteurs

Après séparation, les différents constituants du mélange sont détectés par des détecteurs utilisant diverses propriétés physiques comme:

1



La conductivité thermique (détecteur à catharomètre)

2



La variation des propriétés électriques d'une flamme (détecteur à ionisation de flamme)

3



La capture d'électrons par les différentes espèces moléculaires séparées (détecteur par capture d'électrons).

Les détecteurs

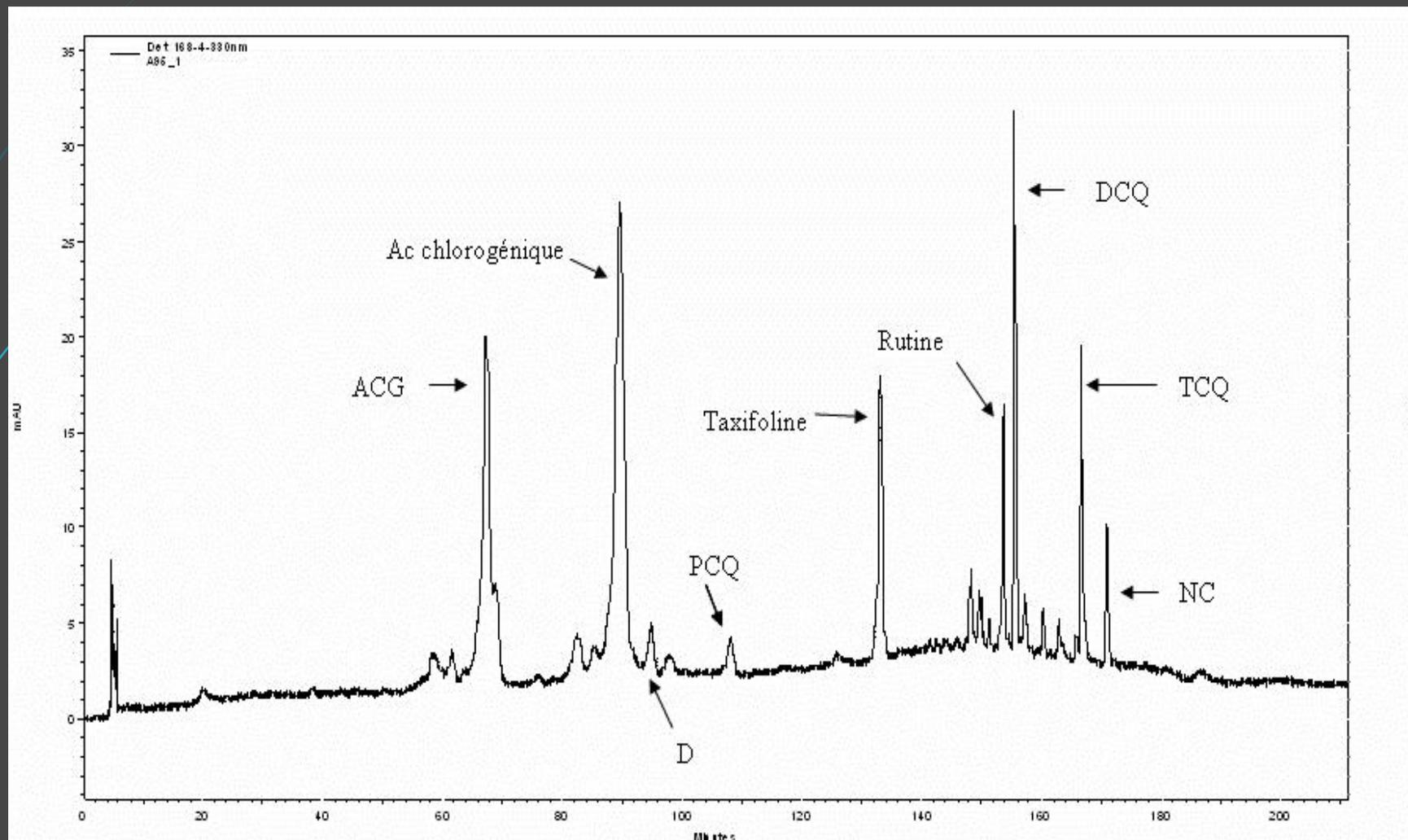
DETECTEUR	Gaz vecteur	Sensibilité	Applications
Catharomètre	H ₂ /He	1 à 10 ng	Tous composés
FID	He/N ₂	20 à 100 pg	Composés organiques
Capture d'e ⁻	N ₂	0,1 pg	Composés halogénés
Thermoionique	N ₂	P :1 pg / N :10 pg	Composés avec N ou P
Photométrie de flamme	N ₂ /H ₂	P : 10 pg S : 1 ng	Composés avec S ou P

N: composé azoté, P: composé phosphoré.

L'enregistreur

Il s'agit d'un ordinateur qui récupère toutes les données issues des détecteurs, trace les chromatogrammes et intègre la surface des pics. Il imprime un rapport d'analyse donnant les temps de rétentions et les surfaces de chaque pic. On peut le programmer pour qu'il fasse seul les divers calculs conduisant aux concentrations à partir de chromatogrammes étalon et des chromatogrammes des mélanges analysés.

L'enregistreur



L'enregistreur

Molécule témoin	Temps de rétention tr(min)
M1	tr1
M2	tr2
M3	tr3

