

NOM Prénom : **DARCEL Christophe / PICQUET Michel** Jeudi 18 Décembre 2003

Module LCP3 : Méthodes d'analyses Spectroscopiques et Chromatographiques

Examen de Chromatographie

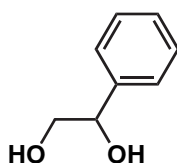
CORRIGÉ

Aucun document n'est autorisé - Les portables doivent être éteints et rangés.

On rappelle qu'en chromatographie, pour une phase mobile de vitesse moyenne \bar{u} , l'équation de van Deemter s'exprime par la relation simplifiée suivante :

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C \cdot \bar{u} \quad \text{où } B \text{ est proportionnel au coefficient de diffusion } D_G \text{ du soluté dans la phase mobile, et } C \text{ lui est inversement proportionnel.}$$

On considère le (\pm)-1-phényléthane-1,2-diol **A** dont la structure est représentée ci-dessous.



A

A - Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

1 - Comment appelle-t-on le paramètre H ? Rappeler brièvement sa signification vis-à-vis d'une séparation chromatographique. (1 point)

- *H = Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique (HEPT)*

- *La colonne est divisée en petits tronçons de longueur H [tels que la concentration de soluté dans la phase mobile qui sort du tronçon est en équilibre avec la concentration du soluté dans la phase stationnaire du tronçon]. Plus le nombre de ces tronçons est élevé, i.e. plus ces tronçons sont de petite taille, et plus la séparation sera efficace.*

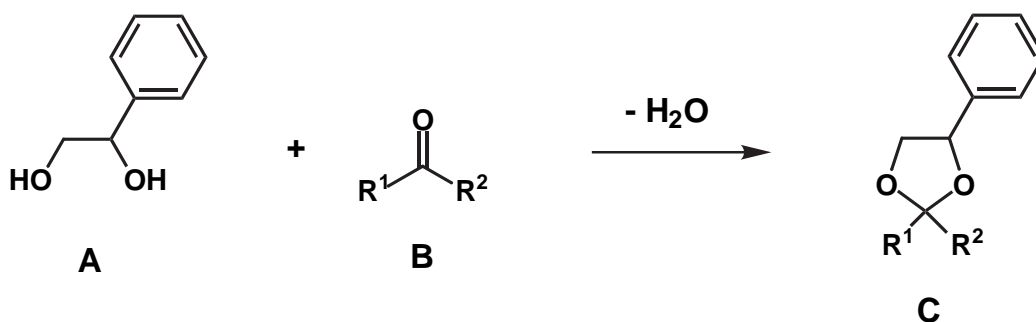
2 - Dans le cas de l'utilisation d'une colonne CPG capillaire, quel est le principal type d'injecteur utilisé ? (1 point)

Pour les colonnes capillaires, on utilise principalement des injecteurs de type split/splitless.

3 - Un utilisateur inexpérimenté a injecté une quantité trop importante du composé A ci-dessus dans un chromatographe en phase gazeuse. Quelle sera l'allure du pic obtenu par rapport à un pic idéal qui serait parfaitement Gaussien ? Justifier en quelques lignes en expliquant de façon qualitative ce qui se passe alors dans la colonne. (3 points)

Lors de l'injection d'une trop grande quantité de soluté dans une colonne CPG, la phase stationnaire se retrouve saturée et, en 1^{ère} approximation, on peut considérer qu'une grande partie de l'échantillon reste dans la phase mobile. On peut alors concevoir que cette fraction de l'échantillon sortira très vite, conduisant à une montée abrupte du pic, tandis que le reste, ralenti par la phase stationnaire, génèrera une traînée ("Tailing").

Le (±)-1-phényléthane-1,2-diol est utilisé comme groupement protecteur de fonctions carbonyle.



4 - Après réaction, on désire connaître par CPG la teneur en diol A résiduel du brut réactionnel. Parmi les différentes méthodes d'analyse quantitative vues en cours, laquelle utiliseriez-vous ? Justifier en quelques lignes. (2 points pour une des deux méthodes)

On pourra utiliser, au choix, la méthode de l'étalonnage externe ou de l'étalonnage interne. Il ne serait pas judicieux d'utiliser la méthode par normalisation interne car elle ne conduit qu'aux pourcentages relatifs des constituants de l'échantillon qui génèrent un pic chromatographique or nous ne sommes pas sûrs ici que tous ces constituants sortent de la colonne (ex. : formation d'un polymère, etc...).

- Etalonnage externe : cette méthode donnera des résultats très fiables à conditions d'avoir une bonne reproductibilité des injections (volume, temps de séjour de l'aiguille,...). Elle sera surtout utilisée si on dispose d'un chromatographe récent (stable) et équipé d'un passeur d'échantillon (reproductibilité). Cette méthode présente l'avantage de ne pas utiliser un étalon autre que le diol de départ puisqu'il suffit d'injecter des solutions de diol de différentes concentrations avant d'injecter l'échantillon à doser.

- Etalonnage interne : cette méthode est la plus générale car s'adapte à tout type de chromatographe. Il faudra toutefois choisir convenablement l'étalon et avoir déterminé le coefficient de réponse du diol par rapport à cet étalon. L'avantage de cette méthode est qu'elle est indépendante du volume exactement injecté à partir du moment où l'on reste dans une même gamme.

B - Chromatographie liquide-solide

On dépose le brut réactionnel précédent en haut d'une colonne de chromatographie sur silice.

5 - En utilisant l'équation de van Deemter rappelée ci-avant, expliquer pourquoi il ne faut pas tarder à éluer le mélange une fois qu'il a été déposé en tête de colonne (on considèrera que dans le cas d'une chromatographie sur colonne de silice, la vitesse moyenne \bar{u} de la phase mobile est relativement faible). (3 points)

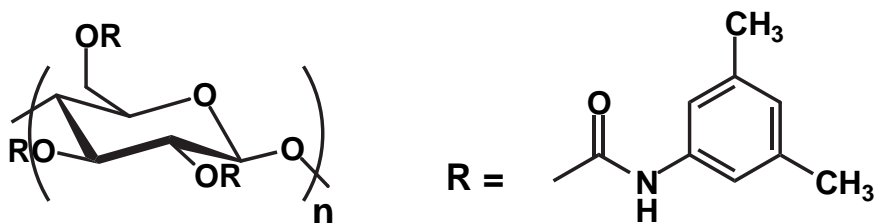
Dans le cas d'une vitesse d'élution \bar{u} faible, voire nulle dans le cas d'un temps d'attente après dépôt, on peut considérer que le terme B/\bar{u} devient prépondérant par rapport au terme $C\bar{u}$ dans l'équation de van Deemter (i.e. B/\bar{u} grand devant $C\bar{u}$). La valeur de H sera donc directement régie par celle de B , valeur qui est proportionnelle au coefficient de diffusion D_G . Ainsi, plus il y aura diffusion du mélange, plus la valeur de H sera élevée et donc moins la séparation sera efficace.

C'est ce qui se passe si on dépose le mélange en tête de colonne puis que l'on attend sans éluer. Les composés vont diffuser dans la phase mobile (éluant) et la valeur de H va ainsi augmenter (on élargit le "front de migration"). La séparation des différents constituants du mélange sera donc moins efficace ("on en sera encore à éluer la fin du premier composant quand le second va arriver").

C - Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Le (\pm)-1-phényléthane-1,2-diol **A** peut être synthétisé sous sa forme optiquement active (NB : on ne vous demande pas de donner le mode d'obtention de ce composé). Une analyse HPLC est effectuée pour en déterminer la pureté optique.

On dispose d'une colonne HPLC chirale de type Chiralcel OB :



Un rapide bilan des solvants de qualité HPLC disponibles au laboratoire donne : hexane, eau, acétonitrile et isopropanol.

6 - Quel type d'éluant faut-il utiliser avec ce type de phase ? (1 point)

Il faut un éluant apolaire (ex. : hexane avec E alcool tel que EtOH, iPrOH)

7 - Donner les interactions qui seront mises en jeu dans la séparation des deux énantiomères du 1-phényléthane-1,2-diol. (2 points, soit 0,5 point par interaction identifiée)

- *Formation de complexes diastéréoisomères par LIAISONS HYDROGÈNE ou INTERACTIONS DIPOLAIRES entre le soluté et la cellulose*
- *INCLUSION de la partie aromatique du soluté dans les cavités chirales du réseau polymère. La sélectivité est apportée principalement par des considérations d'ordre STÉRIQUE.*

8 - Comment procéderiez-vous améliorer la séparation suivante (indiquer brièvement les facteurs sur lesquels on peut influencer) : (3 points)

- *la polarité du solvant : diminuer la quantité du solvant le plus polaire (ex. : iPrOH)*
- *diminuer la température - Influence sur la viscosité de l'éluant*
- *diminuer le débit de l'éluant*

9 - Calculer le facteur de résolution R entre les deux pics du chromatogramme précédent. A partir de quelle valeur de R peut-on considérer que deux pics sont parfaitement séparés ? (2 points)

$$- R = 1,18 \frac{(tR2 - tR1)}{\frac{\partial 1 + \partial 2}{2}} = 1,18 \frac{1,21}{1,56} = 0,92$$

avec tR1 et tR2 : temps de rétention des deux pics ; $\partial 1$ et $\partial 2$: largeur à mi-hauteur des deux pics

- *A partir de R=1,5, on peut considérer que deux pics sont résolus*

10 - On considère un 1,3-dioxolane de type C. (2 points)

Peut-on séparer les différents isomères sur une colonne de type Chiralcel OB ? Combien peut-on attendre de pics au maximum ?

On peut séparer les 4 différents isomères sur une colonne de type Chiralcel OB. Au maximum, 4 pics.

Peut-on séparer ces mêmes isomères sur une colonne remplie de phase achirale ? Combien peut-on attendre de pics ?

Sur colonne achirale, on sépare les 2 diastéréoisomères (2 couples de diastéréoisomères). Au maximum, 2 pics.

NOM Prénom :

Jeudi 02 Septembre 2004

Module LCP3 : Méthodes d'analyses Spectroscopiques et Chromatographiques

Examen de Chromatographie

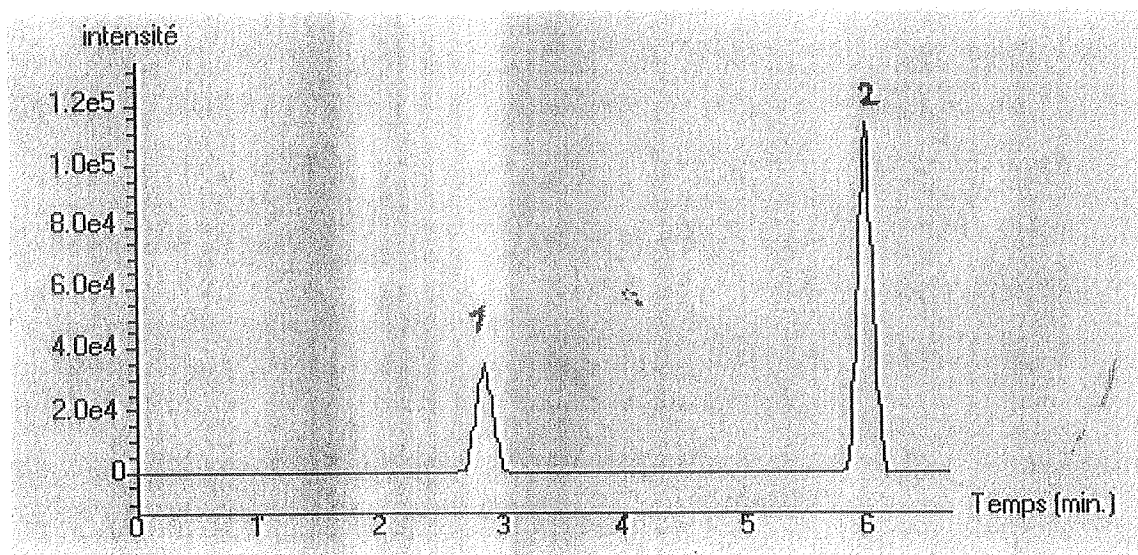
Aucun document n'est autorisé - Les portables doivent être éteints et
rangés.

On rappelle qu'en chromatographie, pour une phase mobile de vitesse moyenne \bar{u} , l'équation de van Deemter s'exprime par la relation simplifiée suivante :

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C\bar{u} \quad \text{où } B \text{ est proportionnel au coefficient de diffusion } D_G \text{ du soluté dans la phase mobile, et } C \text{ lui est inversement proportionnel.}$$

A - Chromatographie - Généralités

Soit le chromatogramme ci-dessous où le pic 1 correspond à un composé non retenu par la phase stationnaire et le pic 2 correspond à un composé retenu cette phase.



1 - Indiquer sur ce chromatogramme les grandeurs caractéristiques suivantes :

- le temps mort t_M ,
- le temps de rétention t_R du composé 2,
- le temps de rétention réduit t'_R du composé 2.

2 - En négligeant les volumes morts de l'injecteur et du détecteur, et en considérant qu'à débit D constant, on peut passer de la grandeur "temps" (t) à la grandeur "volume" (V) par la relation $V = t \times D$:

- Comment peut-on déterminer, d'après le chromatogramme, le volume de phase mobile dans la colonne ?

- Le volume de phase stationnaire apparaît-il sur le chromatogramme ? Si non, comment peut-on le calculer ?

- Comment peut-on, toujours d'après ce chromatogramme, calculer le facteur de rétention k du composé 2 ?

- En règle générale, préfère-t-on avoir une valeur de k élevée ou faible ? Pourquoi ?

B - Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

3 - Quels sont les principaux gaz vecteurs utilisables en CPG ?

- Quelles sont les précautions à prendre vis-à-vis de ces gaz pour ne pas endommager la colonne ?

4 - Si vous avez à choisir un de ces gaz pour alimenter un appareil de CPG, quels peuvent être les critères qui influenceront votre choix ?

5 - En utilisant l'équation de van Deemter, expliquer quelle sera la différence entre un gaz vecteur de densité élevée et un gaz vecteur de plus faible densité.

6 - Citer les trois grandes familles de colonnes CPG et leurs principales caractéristiques.

C - Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

7 - Donner deux types d'injecteurs utilisés en HPLC.

- Dans un mode moyenne ou haute pression, lequel utilisera-t-on le plus couramment ? Donner le principe et un schéma de ce type d'injecteur.

8 - Au laboratoire, nous avons en réserve ces quatre solvants de qualité HPLC : hexane, eau, éther diéthylique, méthanol. Classer ces quatre solvants selon leur pouvoir éluant lorsque l'on utilise :

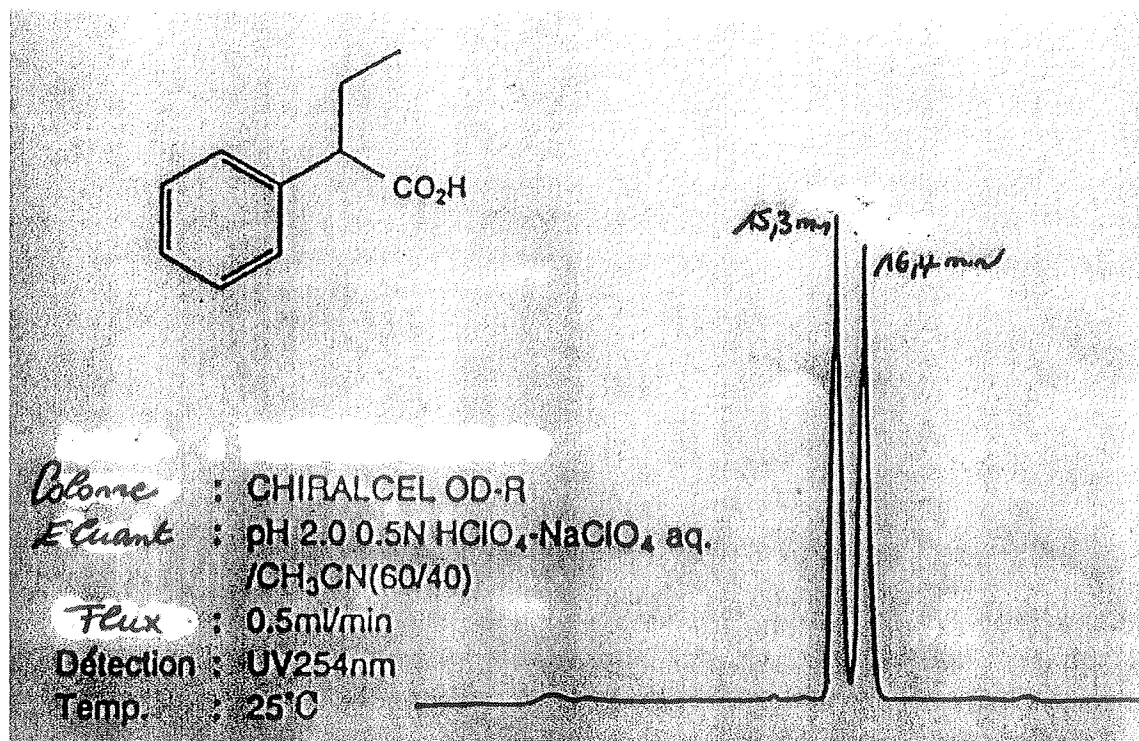
- une colonne avec une phase polaire normale,
- une colonne avec une phase à polarité inversée.

9 - *Chromatographie d'absorption en phase inverse.*

- Donner brièvement le principe, les avantages et les désavantages de ce type de chromatographie.

- Quel type d'éluant doit-on utiliser pour avoir une séparation optimale ?

10 - On considère l'acide 2-phénylbutanoïque pur et son chromatogramme ci-dessous.



- Commenter les conditions utilisées pour réaliser cette séparation (élution, débit, détection).
- Quel type de colonne est la colonne Chiralcel OD-R (normale, inverse, ...)?
- Nous observons deux signaux de même intensité (en aire sous le pic). Qu'en déduit-on à propos de la colonne utilisée?
- Calculer le facteur de résolution R entre les deux pics de ce chromatogramme.
- A partir de quelle valeur de R peut-on considérer que les deux pics sont parfaitement séparés?

NOM Prénom : **DARCEL Christophe / PICQUET Michel**

Jeudi 02 Septembre 2004

Module LCP3 : Méthodes d'analyses Spectroscopiques et Chromatographiques

Examen de Chromatographie

CORRIGÉ

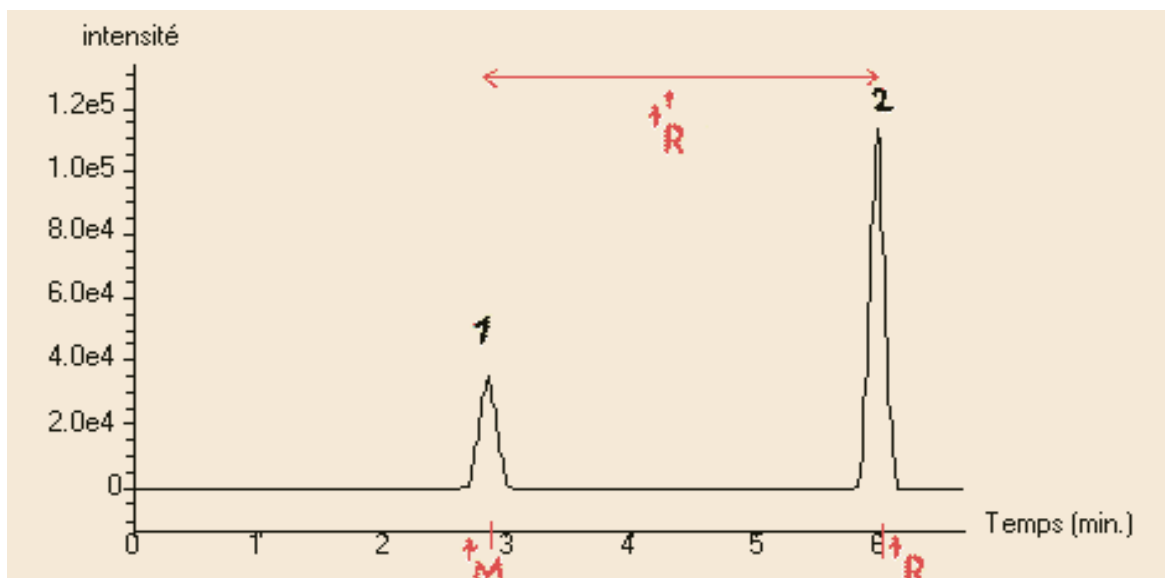
Aucun document n'est autorisé - Les portables doivent être éteints et rangés.

On rappelle qu'en chromatographie, pour une phase mobile de vitesse moyenne \bar{u} , l'équation de van Deemter s'exprime par la relation simplifiée suivante :

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C \cdot \bar{u} \quad \text{où } B \text{ est proportionnel au coefficient de diffusion } D_G \text{ du soluté dans la phase mobile, et } C \text{ lui est inversement proportionnel.}$$

A - Chromatographie - Généralités

Soit le chromatogramme ci-dessous où le pic 1 correspond à un composé non retenu par la phase stationnaire et le pic 2 correspond à un composé retenu cette phase.



1 - Indiquer sur ce chromatogramme les grandeurs caractéristiques suivantes :

- le temps mort t_M ,
- le temps de rétention t_R du composé 2,
- le temps de rétention réduit t'_R du composé 2.

Le temps mort correspond au temps de rétention du composé 1 non retenu par la phase stationnaire.

Le temps de rétention du composé 2 correspond à l'abscisse du sommet du pic 2.

Le temps de rétention réduit du composé 2 est la différence entre son temps de rétention et le temps mort.

(voir chromatogramme ci-avant)

2 - En négligeant les volumes morts de l'injecteur et du détecteur, et en considérant qu'à débit D constant, on peut passer de la grandeur "temps" (t) à la grandeur "volume" (V) par la relation $V = t \times D$:

- Comment peut-on déterminer, d'après le chromatogramme, le volume de phase mobile dans la colonne ?

Le composé 1 n'étant pas retenu par la phase stationnaire, et donc étant seulement transporté par la phase mobile, son temps de rétention correspond au temps que met la phase mobile pour traverser la colonne (en négligeant les temps morts dus aux volumes mort de l'injecteur et du détecteur). Le volume de phase mobile dans la colonne est donc : $V_M = t_M \times D$

- Le volume de phase stationnaire apparaît-il sur le chromatogramme ? Si non, comment peut-on le calculer ?

Le volume de phase stationnaire n'apparaît pas sur le chromatogramme. Toutefois, on peut le calculer en retranchant le volume de phase mobile calculé ci-avant au volume total de la colonne (connu d'après ses dimensions).

- Comment peut-on, toujours d'après ce chromatogramme, calculer le facteur de rétention k du composé 2 ?

Le facteur de rétention k est donné par la relation : $k = t'_R / t_M$

- En règle générale, préfère-t-on avoir une valeur de k élevée ou faible ? Pourquoi ?

On préfère avoir une valeur de k faible pour ne pas allonger les durées d'analyse.

B - Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

3 - Quels sont les principaux gaz vecteurs utilisables en CPG ?

Dihydrogène (H_2), hélium (He) et diazote (N_2).

- Quelles sont les précautions à prendre vis-à-vis de ces gaz pour ne pas endommager la colonne ?

Ces gaz doivent être de pureté suffisante et notamment être séchés et désoxygénés (au moyen de cartouches).

4 - Si vous avez à choisir un de ces gaz pour alimenter un appareil de CPG, quels peuvent être les critères qui influenceront votre choix ?

- la vitesse d'analyse (vitesse optimale du gaz vecteur).

- les conditions de température utilisées (la viscosité de certains gaz augmente avec la température, ce qui entraîne une perte d'efficacité [perte de charge]),
- la sécurité (utilisation de H₂).

5 - En utilisant l'équation de van Deemter, expliquer quelle sera la différence entre un gaz vecteur de densité élevée et un gaz vecteur de plus faible densité.

Lors de l'utilisation d'une gaz vecteur dense (ex. : N₂), il y aura de nombreux chocs entre les molécules de gaz vecteur et la substance à analyser. On peut donc considérer que cette substance sera "poussée" dans la colonne par le gaz sans qu'elle n'ait le temps de diffuser. Le coefficient de diffusion D_G sera donc petit, ce qui entraîne que dans l'équation de van Deemter, la valeur de B sera également faible tandis que celle de C sera grande. Par suite, le terme C.u l'emporte sur le terme B/u et l'équation de van Deemter devient en première approximation :

$$H \approx A + C \cdot \bar{u}$$

Pour avoir une efficacité maximum de la colonne (donc H le plus petit possible), il faudra utiliser une vitesse de gaz vecteur (u) faible et les durées d'analyse seront donc allongées.

A l'inverse, avec un gaz vecteur de faible densité (ex. : H₂), la substance subit moins de chocs avec le gaz vecteur et a le temps de diffuser. Dans l'équation de van Deemter, c'est alors le terme B/u qui l'emporte et l'équation devient :

$$H \approx A + \frac{B}{\bar{u}}$$

On pourra alors utiliser une vitesse élevée du gaz vecteur, ce qui permettra de raccourcir les temps d'analyse.

6 - Citer les trois grandes familles de colonnes CPG et leurs principales caractéristiques.

- Colonnes remplies :

- tube de diamètre 1/8" ou 1/4" (3,18 ou 6,35 mm),
- débit : 10 à >40 ml / min,
- remplie de petites sphères, d'environ 0,2 mm de diamètre, d'un support poreux sur lequel est greffée ou imprégnée la phase stationnaire (Chromosorb),
- de moins en moins utilisées car ont été supplantées par les colonnes capillaires ou wide bore.

- Colonnes capillaires :

- colonnes les plus utilisées,
- préparées à partir de "silice fondue" très pure, obtenue par combustion de SiH₄ ou SiCl₄ dans une atmosphère d'O₂. Elles sont revêtues extérieurement de polyimide, polymère mécaniquement et chimiquement protecteur (jusqu'à 370 °C).
- diamètre interne varie de 0,1 à 0,35 mm et la longueur de 5 à 100 m,
- phase stationnaire greffée sur la paroi interne de silice.
- Ces colonnes permettent l'analyse de traces et offrent de très bonnes résolutions pour des débits de quelques ml/min.

- Colonnes "wide bore" ou 530 μm :

- autres noms : megabore, macrobore ou ultrabore, selon les fabricants,
- conception proche des colonnes capillaires (phase stationnaire greffée sur la paroi interne) mais ont un diamètre de 0,53 mm et une longueur de 5 à 50 m,
- moins efficaces que les colonnes capillaires, elles ont l'avantage de s'adapter sur des appareils anciennement équipés de colonnes remplies.

C - Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

7 - Donner deux types d'injecteurs utilisés en HPLC.

- Dans un mode moyenne ou haute pression, lequel utilisera-t-on le plus couramment ?
Donner le principe et un schéma de ce type d'injecteur.

- Injection par seringue via un septum. Peu adapté à la moyenne et haute pression : injection à pression atmosphérique par système « stop-flow ». on arrête le débit de la phase mobile, on met à pression atmosphérique en aval de la tête d'injection, on injecte et on remet la pression.

- Injecteur type vanne d'échantillonnage (vanne Rheodyne) : le plus utilisé actuellement

Schéma (voir cours). L'opération se fait en deux temps ; 1) remplissage de la boucle 2) la vanne fait communiquer la boucle (à pression atmosphérique) avec le flux de la phase mobile (à haute ou moyenne pression)

8 - Au laboratoire, nous avons en réserve ces quatre solvants de qualité HPLC : hexane, eau, éther diéthylique, méthanol. Classer ces quatre solvants selon leur pouvoir éluant lorsque l'on utilise :

- une colonne avec une phase polaire normale,
hexane < éther diéthylique < méthanol < eau
- une colonne avec une phase à polarité inversée.
Eau < méthanol < éther diéthylique < hexane

9 - Chromatographie d'absorption en phase inverse.

- Donner brièvement le principe, les avantages et les désavantages de ce type de chromatographie.

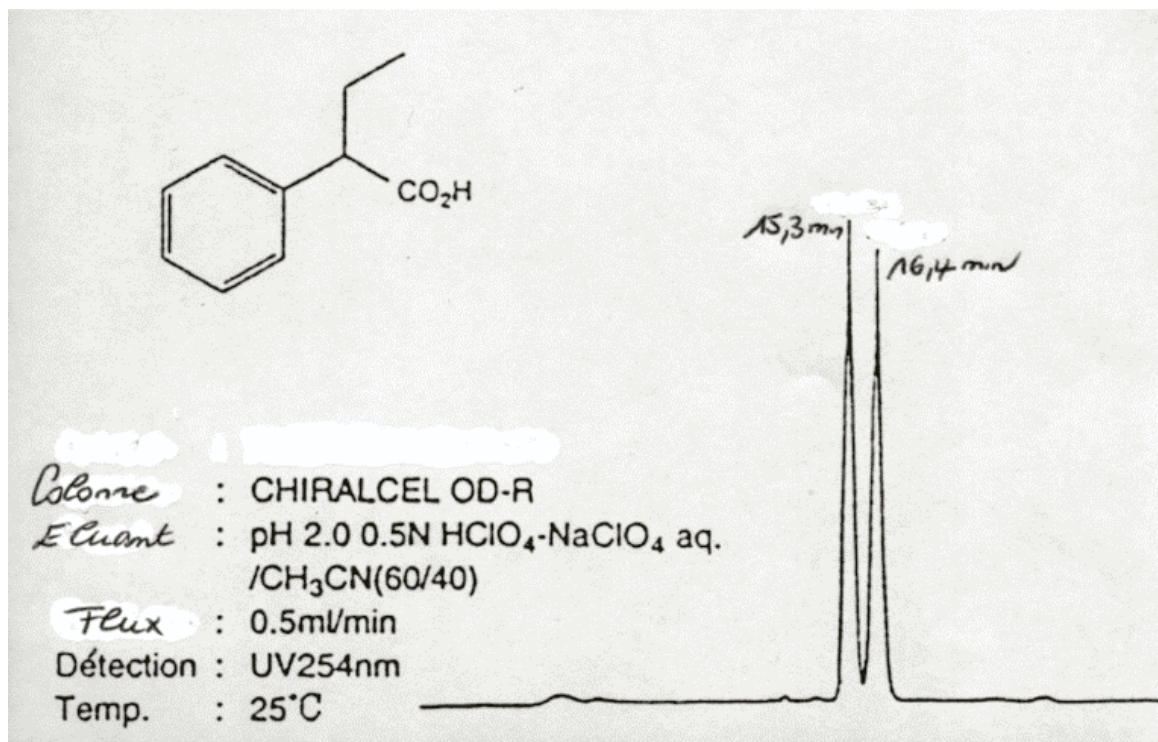
Principe : c'est une chromatographie d'adsorption liquide-solide dans laquelle la phase stationnaire se distingue par son apolarité. Elle est constituée par des silices apolaires greffées. Il existe des greffons apolaires de taille différente de 2 à 18 atomes de carbone, donc de polarité différentes. La phase mobile est polaire et hydrophile. La séparation est fondée sur des interactions hydrophobes entre les molécules à séparer et la phase stationnaire.

Avantages :
- possibilité de séparation de solutés de nature non ionique, ionisable et ionique
- séparation de solutés ioniques de ceux qui sont ionisables
- séparations rapides et ré-équilibration courtes

Désavantages :
- la plage des pH utilisables se situe entre 2 et 7,5 pour des phases à base de silice
- mécanisme de rétention complexe
- pics à effet de queue pour les composés polaires et les bases
- Quel type d'éluant doit-on utiliser pour avoir une séparation optimale ?

Solvants de type polaire avec eau, alcool majoritaire

10 - On considère l'acide 2-phénylbutanoïque pur et son chromatogramme ci-dessous.



- Commenter les conditions utilisées pour réaliser cette séparation (élution, débit, détection). Elution : de type polaire (aqueuse) ; Débit normal (entre 0 et 1 mL/min, classique pour une HPLC de type analytique) ; Détection UV 254 nm (présence de chromophores UV sensible phényle et carbonyle)

- Quel type de colonne est la colonne Chiralcel OD-R (normale, inverse, ...) ? inverse (utilisation de phase mobile de type polaire)

- Nous observons deux signaux de même intensité (en aire sous le pic). Qu'en déduit-on à propos de la colonne utilisée ? la molécule est chirale et racémique ; s'il y a deux pics d'égale intensité c'est que la phase stationnaire est chirale ce qui permet de faire des complexes diastéréoisomères sur la colonne et ainsi séparer les deux isomères.

- Calculer le facteur de résolution R entre les deux pics de ce chromatogramme.

$$R = 1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1}) / (\delta_1 + \delta_2) = 1,18 \cdot (1,1) / (0,82) = 1,58$$

Avec t_{R1} et t_{R2} : temps de rétention des deux pics et δ₁ et δ₂ largeur à mi-hauteur des deux pics

- A partir de quelle valeur de R peut-on considérer que les deux pics sont parfaitement séparés ? A partir de R=1,5, on peut considérer que les deux pics sont résolus

NOM Prénom :

Mardi 12 Décembre 2005

Module LCP3 : Méthodes d'analyses Spectroscopiques et Chromatographiques

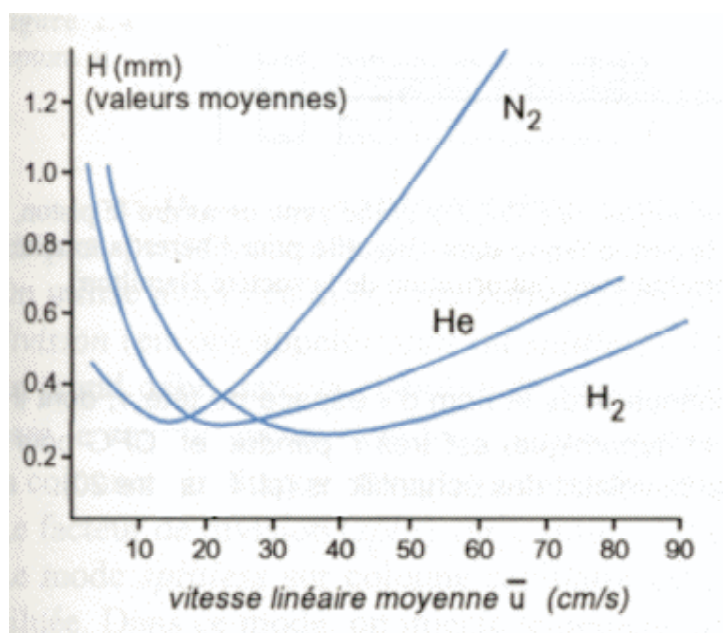
Examen de Chromatographie

Aucun document n'est autorisé - Les portables doivent être éteints et rangés.

On rappelle qu'en chromatographie, pour une phase mobile de vitesse moyenne \bar{u} , l'équation de van Deemter s'exprime par la relation simplifiée suivante :

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

où B est proportionnel au coefficient de diffusion D_G du soluté dans la phase mobile, et C lui est inversement proportionnel.



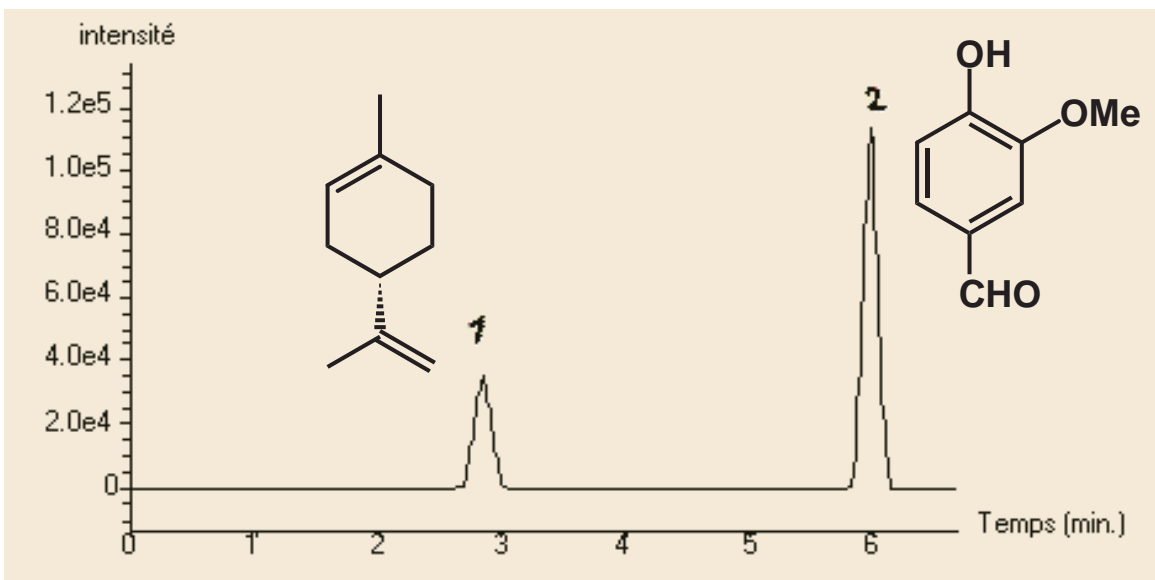
A – Chromatographie – Généralités

1 – Dans la théorie des plateaux, comment appelle-t'on le paramètre N ? Dans cette même théorie, ainsi que dans l'équation de van Deemter, comment appelle-t'on le paramètre H ? Quelle relation relie ces deux paramètres ?

2 – Quelle va être l'efficacité d'une séparation chromatographique en fonction de la valeur de H ?

B - Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

3 – Le technique "Headspace", développée en CPG depuis quelques années, permet d'effectuer l'analyse de composés volatils s'échappant d'une substance liquide ou solide. Lors de l'application de cette technique à l'analyse d'un morceau de gâteau, le chromatogramme obtenu révèle la présence de limonène (arôme du citron, pic 1) et de vanilline (arôme de vanille, pic 2).



3.1 – En admettant que le limonène n'est pas retenu par la phase stationnaire, à l'inverse de la vanilline, indiquer sur ce chromatogramme les grandeurs caractéristiques suivantes :

- le temps mort t_M de la colonne,
- le temps de rétention t_R de la vanilline,
- le temps de rétention réduit t'_R de la vanilline.

3.2 - En négligeant les volumes morts de l'injecteur et du détecteur, et en considérant qu'à débit D constant, on peut passer de la grandeur "temps" (t) à la grandeur "volume" (V) par la relation $V = t \times D$:

- Comment peut-on déterminer, en s'aidant du chromatogramme, le volume de phase stationnaire dans la colonne ?
- Comment peut-on, d'après ce chromatogramme, calculer le facteur de rétention k de la vanilline sur cette colonne ?
- De quoi k est-il révélateur ? En règle générale, préfère-t'on avoir une valeur de k élevée ou faible ? Pourquoi ?

3.3 – Le gâteau, apporté par un étudiant qui ne souhaite pas révéler sa recette, étant excellent, les enseignants décident de doser par CPG les différents arômes présents. Pour cela, ils réalisent une solution par extraction d'un morceau du gâteau et disposent d'un chromatographe en phase gazeuse équipé notamment d'un injecteur split, d'une colonne HP-5 et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID).

- A leur place, et en tenant compte notamment de l'allure des courbes de van Deemter ci-avant, quel gaz vecteur utiliseriez-vous ? Justifier.

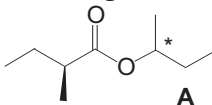
- Donner un protocole et les conditions à respecter pour déterminer les teneurs massiques exactes en chacun des arômes dans l'échantillon.

- Sans étalonnage, est-il possible de déterminer les proportions approchées de ces deux arômes ? Justifier.

3.4 - Un des étudiants, inexpérimenté en CPG, a injecté une quantité trop importante du mélange ci-dessus. Quelle sera l'allure des pics obtenus par rapport à un pic idéal qui serait parfaitement Gaussien ? Justifier en quelques lignes en expliquant de façon qualitative ce qui se passe alors dans la colonne.

C – Chromatographie Liquide Haute Performance

On effectue l'analyse HPLC d'un mélange réactionnel constitué du composé **A** en solution dans le toluène. La séparation chromatographique a été obtenue sur une colonne de silice greffée NH₂ de 15 cm de longueur à une température de 23°C. La phase mobile est utilisée avec un débit de 1,0 mL/min et la pression en tête de colonne est de 33.10⁵ Pa. Le temps mort de la colonne est 0,6 minute.



Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant :

Nom du composé	t _R (min.)	Largeur du pic à mi-hauteur (min.)
Toluène	1,83	0,08
A	2,62	0,20
	3,03	0,25

- 1) Quel type de colonne est utilisé ? Donner les principales caractéristiques de ce type de colonne.
- 2) Quel système éluant doit-on utiliser avec ce type de colonne ? Proposer deux solvants susceptibles de composer un système éluant acceptable pour ce type de colonne en indiquant lequel vous utiliseriez majoritairement.
- 3) Quel type de détecteur classique utiliseriez vous en indiquant pourquoi vous le (les) choisissez et dans quelles conditions vous le (les) utiliseriez.
- 4) Justifier que le composé **A** soit à l'origine de deux pics sur le chromatogramme.
- 5) Calculer le facteur de résolution R entre les deux pics du composé **A** puis indiquer s'ils sont correctement séparés. Justifier votre réponse.
Calculer également le facteur de séparation des deux pics du composé **A**.
- 6) Si la séparation n'est pas correcte, sur quels paramètres pouvez vous influencer pour l'améliorer.
- 7) le composé **A** est hydrolysé et l'alcool obtenu est analysé en HPLC. Quelle type de colonne doit-on utiliser pour séparer les deux isomères de cet alcool ? Donner les principales interactions qui seront mises en jeu dans cette séparation.

NOM Prénom :

Jeudi 14 Décembre 2006

Module LCP3 : Méthodes d'analyses Spectroscopiques et Chromatographiques

Examen de Chromatographie

Aucun document n'est autorisé - Les portables doivent être éteints et rangés.

On rappelle qu'en chromatographie, pour une phase mobile de vitesse moyenne \bar{u} , l'équation de van Deemter s'exprime par la relation simplifiée suivante :

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

où B est proportionnel au coefficient de diffusion D_G du soluté dans la phase mobile, et C lui est inversement proportionnel.

A – Chromatographie – Généralités

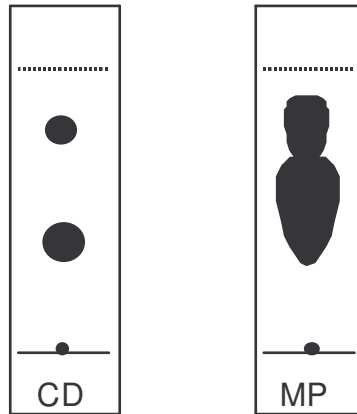
1 – Dans la théorie des plateaux, comment appelle-t-on les paramètres N et H ? Quelle relation relie ces deux paramètres ?

2 – Quelle va être l'efficacité d'une séparation chromatographique en fonction de la valeur de H ?

3 – Quelle autre théorie, plus moderne mais plus complexe, a été développée pour expliquer le phénomène chromatographique ?

B – Chromatographies sur couche mince (CCM) et en phase gazeuse (CPG)

Deux jeunes chimistes débutants, dont les initiales sont CD et MP, ont réalisé des plaques CCM d'un mélange de deux composés. Pour effectuer le dépôt du mélange sur la plaque CCM, CD a préparé une solution dans l'éther diéthylique tandis que MP a opté pour un dépôt du produit non dilué. Les CCM obtenues après élution sont représentées ci-après.

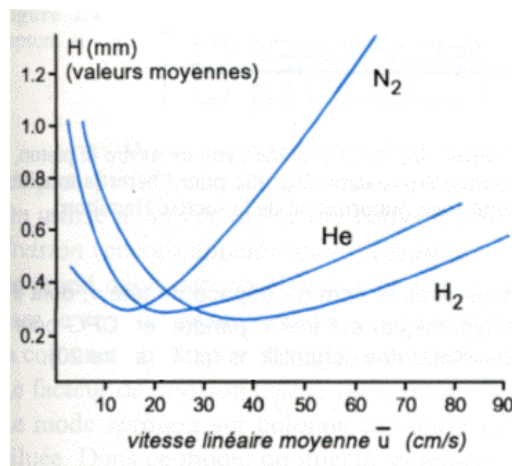


4 – A votre avis, quelle est la meilleure des deux CCM ? Pourquoi ?

5 – Sur la plaque CCM de MP, les tâches sont déformées et les R_f des deux produits sont plus grands que sur celle de CD. Expliquer pourquoi de façon simple et par analogie avec ce qui vous a été présenté en cours à propos des pics chromatographiques.

Nos deux chimistes souhaitent maintenant injecter le mélange en CPG. Pour cela, ils disposent d'un chromatographe en phase gazeuse équipé notamment d'un injecteur *split - splitless*, d'une colonne *HP-5* et d'un détecteur à ionisation de flamme (*FID*).

6 – A leur place, et en tenant compte notamment de l'allure des courbes de van Deemter ci-après, quel gaz vecteur utiliseriez-vous ? Justifier.



7 – Comment procéderiez-vous pour déterminer les teneurs massiques de l'échantillon en chacun des deux constituants, en utilisant la méthode de l'étalon interne ?

8 – Sans étalonnage, est-il possible de déterminer les proportions approchées de ces deux composés ? Justifier.

9 – CD décide d'utiliser l'injecteur en mode "split" et MP l'utilise en mode "splitless". Expliquer brièvement ces deux termes.

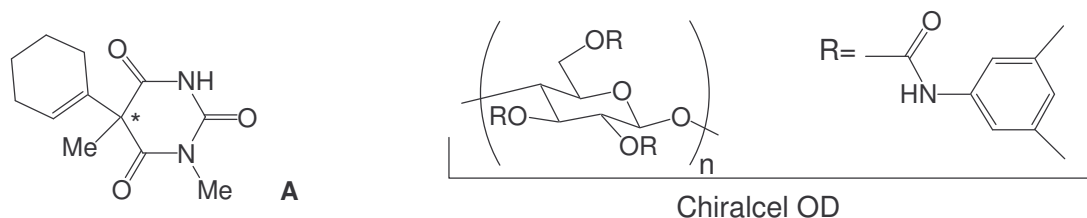
10 – La figure ci-avant montre que, quel que soit le gaz vecteur utilisé, la valeur de H des deux composés augmente fortement lorsque la vitesse du gaz vecteur diminue.

Expliquer pourquoi en vous basant sur l'équation de van Deemter.

11 – Pour une même vitesse faible de gaz vecteur (ex. : 10 cm/s), on remarque que la valeur de H est plus faible avec un gaz dense (ex. : N_2) qu'avec un gaz peu dense (ex. : H_2). Toujours d'après l'équation de van Deemter, expliquer pourquoi.

L'hexobarbital **A** est un hypnotique rapidement absorbé. Son sel de sodium est soluble dans l'eau et peut être injectée par intraveineuse pour produire une anesthésie de courte durée.

On effectue l'analyse HPLC d'un mélange réactionnel constitué du composé **A** en solution dans l'éthanol. La séparation chromatographique a été obtenue sur une colonne de silice chirale de type Chiralcel OD (greffée avec des sélecteurs chiraux à base de cellulose modifiée) à une température de 23°C. La phase mobile est utilisée avec un débit de 0,2 mL/min et la pression en tête de colonne est de $15 \cdot 10^5$ Pa. Le temps mort de la colonne est 0,6 minute.



Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant :

Nom du composé	t_R (min.)	Largeur du pic à mi-hauteur (min.)
Dichlorométhane	0,6	0,08
A	34	1,9
	40	3,2

- 1) Quel type de colonne est utilisé ? Donner les principales caractéristiques de ce type de colonne.
- 2) Donner trois types de détecteurs usuels en HPLC. Donner brièvement le principe de chaque détecteur et préciser la sensibilité relative de chacun d'entre eux.
Parmi les réponses données, quel type de détecteur utiliseriez vous dans ce cas et indiquer pourquoi vous le choisiriez et dans quelles conditions vous l'utiliseriez.
- 3) Justifier que le composé **A** soit à l'origine de deux pics sur le chromatogramme.
- 4) Donner les interactions qui seront mises en jeu dans la séparation des deux énantiomères de l'hexobarbital **A**.
- 5) Calculer le facteur de résolution R entre les deux pics du composé **A** puis indiquer s'ils sont correctement séparés. Justifier votre réponse.
Calculer également le facteur de séparation des deux pics du composé **A**.
- 6) Si la séparation n'est pas correcte, sur quels paramètres pouvez vous influencer pour l'améliorer.
- 7) Le composé **A** est mis en présence d'un équivalent de soude pour donner son sel de sodium qui est analysé en HPLC. Quel type de colonne doit-on utiliser pour séparer les deux isomères de cet alcool ? Quel type de solvants doit-on utiliser avec ce type de colonne (en donner un exemple).

NOM Prénom : **Darcel C. / Picquet M.**

Jeudi 14 Décembre 2006

Module LCP3 : Méthodes d'analyses Spectroscopiques et Chromatographiques

Examen de Chromatographie

Aucun document n'est autorisé - Les portables doivent être éteints et rangés.

On rappelle qu'en chromatographie, pour une phase mobile de vitesse moyenne \bar{u} , l'équation de van Deemter s'exprime par la relation simplifiée suivante :

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

où B est proportionnel au coefficient de diffusion D_G du soluté dans la phase mobile, et C lui est inversement proportionnel.

A – Chromatographie – Généralités

1 – Dans la théorie des plateaux, comment appelle-t-on les paramètres N et H ? Quelle relation relie ces deux paramètres ? (1 pt)

N = nombre de plateaux théoriques

H = hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT)

$H = L/N$ où L est la longueur de la colonne

2 – Quelle va être l'efficacité d'une séparation chromatographique en fonction de la valeur de H ? (0,5 pt)

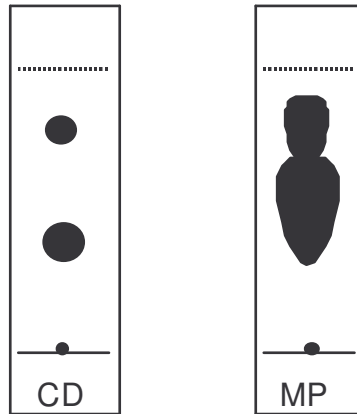
Plus la valeur de H sera petite, plus la séparation sera efficace.

3 – Quelle autre théorie, plus moderne mais plus complexe, a été développée pour expliquer le phénomène chromatographique ? (0,5 pt)

La théorie dynamique utilisant l'équation de van Deemter.

B – Chromatographies sur couche mince (CCM) et en phase gazeuse (CPG)

Deux jeunes chimistes débutants, dont les initiales sont CD et MP, ont réalisé des plaques CCM d'un mélange de deux composés. Pour effectuer le dépôt du mélange sur la plaque CCM, CD a préparé une solution dans l'éther diéthylique tandis que MP a opté pour un dépôt du produit non dilué. Les CCM obtenues après élution sont représentées ci-après.



4 – A votre avis, quelle est la meilleure des deux CCM ? Pourquoi ? (0,5 pt)

La plaque CCM de CD est la meilleure car les tâches correspondant à chaque produit sont bien séparées et chaque tâche est symétrique le long de l'axe longitudinal de la plaque (Note du correcteur : cf. allure gaussienne des pics en CPG).

5 – Sur la plaque CCM de MP, les tâches sont déformées et les R_f des deux produits sont plus grands que sur celle de CD. Expliquer pourquoi de façon simple et par analogie avec ce qui vous a été présenté en cours à propos des pics chromatographiques. (1 pt)

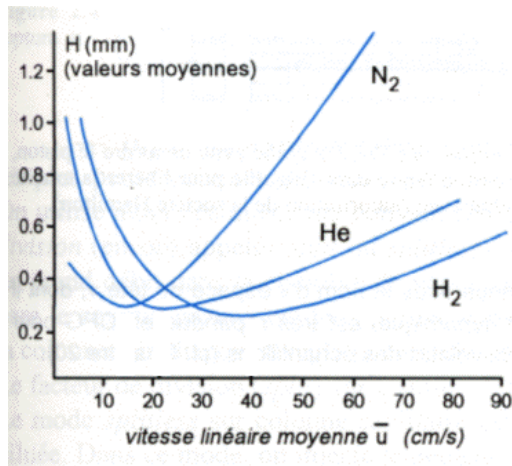
Le dépôt de MP est trop concentré, il s'ensuit un phénomène de saturation de la phase stationnaire de sa plaque CCM. Une part du produit est donc entraînée par la phase mobile (éluant) sans interactions avec la phase stationnaire et donc sans être ralentie par celles-ci. Ceci a deux conséquences :

- Les tâches sont très longues et déformées : on retrouve en tête des tâches la partie du produit qui a migré rapidement et en traînée l'autre partie qui a migré plus lentement (interactions avec la phase stationnaire).

- Pour chaque produit de MP, $V(\text{moyenne}) = \text{moyenne entre } V(\text{produit retenu}) \text{ et } V(\text{produit non retenu})$ alors que pour CD, $V(\text{moyenne}) = V(\text{produit retenu})$. Les produits ont donc migré plus rapidement sur la plaque MP (vitesse moyenne supérieure) et leurs R_f sont donc plus grands.

Nos deux chimistes souhaitent maintenant injecter le mélange en CPG. Pour cela, ils disposent d'un chromatographe en phase gazeuse équipé notamment d'un injecteur *split - splitless*, d'une colonne *HP-5* et d'un détecteur à ionisation de flamme (*FID*).

6 – A leur place, et en tenant compte notamment de l'allure des courbes de van Deemter ci-après, quel gaz vecteur utiliseriez-vous ? Justifier. (1,5 pts)



Les courbes de van Deemter des trois gaz vecteurs montrent que la *HEPT* la plus petite est obtenue avec H₂. De plus, ce minimum est alors obtenu avec une vitesse moyenne de gaz vecteur élevée. Enfin, la variation de la *HEPT* est faible sur une large gamme de vitesses moyennes de ce gaz. Le dihydrogène permet donc d'avoir la meilleure efficacité de colonne avec un temps d'analyse réduit et est donc le gaz vecteur le plus approprié pour cette analyse. *Note du correcteur* : Une réserve peut toutefois être émise concernant la dangerosité de ce gaz, il est alors préférable de choisir l'Hélium.

7 – Comment procéderiez-vous pour déterminer les teneurs massiques de l'échantillon en chacun des deux constituants, en utilisant la méthode de l'étalon interne ? (1,5 pts)

- injection d'une solution contenant des quantités connues des deux composés à analyser et d'un étalon,

- détermination du coefficient de réponse relatif de chaque composé par rapport à l'étalon par intégration des aires de chaque pic chromatographique :

$$Q_{i/ét} = m_i/m_{ét} \times A_{ét} \cdot A_i,$$

- injection, dans les mêmes conditions, d'une solution de l'échantillon à quantifier contenant une masse connue d'étalon $m'_{ét}$ et intégration des aires obtenues A'_i et $A'_{ét}$. On a alors :

$$m'_i = m'_{ét} \times Q_{i/ét} \times A'_i/A'_{ét}$$

Rmq : il est préférable de préparer plusieurs gammes de concentrations de solutions étalons afin de réaliser une droite d'étalonnage de l'appareil. De plus, le résultat sera plus fiable si on moyenne les résultats sur plusieurs injections.

8 – Sans étalonnage, est-il possible de déterminer les proportions approchées de ces deux composés ? Justifier. (1 pt)

On utilise ici un détecteur FID. Pour ce type de détecteur, il existe une méthode de calcul empirique de la réponse d'un composé (et donc de sa réponse relative par rapport à un étalon) en tenant compte du nombre de carbones qu'il contient ainsi que de leur état d'hybridation et des atomes auxquels ils sont liés.

9 – CD décide d'utiliser l'injecteur en mode "split" et MP l'utilise en mode "splitless". Expliquer brièvement ces deux termes. (1 pt)

split : méthode d'injection avec laquelle une grande partie de l'échantillon injecté est éliminée avant l'entrée dans la colonne par un balayage transversal de gaz vecteur.

splitless : : méthode d'injection avec laquelle la totalité du volume d'échantillon injecté va entrer dans la colonne et y être chromatographié.

10 – La figure ci-avant montre que, quel que soit le gaz vecteur utilisé, la valeur de H des deux composés augmente fortement lorsque la vitesse du gaz vecteur diminue.

Expliquer pourquoi en vous basant sur l'équation de van Deemter. (1 pt)

van Deemter : $H = A + B/u + C.u$

Lorsque " u " est faible, le terme " $C.u$ " devient négligeable devant le terme " B/u "; H devient donc proportionnelle à $1/u$ et va fortement augmenter quand la valeur de " u " diminue.

11 – Pour une même vitesse faible de gaz vecteur (ex. 10 cm/s), on remarque que la valeur de H est plus faible avec un gaz dense (ex. N_2) qu'avec un gaz peu dense (ex. H_2). Toujours d'après l'équation de van Deemter, expliquer pourquoi. (2 pts)

A faible vitesse, la probabilité de chocs entre molécules de gaz vecteur et molécules de soluté est beaucoup plus grande pour un gaz dense que pour un gaz peu dense. Un gaz vecteur dense réussira donc facilement à éluier le soluté tandis qu'un gaz peu dense aura un pouvoir éluant très faible.

Dans ce dernier cas, le soluté aura donc la possibilité de diffuser dans la phase mobile, ce qui entraînera une forte augmentation du terme " D_G ". Le terme " B " de l'équation de van Deemter étant proportionnel à " D_G " et " C " lui étant inversement proportionnel, cette équation peut alors être assimilée à :

$$H = A + B/u,$$

ce qui entraîne alors : si " u " petite \Rightarrow " H " grand.

Donc pour un gaz vecteur de faible densité, H augmentera d'autant plus que la vitesse sera faible.

Note du correcteur :

Le raisonnement peut également se faire avec le gaz dense :

gaz dense \Rightarrow élution \Rightarrow pas de diffusion du soluté $\Rightarrow D_G$ petit
donc " B " petit et " C " grand \Rightarrow l'équation de van deemter devient :

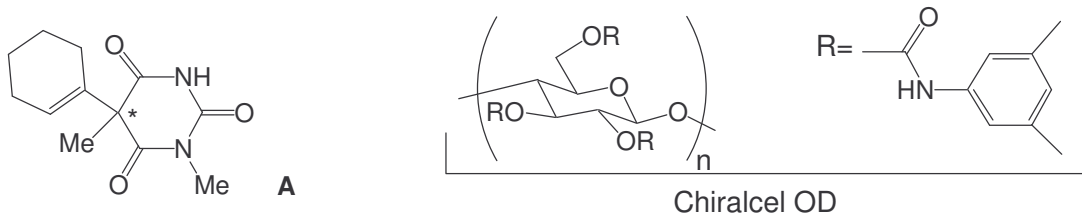
$$H = A + C.u$$

ce qui entraîne alors : si " u " petite \Rightarrow " H " petit.

C – Chromatographie Liquide Haute Performance

L'hexobarbital **A** est un hypnotique rapidement absorbé. Son sel de sodium est soluble dans l'eau et peut être injectée par intraveineuse pour produire une anesthésie de courte durée.

On effectue l'analyse HPLC d'un mélange réactionnel constitué du composé **A** en solution dans l'éthanol. La séparation chromatographique a été obtenue sur une colonne de silice chirale de type Chiralcel OD (greffée avec des sélecteurs chiraux à base de cellulose modifiée) à une température de 23°C. La phase mobile est utilisée avec un débit de 0,2 mL/min et la pression en tête de colonne est de 15.10^5 Pa. Le temps mort de la colonne est 0,6 minute.



Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant :

Nom du composé	t_R (min.)	Largeur du pic à mi-hauteur (min.)
Dichlorométhane	0,6	0,08
A	34	1,9
	40	3,2

1) Quel type de colonne est utilisé ? Donner les principales caractéristiques de ce type de colonne. (1 pt)

Colonne HPLC phase normale

2) Donner trois types de détecteurs usuels en HPLC. Donner brièvement le principe de chaque détecteur et préciser la sensibilité relative de chacun d'entre eux. (1,5 pts)

Parmi les réponses données, quel type de détecteur utiliseriez vous dans ce cas et indiquer pourquoi vous le choisissez et dans quelles conditions vous l'utiliseriez. (0,5 pt)

3) Justifier que le composé A soit à l'origine de deux pics sur le chromatogramme. (0,5 pt)

Produit racémique, avec un centre de chiralité + colonne chirale donc 2 pics possibles.

4) Donner les interactions qui seront mises en jeu dans la séparation des deux énantiomères de l'hexobarbital A. (1,5 pts)

- Formation de complexes diastéréoisomères par **LIAISONS HYDROGÈNE** ou **INTERACTIONS DIPOLAIRES** entre le soluté et la cellulose

- **INCLUSION** de la partie aromatique du soluté dans les cavités chirales du réseau polymère. La sélectivité est apportée principalement par des considérations d'ordre **STÉRIQUE**.

5) Calculer le facteur de résolution R (0,5 pt) entre les deux pics du composé A puis indiquer s'ils sont correctement séparés. Justifier votre réponse. (0,5 pt)

Calculer également le facteur de séparation des deux pics du composé A. (0,5 pt)

$$R = 1,18 \frac{(tR2 - tR1)}{d1 + d2}$$

avec $tR1$ et $tR2$: temps de rétention des deux pics ; $d1$ et $d2$: largeur à mi-hauteur des deux pics

- A partir de $R=1,5$, on peut considérer que deux pics sont résolus

6) Si la séparation n'est pas correcte, sur quels paramètres pouvez vous influencer pour l'améliorer. (1 pt)

- la polarité du solvant : diminuer la quantité du solvant le plus polaire (ex. : *iPrOH*)

- diminuer la température - Influence sur la viscosité de l'éluant

- diminuer le débit de l'éluant

7) Le composé **A** est mis en présence d'un équivalent de soude pour donner son sel de sodium qui est analysé en HPLC. Quel type de colonne doit-on utiliser pour séparer les deux isomères de cet alcool ? Quel type de solvants doit-on utiliser avec ce type de colonne (en donner un exemple). (1 pts)

Colonne en phase inverse chirale

Solvant : phase aqueuse ou mélange eau/alcool, eau/acétonitrile

NOM Prénom :

Jeudi 13 Décembre 2007

Module LCP3 : Méthodes d'analyses Spectroscopiques et Chromatographiques

Examen de Chromatographie

Aucun document n'est autorisé - Les portables doivent être éteints et rangés.

On rappelle qu'en chromatographie, pour une phase mobile de vitesse moyenne \bar{u} , l'équation de van Deemter s'exprime par la relation simplifiée suivante :

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

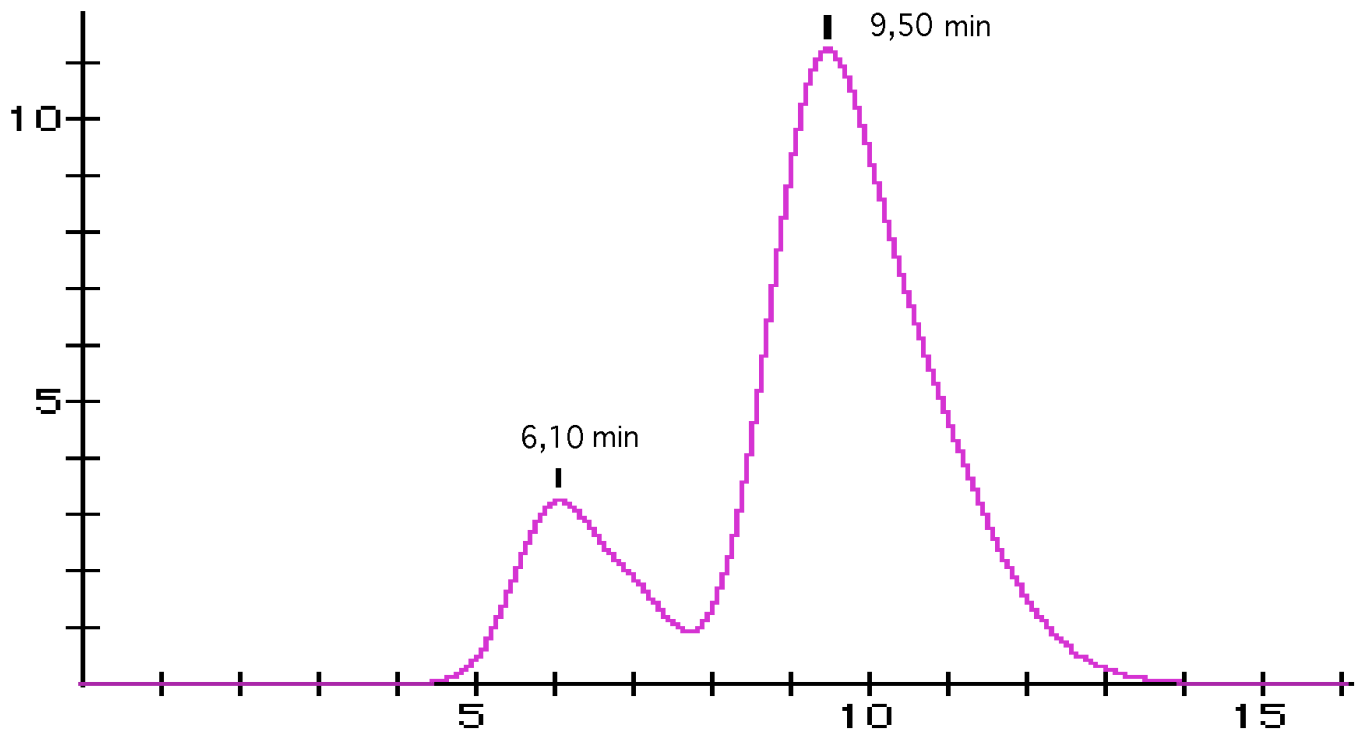
où B est proportionnel au coefficient de diffusion D_G du soluté dans la phase mobile, et C lui est inversement proportionnel.

A – Chromatographie – Généralités

1 – La quasi-totalité des techniques chromatographiques fait appel à un coefficient de partage K . Définir ce qu'est ce coefficient de partage et donner son expression.

2 – Dans la théorie de van Deemter, comment appelle-t-on le paramètre H ? Pour avoir une bonne séparation chromatographique, vaut-il mieux avoir un H petit ou grand ? Pourquoi ?

3 – Donner une formule permettant de calculer le facteur de résolution entre deux pics chromatographiques et l'appliquer au chromatogramme ci-après. A votre avis, les deux pics de ce chromatogramme sont-ils bien résolus ? Pourquoi ?



B – Chromatographies en phase gazeuse (CPG)

4 – Donner les principaux gaz vecteurs utilisés en CPG. Quels sont les avantages et inconvénients de ces différents gaz ?

5 – Qu'est-ce qu'une injection en mode *split* ? Quelle est la différence avec une injection en mode *splitless* ?

6 – Dessiner la coupe transversale schématique d'une colonne capillaire 0,25 mm et en indiquer les différents constituants.

7 – Citer un type de phase stationnaire utilisé classiquement en CPG et en donner la structure. Pourquoi peut-on qualifier ces phases stationnaires de "liquide supporté" ?

8 – Lors de l'utilisation d'un gaz vecteur de faible densité, une vitesse moyenne élevée de phase mobile doit être utilisée afin d'obtenir une séparation satisfaisante. Expliquer pourquoi en utilisant l'équation de van Deemter.

9 – Après extraction par un solvant organique approprié, l'analyse CPG d'un échantillon de salive d'un étudiant s'étant absenté quelques minutes de la salle de TP montre la présence de traces de nicotine et d'une quantité non négligeable de caféine. La teneur de l'échantillon en chacun de ces deux constituants est déterminée par la méthode de l'étalon interne.

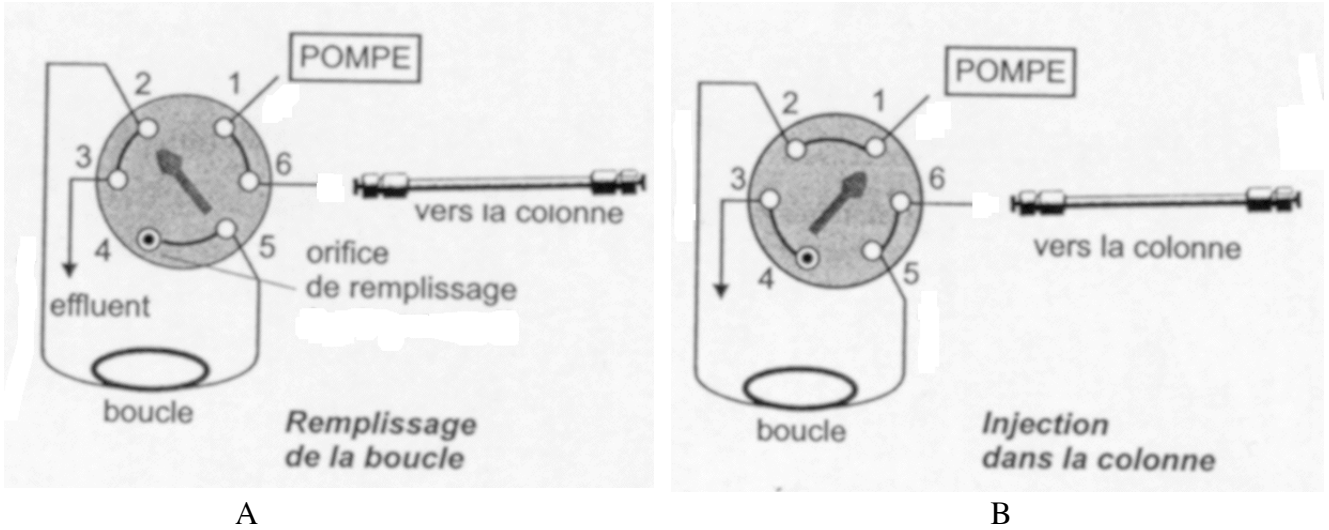
- Expliquer en quoi consiste cette méthode.

10 – Cette analyse CPG étant faite sur un appareil muni d'un détecteur FID, est-il possible de déterminer les proportions relatives approchées de ces deux composés sans avoir à utiliser d'étalon? Justifier.

C – Chromatographies Liquide Haute Performance (HPLC ou CLHP)

11 – L'utilisation d'une vanne Rheodyne est très courante parmi les méthodes d'injection possibles en HPLC.

- Expliquer son principe à l'aide des schémas ci-dessous.
- Quel est l'intérêt principal de ce type de vanne ?
- Quelle condition doit alors remplir le volume prélevé à la seringue ?



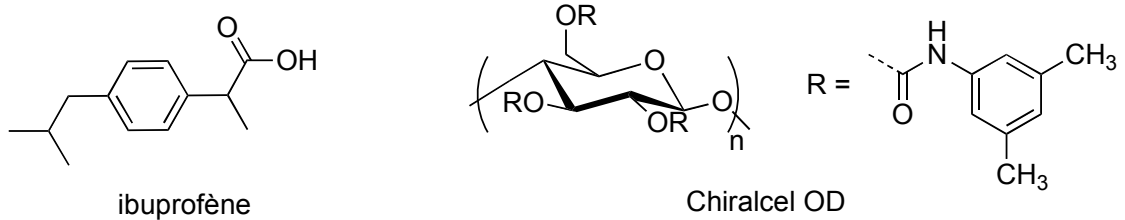
12 – Lors de l'utilisation d'un mélange de solvants comme phase mobile, qu'appelle-t-on "mode isocratique" ?

Par opposition, quel autre mode peut être utilisé et en quoi consiste t'il ?

13 – Que sont l'HPLC en phase normale et en phase inverse ? Préciser dans chaque cas le type de phase mobile à utiliser.

14 – Pour la séparation d'énantiomères, quel est l'avantage d'utiliser l'HPLC par rapport à la CPG ?

15 – On réalise l'injection d'une solution contenant de l'ibuprofène (cf. schéma ci-dessous) sur une colonne HPLC contenant une phase stationnaire de type Chiralcel OD.



- A quel groupe de phase stationnaire appartient ce type de colonne ?
- Combien de pics obtiendra t'on sur le chromatogramme ? Justifier.

16 – Si on réalise l'estérification de l'ibuprofène racémique par du (R,S)-1-phényléthanol, combien de pics chromatographiques obtiendra-t'on sur cette phase pour l'ester correspondant ?

Combien de pics obtiendra-t'on pour cet ester sur une phase stationnaire achirale ? Justifier.

NOM Prénom :

Jeudi 13 Décembre 2007

**Module LCP3 : Méthodes d'analyses Spectroscopiques et
Chromatographiques**

Corrigé

Examen de Chromatographie

Aucun document n'est autorisé - Les portables doivent être éteints et rangés.

On rappelle qu'en chromatographie, pour une phase mobile de vitesse moyenne \bar{u} , l'équation de van Deemter s'exprime par la relation simplifiée suivante :

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

où B est proportionnel au coefficient de diffusion D_G du soluté dans la phase mobile, et C lui est inversement proportionnel.

A – Chromatographie – Généralités

1 – La quasi-totalité des techniques chromatographiques fait appel à un coefficient de partage K . Définir ce qu'est ce coefficient de partage et donner son expression.

Il s'agit du coefficient de partage du soluté entre la phase stationnaire et la phase mobile. Il régit l'équilibre de répartition de ce soluté dans ces deux phases. Il est défini par $K = C_s/C_m$ où C_s est la concentration de soluté dans la phase stationnaire et C_m la concentration de soluté dans la phase mobile à l'équilibre.

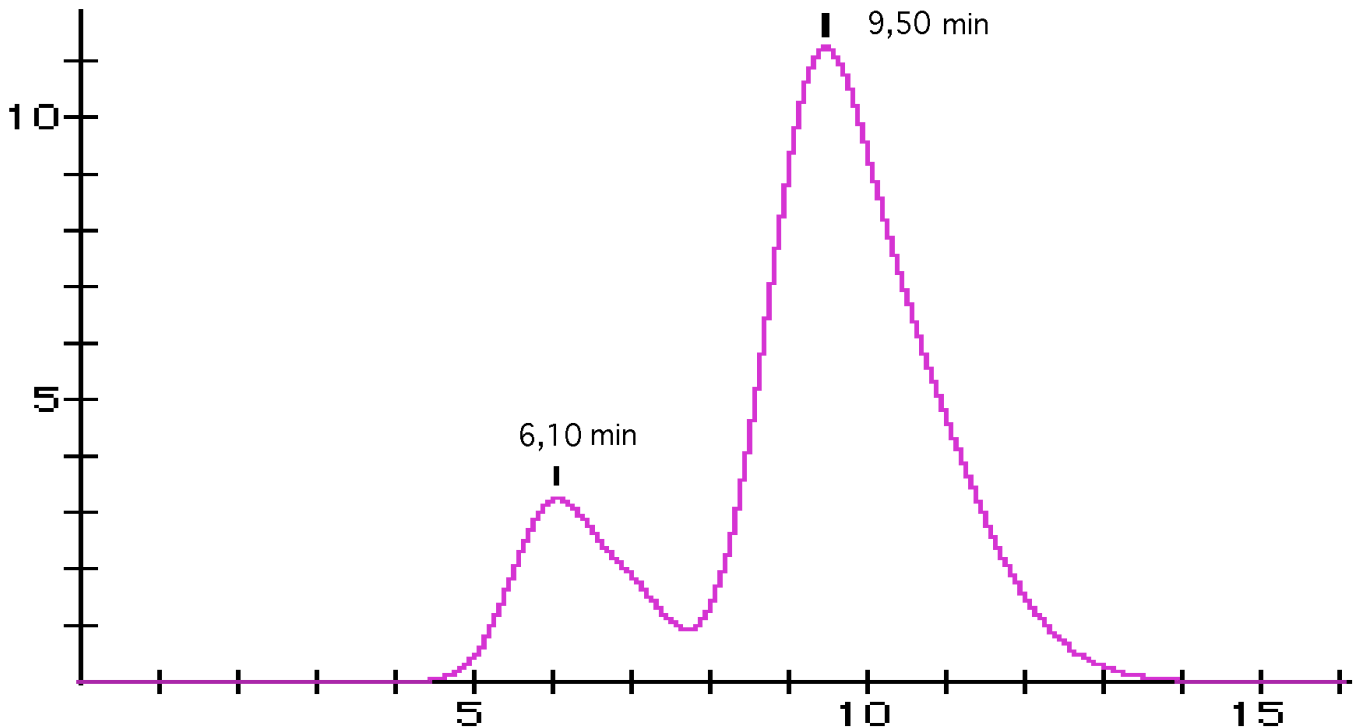
NB : K n'est valable qu'à une température donnée.

2 – Dans la théorie de van Deemter, comment appelle-t-on le paramètre H ? Pour avoir une bonne séparation chromatographique, vaut-il mieux avoir un H petit ou grand ? Pourquoi ?

H est la Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique (HEPT).

La HEPT est aussi donnée par la relation $H = L/N$ où L est la longueur de la colonne et N le nombre de plateaux théoriques, inversement proportionnel à H . Etant donné que plus N est grand, meilleure est la séparation, il faut donc avoir H petit pour avoir une bonne séparation.

3 – Donner une formule permettant de calculer le facteur de résolution entre deux pics chromatographiques et l'appliquer au chromatogramme ci-après. A votre avis, les deux pics de ce chromatogramme sont-ils bien résolus ? Pourquoi ?



Facteur de résolution : $R = 2 \cdot \frac{t_R^2 - t_R^1}{\omega_1 + \omega_2}$ avec ω = largeur du pic à 13,5% de sa hauteur

ou, plus facile à u

tiliser : $R = 1,18 \cdot \frac{t_R^2 - t_R^1}{\delta_1 + \delta_2}$ avec δ = largeur du pic à mi-hauteur.

NB : pour l'application au chromatogramme ci-avant, si la mesure des t_R est en min, il faut prendre δ en min également. Sinon, utiliser les cm pour δ et t_R . Dans la correction ci-après, les mesures sont en cm.

Sur le chromatogramme, cela donne : $R = 1,18 \cdot \frac{9,95 - 6,30}{1,85 + 2,25} = 1,05$

Les deux pics sont donc mal résolus puisque l'on considère que deux pics sont bien résolus si $R > 1,5$.

NB : cela se voit nettement sur le chromatogramme car il n'y a pas retour à la ligne de base entre les deux pics.

B – Chromatographies en phase gazeuse (CPG)

4 – Donner les principaux gaz vecteurs utilisés en CPG. Quels sont les avantages et inconvénients de ces différents gaz ?

H₂ :

avantages :

- HEPT sensiblement la plus faible des gaz vecteurs donc meilleure séparation.
- HEPT minimum obtenue à vitesse élevée de gaz vecteur donc gain en temps d'analyse.
- croissance de la HEPT en fonction de la vitesse de phase mobile plus faible après la HEPT minimum qu'avec les autres gaz vecteurs donc plus grande latitude dans le choix du débit.

- coût modéré,
- Inconvénient :
- dangerosité

N_2 :

avantages :

- coût faible
- innocuité

inconvénients :

- HEPT minimum obtenue à vitesse faible de gaz vecteur donc temps d'analyse allongés.
- augmentation de la HEPT très rapide après la HEPT minimum en fonction du débit donc réglage fin de ce dernier obligatoire

He :

avantages :

- bon compromis HEPT mini / vitesse de gaz vecteur
- remontée lente de la HEPT après la HEPT mini en fonction de la vitesse de phase mobile donc relative latitude dans le choix du débit

inconvénient :

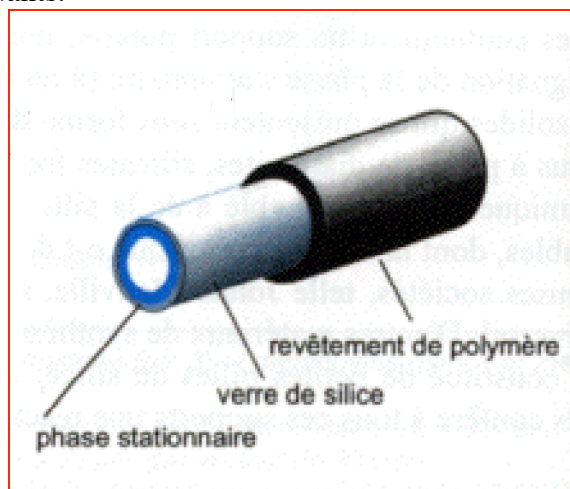
- prix élevé

5 – Qu'est-ce qu'une injection en mode *split* ? Quelle est la différence avec une injection en mode *splitless* ?

Mode split : Une fuite volontaire est créée en bas de l'injecteur par une vanne de façon que seule une petite partie (1/20e à 1/500e) de l'échantillon injecté ne passe dans la colonne.

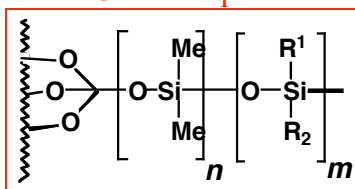
Mode splitless : On utilisera cette méthode pour l'analyse d'échantillons très dilués (traces). La totalité de l'échantillon va se recondenser en tête de colonne, celle-ci étant maintenue à une température suffisamment basse pour que le solvant précède les composés dans la colonne (recondensation des composés en tête de colonne). Lorsque tout l'échantillon est parti dans la colonne (env. 1 min.), on ouvre la vanne pour éliminer les traces éventuelles qui parasiteraient les injections suivantes.

6 – Dessiner la coupe transversale schématique d'une colonne capillaire 0,25 mm et en indiquer les différents constituants.



7 – Citer un type de phase stationnaire utilisé classiquement en CPG et en donner la structure. Pourquoi peut-on qualifier ces phases stationnaires de "liquide supporté" ?

Certaines phases stationnaires sont à base de polysiloxanes greffés.



* si R¹, R² = Me :

colonnes de type OV-1 ou SPB-1

* si R¹ = Me, R² = Ph :

colonnes de type DB-5, HP-5

(cf. colonne GC-MS TP)

* autres : R¹, R² = (CH₂)₃-CN, C₂H₄-CF₃, ...

La combinaison des différents groupes R¹ et R² en diverses proportions permet de moduler la polarité et les caractéristiques de la colonne (ex. : T° d'utilisation, ...).

Ces phases sont qualifiées de "liquide supporté" car elles sont constituées de très longue chaînes greffée en une de leur extrémité sur le colonne. La longueur de ces chaînes permet une grande fluxionalité et, par conséquent, un comportement proche de celui-d'un liquide.

8 – Lors de l'utilisation d'un gaz vecteur de faible densité, une vitesse moyenne élevée de phase mobile doit être utilisée afin d'obtenir une séparation satisfaisante. Expliquer pourquoi en utilisant l'équation de van Deemter.

Lors de l'utilisation d'une gaz vecteur peu dense (ex. : H₂), il y aura peu de chocs entre les molécules de gaz vecteur et la substance à analyser (faible probabilité de rencontre des molécules). On peut donc considérer que cette substance sera difficilement "poussée" dans la colonne par le gaz et aura le temps de diffuser. Le coefficient de diffusion D_G sera donc grand, ce qui entraîne que dans l'équation de van Deemter, la valeur de B sera également grande tandis que celle de C sera petite. Par suite, le terme B/u l'emporte sur le terme C.u et l'équation de van Deemter devient en première approximation :

$$H \approx A + \frac{B}{u}$$

Pour avoir une efficacité maximum de la colonne (donc H le plus petit possible), il faudra utiliser une vitesse de gaz vecteur (u) élevée.

NB : Cela revient à augmenter la probabilité de chocs entre molécules du gaz vecteur et molécules du soluté par unité de temps.

9 – Après extraction par un solvant organique approprié, l'analyse CPG d'un échantillon de salive d'un étudiant s'étant absenté quelques minutes de la salle de TP montre la présence de traces de nicotine et d'une quantité non négligeable de caféine. La teneur de l'échantillon en chacun de ces deux constituants est déterminée par la méthode de l'étalon interne.

- Expliquer en quoi consiste cette méthode.

- On réalise une série de solutions de différentes masses connues en nicotine, caféine et en un étalon convenablement choisi,

- On injecte chacune de ces solutions dans des conditions chromatographiques strictement identiques,

- On trace la courbe de réponse relative en aire des composés par rapport à l'étalon interne en fonction du rapport des masses,

- On injecte l'échantillon à doser auquel on a ajouté une masse connue d'étalon interne et, d'après les aires obtenues et l'étalonnage réalisé ci-avant, on en détermine les masses de chacun des composés présents dans l'échantillon.

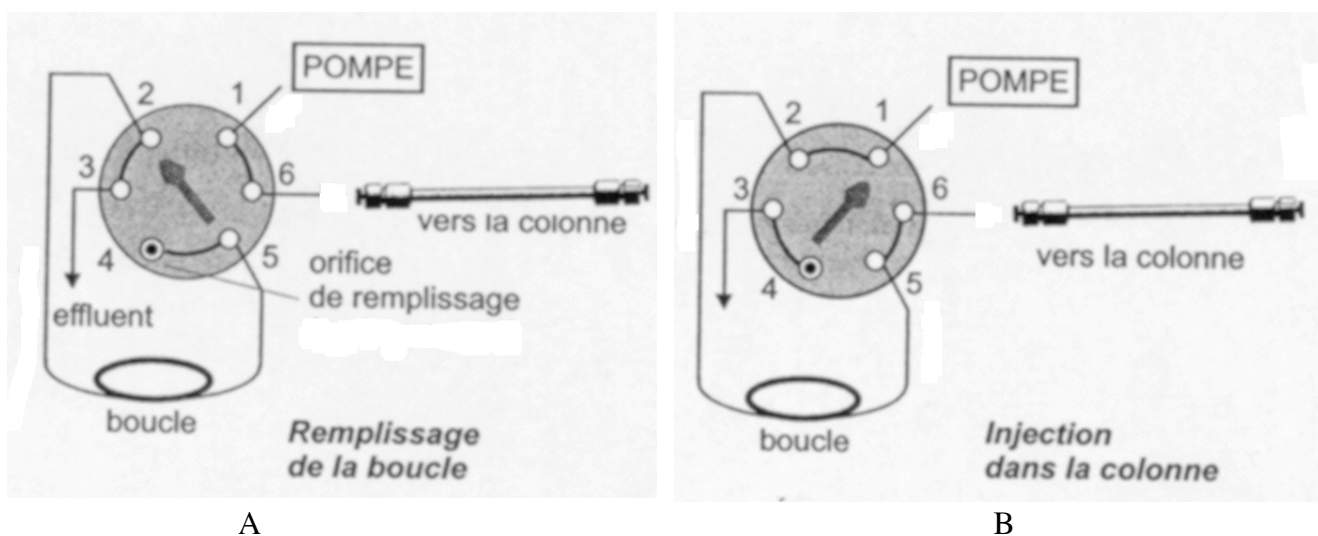
10 – Cette analyse CPG étant faite sur un appareil muni d'un détecteur FID, est-il possible de déterminer les proportions relatives approchées de ces deux composés sans avoir à utiliser d'étalon? Justifier.

Sans étalonnage, il est possible de déterminer les proportions approchées de ces deux composés car le chromatographe utilisé est muni d'un détecteur à ionisation de flamme (FID), ce qui permet de calculer empiriquement la réponse de molécules organiques en termes de "nombre de carbones effectifs" et ainsi, d'obtenir une valeur approchée des coefficients de réponse relatifs des deux composés par rapport à un étalon

C – Chromatographies Liquide Haute Performance (HPLC ou CLHP)

11 – L'utilisation d'une vanne Rheodyne est très courante parmi les méthodes d'injection possibles en HPLC.

- Expliquer son principe à l'aide des schémas ci-dessous.
- Quel est l'intérêt principal de ce type de vanne ?
- Quelle condition doit alors remplir le volume prélevé à la seringue ?



Principe : En position A, la colonne (port 6) est directement connectée à la pompe (port 1) et est donc alimentée en phase mobile. En parallèle, la solution à chromatographier est injectée en port 4 dans une boucle jusqu'à ce que celle-ci déborde (sortie par le port 3).

Pour l'injection, la manette est tournée de façon à connecter la boucle au circuit de phase mobile. Cette dernière va donc entraîner la solution présente dans la boucle vers la colonne.

Intérêt : Ce type de vanne permet d'injecter sans arrêter la circulation de phase mobile dans la colonne (peu de perturbations de débit et de pression = pas de pulsations).

Condition : le volume de solution prélevé à la seringue doit être supérieur au volume de la boucle de façon à la remplir totalement.

12 – Lors de l'utilisation d'un mélange de solvants comme phase mobile, qu'appelle-t-on "mode isocratique" ?

Par opposition, quel autre mode peut être utilisé et en quoi consiste t'il ?

Le mode isocratique consiste à utiliser une même composition de phase mobile tout au long de l'analyse.

À l'inverse, on peut utiliser un mode gradients qui consiste à faire varier la composition de la phase mobile au cours de l'analyse.

13 – Que sont l'HPLC en phase normale et en phase inverse ? Préciser dans chaque cas le type de phase mobile à utiliser.

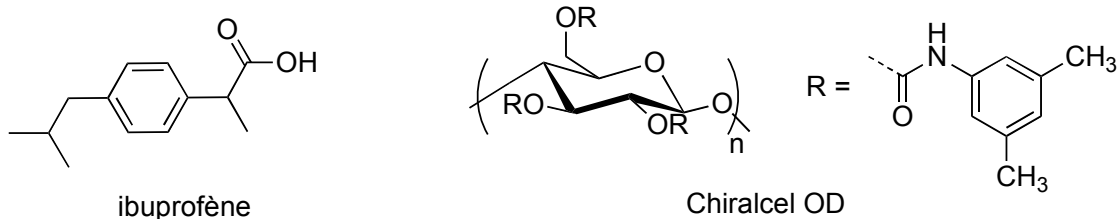
L'HPLC en phase normale est l'utilisation d'une phase polaire. L'HPLC en phase inverse consiste à utiliser une phase apolaire.

EN HPLC sur phase normale, on utilise une phase mobile peu polaire alors qu'en HPLC sur phase inverse, on utilise une phase mobile polaire.

14 – Pour la séparation d'énantiomères, quel est l'avantage d'utiliser l'HPLC par rapport à la CPG ?

L'HPLC ne nécessite pas de faire passer le composé à analyser en phase vapeur donc n'implique pas de températures élevées. Par conséquent, c'est une méthode plus douce qui permettra d'éviter la racémisation d'échantillon optiquement actifs, souvent instables en température.

15 – On réalise l'injection d'une solution contenant de l'ibuprofène (cf. schéma ci-dessous) sur une colonne HPLC contenant une phase stationnaire de type Chiralcel OD.



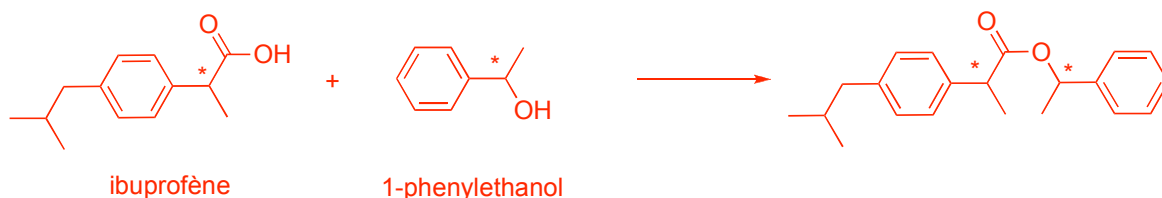
- A quel groupe de phase stationnaire appartient ce type de colonne ?
- Combien de pics obtiendra-t'on sur le chromatogramme ? Justifier.

Groupe : polymères naturels ou synthétiques (Groupe III).

Cette phase stationnaire est une phase chirale, elle permettra donc de séparer des énantiomères. L'ibuprofène possédant un carbone asymétrique ($Ar-C(H)(Me)COOH$), on obtiendra deux pics sur le chromatogramme : un pour le (*S*)-ibuprofène et une autre pour le (*R*)-ibuprofène.

16 – Si on réalise l'estérification de l'ibuprofène racémique par du (R,S)-1-phényléthanol, combien de pics chromatographiques obtiendra-t'on sur cette phase pour l'ester correspondant ?

Combien de pics obtiendra-t'on pour cet ester sur une phase stationnaire achirale ? Justifier.



L'ester obtenu comporte deux carbones asymétriques. Par conséquent, on aura les 4 stéréoisomères (RR, RS, SR, SS), énantiomères et diastéréoisomères deux à deux, et ils seront alors séparés sur la phase chirale. Il sera donc obtenu 4 pics.

Sur une phase stationnaire achirale, les énantiomères ne seront pas séparés, seuls les diastéréoisomères le seront. Il ne sera donc obtenu que 2 pics.

NOM Prénom :

Jeudi 11 Décembre 2008

Module LCP3 : Méthodes d'analyses Spectroscopiques et Chromatographiques

Examen de Chromatographie

Aucun document n'est autorisé - Les portables doivent être éteints et rangés.

On rappelle qu'en chromatographie, pour une phase mobile de vitesse moyenne \bar{u} , l'équation de van Deemter s'exprime par la relation simplifiée suivante :

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

où B est proportionnel au coefficient de diffusion D_G du soluté dans la phase mobile, et C lui est inversement proportionnel.

A – Chromatographie – Généralités

1 – Dans la théorie de van Deemter, comment appelle-t'on le paramètre H ? Pour avoir une bonne séparation chromatographique, vaut-il mieux avoir un H petit ou grand ? Pourquoi ?

2 – En négligeant les volumes morts de l'injecteur et du détecteur d'une chromatographe, et en considérant qu'à débit D constant, on peut passer de la grandeur "temps" (t) à la grandeur "volume" (V) par la relation $V = t \times D$:

- Comment peut-on déterminer, en s'aidant d'un chromatogramme, le volume de phase stationnaire dans la colonne ?

- Comment peut-on, d'après ce chromatogramme, calculer le facteur de rétention k d'un composé sur cette colonne ? Justifier votre réponse.

- De quoi k est-il révélateur ? En règle générale, préfère-t'on avoir une valeur de k élevée ou faible ? Pourquoi ?

3 – Lorsqu'un composé est élué sur une colonne et génère un pic chromatographique parfaitement gaussien, comment peut-on déterminer le nombre de plateaux théoriques N correspondant à ce composé sur cette colonne ?

4 – Un utilisateur inexpérimenté à injecté une quantité trop importante de composé dans un chromatographe. Quelle sera l'allure du pic obtenu par rapport à un pic idéal qui serait parfaitement Gaussien ? Justifier en quelques lignes en expliquant de façon qualitative ce qui se passe alors dans la colonne.

B – Chromatographies en phase gazeuse (CPG)

5 – Dans de nombreuses applications en CPG, le dihydrogène (H_2) est connu pour être le gaz vecteur le plus performant. Faut-il alors travailler à vitesse de gaz élevée ou faible ? Expliquer en vous basant sur l'équation de van Deemter rappelée ci-dessus.

Quel est alors l'avantage d'utiliser ce gaz par rapport au diazote (N_2) ?

6 – Qu'est-ce qu'une injection en mode *split* ? Quelle est la différence avec une injection en mode *splitless* ?

7 – La colonne que vous avez utilisée en TP sur le GC-MS est une colonne Equity-5. Préciser la structure de la phase stationnaire contenue dans cette colonne.

8 – Quels sont les critères régissant le choix du solvant qui sera utilisé pour dissoudre un échantillon avant injection sur une colonne CPG ?

9 – Expliquer en quoi consiste la méthode de l'étalon interne.

10 – Une analyse CPG est faite sur un appareil muni d'un détecteur FID. Est-il possible de déterminer les proportions relatives approchées de ces deux composés sans avoir à utiliser d'étalon ? Justifier.

C – Chromatographies Liquide Haute Performance (HPLC ou CLHP)

11 – D'après-vous, quels sont les avantages et inconvénients de l'HPLC par rapport à la CPG ?

12 – Si vous disposez de plusieurs solvants, quels sont les deux modes de travail possibles en HPLC ? Expliquer brièvement ce qu'est chacun de ces modes.

13 – Une pompe HPLC fonctionne avec au moins deux pistons. Ces deux pistons sont-ils de volume identique ? Pourquoi ?

14 – Que sont l'HPLC en phase normale et en phase inverse ? Préciser dans chaque cas le type de phase mobile à utiliser.

15 – Citer deux types de détecteurs utilisables en HPLC.

16 – On réalise la synthèse d'un aminoalcool par hydrogénation asymétrique le l'hydrochlorure de 3-(N,N-diméthylamino)propionophénone. Par quelle méthode est-il possible de déterminer l'excès énantiomérique obtenu si on ne dispose que d'une colonne HPLC achirale ? Détailler votre réponse.

NOM Prénom :

Jeudi 11 Décembre 2008

Module LCP3 : Méthodes d'analyses Spectroscopiques et Chromatographiques

Examen de Chromatographie **Corrigé**

Aucun document n'est autorisé - Les portables doivent être éteints et rangés.

Note = total/25 x 20

On rappelle qu'en chromatographie, pour une phase mobile de vitesse moyenne \bar{u} , l'équation de van Deemter s'exprime par la relation simplifiée suivante :

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

où B est proportionnel au coefficient de diffusion D_G du soluté dans la phase mobile, et C lui est inversement proportionnel.

A – Chromatographie – Généralités

1 – Dans la théorie de van Deemter, comment appelle-t'on le paramètre H ? Pour avoir une bonne séparation chromatographique, vaut-il mieux avoir un H petit ou grand ? Pourquoi ? **1 point**
 H est la Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique (HEPT).

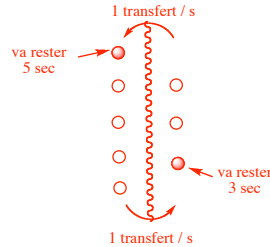
La HEPT est aussi donnée par la relation $H = L/N$ où L est la longueur de la colonne et N le nombre de plateaux théoriques, inversement proportionnel à H . Etant donné que plus N est grand, meilleure est la séparation, il faut donc avoir H petit pour avoir une bonne séparation.

2 – En négligeant les volumes morts de l'injecteur et du détecteur d'une chromatographe, et en considérant qu'à débit D constant, on peut passer de la grandeur "temps" (t) à la grandeur "volume" (V) par la relation $V = t \times D$:

- Comment peut-on déterminer, en s'aidant d'un chromatogramme, le volume de phase stationnaire dans la colonne ? **1 point** Si un produit n'est pas retenu par la phase stationnaire, on peut considérer qu'il n'est présent que dans la phase mobile. Par conséquent, le temps de rétention de ce produit, alors également temps mort de la colonne, représente la durée que met la phase mobile à parcourir la colonne. A débit D constant, on peut donc obtenir le volume de phase mobile : $V_M = t_M \times D$. Pour calculer le volume de phase stationnaire de la colonne, il suffit alors de retrancher ce volume de phase mobile V_M au volume total de la colonne, calculé d'après ses dimensions

- Comment peut-on, d'après ce chromatogramme, calculer le facteur de rétention k d'un composé sur cette colonne ? Justifier votre réponse. **2 points** $k = t'_R / t_M$. En effet, le temps passé par chaque molécule dans chaque phase est proportionnel au nombre de ces molécules, donc à la masse de composé, dans chaque phase. Donc étant donné que $k = m_s/m_M$, nous avons également la relation $k=t_s/t_M$. En négligeant les temps morts de l'injecteur et du détecteur, t_s peut être assimilé à t'_R donc $k=t'_R/t_M$, mesurable sur le chromatogramme.

Illustration de la proportionnalité masse / durée de séjour :



- De quoi k est-il révélateur ? En règle générale, préfère-t-on avoir une valeur de k élevée ou faible ? Pourquoi ? **1 point** k est révélateur du comportement de la colonne vis-à-vis du composé. On préfère avoir une valeur de k faible pour ne pas rallonger la durée de l'analyse

3 – Lorsqu'un composé est élué sur une colonne et génère un pic chromatographique parfaitement gaussien, comment peut-on déterminer le nombre de plateaux théoriques N correspondant à ce composé sur cette colonne ? **1 point** $N = t_R^2 / \sigma^2$ avec t_R = temps de rétention, σ = demi-largeur à 60,6 % de la hauteur du pic (point d'inflexion).

4 – Un utilisateur inexpérimenté à injecté une quantité trop importante de composé dans un chromatographe. Quelle sera l'allure du pic obtenu par rapport à un pic idéal qui serait parfaitement Gaussien ? Justifier en quelques lignes en expliquant de façon qualitative ce qui se passe alors dans la colonne. **2 points** Lors de l'injection d'une trop grande quantité de soluté dans une colonne CPG, la phase stationnaire se retrouve saturée et, en 1^{ère} approximation, on peut considérer qu'une grande partie de l'échantillon reste dans la phase mobile. On peut alors concevoir que cette fraction de l'échantillon sortira très vite, conduisant à une montée abrupte du pic, tandis que le reste, ralenti par la phase stationnaire, génèrera une traînée ("Tailing").

B – Chromatographies en phase gazeuse (CPG)

5 – Dans de nombreuses applications en CPG, le dihydrogène (H_2) est connu pour être le gaz vecteur le plus performant. Faut-il alors travailler à vitesse de gaz élevée ou faible ? Expliquer en vous basant sur l'équation de van Deemter rappelée ci-dessus.

Quel est alors l'avantage d'utiliser ce gaz par rapport au diazote (N_2) ? **2 points**

Lors de l'utilisation d'une gaz vecteur peu dense (ex. : H_2), il y aura peu de chocs entre les molécules de gaz vecteur et la substance à analyser. On peut donc considérer que cette substance sera difficilement "poussée" dans la colonne par le gaz et aura le temps de diffuser. Le coefficient de diffusion D_G sera donc grand, ce qui entraîne que dans l'équation de van Deemter, la valeur de B sera également grande tandis que celle de C sera petite. Par suite, le terme B/u l'emporte sur le terme $C.u$ et l'équation de van Deemter devient en première approximation :

$$H \approx A + \frac{B}{u}$$

Pour avoir une efficacité maximum de la colonne (donc H le plus petit possible), il faudra utiliser une vitesse de gaz vecteur (u) élevée. Les durées d'analyse seront donc raccourcies par rapport à celles obtenues dans le cas de l'utilisation d'un gaz plus dense comme N_2 qui implique, par raisonnement inverse de celui ci-dessus, qu'il faut travailler à faible vitesse de gaz vecteur.

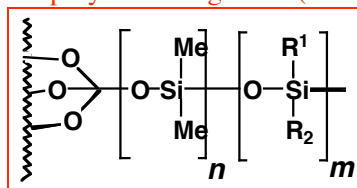
6 – Qu'est-ce qu'une injection en mode *split* ? Quelle est la différence avec une injection en mode *splitless* ? 1 point

Mode split : Une fuite volontaire est créée en bas de l'injecteur par une vanne de façon que seule une petite partie (1/20e à 1/500e) de l'échantillon injecté ne passe dans la colonne.

Mode splitless : On utilisera cette méthode pour l'analyse d'échantillons très dilués (traces). La totalité de l'échantillon va se recondenser en tête de colonne, celle-ci étant maintenue à une température suffisamment basse pour que le solvant précède les composés dans la colonne (recondensation des composés en tête de colonne). Lorsque tout l'échantillon est parti dans la colonne (env. 1 min.), on ouvre la vanne pour éliminer les traces éventuelles qui parasiteraient les injections suivantes.

7 – La colonne que vous avez utilisée en TP sur le GC-MS est une colonne Equity-5. Préciser la structure de la phase stationnaire contenue dans cette colonne. 1 point

Phase stationnaire à base de polysiloxane greffés (cf schéma) contenant 5% de Ph.



8 – Quels sont les critères régissant le choix du solvant qui sera utilisé pour dissoudre un échantillon avant injection sur une colonne CPG ? 1 point

Ce solvant doit :

- dissoudre tout le composé,
- générer un pic qui n'interfère pas avec celui (ou ceux) du(des) soluté(s),
- ne pas réagir chimiquement avec les constituants,
- ne pas être trop volatil pour éviter les phénomènes de discrimination,
- ne pas être agressif vis-à-vis de la colonne (eau) et du détecteur (solvants chlorés),
- être de polarité compatible avec la phase stationnaire.

9 – Expliquer en quoi consiste la méthode de l'étalon interne. 2 points

- injection d'une solution contenant des quantités connues des composés à analyser et d'un étalon, - détermination du coefficient de réponse relatif de chaque composé par rapport à l'étalon par intégration des aires de chaque pic chromatographique :

$$Q_{i/ét} = m_i/m_{ét} \times A_{ét} \cdot A_i,$$

- injection, dans les mêmes conditions, d'une solution de l'échantillon à quantifier contenant une masse connue d'étalon $m'_{ét}$ et intégration des aires obtenues A'_i et $A'_{ét}$. On a alors :

$$m'_i = m'_{ét} \times Q_{i/ét} \times A'_i/A'_{ét}$$

Rmq : il est préférable de préparer plusieurs gammes de concentrations de solutions étalons afin de réaliser une droite d'étalonnage de l'appareil. De plus, le résultat sera plus fiable si on moyenne les résultats sur plusieurs injections.

10 – Une analyse CPG est faite sur un appareil muni d'un détecteur FID. Est-il possible de déterminer les proportions relatives approchées de ces deux composés sans avoir à utiliser d'étalon? Justifier. 1 point

Sans étalonnage, il est possible de déterminer les proportions approchées de ces deux composés car le chromatographe utilisé est muni d'un détecteur à ionisation de flamme (FID), ce qui permet de calculer empiriquement la réponse de molécules organiques en termes de "nombre de carbones effectifs" et ainsi, d'obtenir une valeur approchée des coefficients de réponse relatifs des deux composés par rapport à un étalon.

C – Chromatographies Liquide Haute Performance (HPLC ou CLHP)

11 – D'après-vous, quels sont les avantages et inconvénients de l'HPLC par rapport à la CPG ? **2 points**

Avantages :

- grande sensibilité du détecteur
- vaste domaine d'application :
 - => même les composés non volatils peuvent être élués
 - => travail à température proche de la température ambiante donc même les composés thermo-sensibles peuvent être analysés
- phase mobile liquide => meilleure solubilité des analytes donc moins de limitations
- possibilité de travailler avec un mélange de solvants comme phase mobile

Inconvénients :

- coût (phase mobile = solvant)

NB : d'autres aspects peuvent avoir été évoqués, il ne s'agit dans cette correction que de quelques exemples.

12 – Si vous disposez de plusieurs solvants, quels sont les deux modes de travail possibles en HPLC ? Expliquer brièvement ce qu'est chacun de ces modes. **1 point**

Les deux modes sont le *mode isocratique* et le *mode gradients*.

Le mode isocratique consiste à utiliser une même composition de phase mobile tout au long de l'analyse. A l'inverse, on peut utiliser un mode gradients qui consiste à faire varier la composition de la phase mobile au cours de l'analyse.

13 – Une pompe HPLC fonctionne avec au moins deux pistons. Ces deux pistons sont-ils de volume identique ? Pourquoi ? **1 point**

Un des pistons à un volume inférieur à l'autre. De cette façon, lorsque ce dernier se vide, une partie de la phase mobile qu'il contient est utilisée pour remplir le piston de plus petit volume pendant que l'autre partie est envoyée vers la colonne. De cette façon, il n'y a pas interruption du débit dans la colonne.

14 – Que sont l'HPLC en phase normale et en phase inverse ? Préciser dans chaque cas le type de phase mobile à utiliser. **2 points**

L'HPLC en phase normale est l'utilisation d'une phase polaire. L'HPLC en phase inverse consiste à utiliser une phase apolaire.

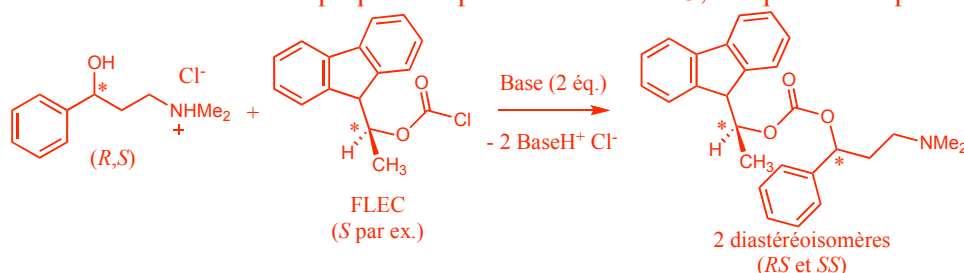
En HPLC sur phase normale, on utilise une phase mobile peu polaire alors qu'en HPLC sur phase inverse, on utilise une phase mobile polaire.

15 – Citer deux types de détecteurs utilisables en HPLC. **1 point**

Détecteur UV-Vis et réfractomètre.

16 – On réalise la synthèse d'un aminoalcool par hydrogénation asymétrique le hydrochlorure de 3-(N,N-diméthylamino)propio-phénone. Par quelle méthode est-il possible de déterminer l'excès énantiomérique obtenu si on ne dispose que d'une colonne HPLC achirale ? Détailler votre réponse. **2 points**

Il est possible de déterminer l'excès énantiomérique du produit obtenu lors de cette réaction en formant des diastéréoisomères par dérivation pré-colonne. En effet, on peut faire réagir les énantiomères obtenus lors de la réaction avec un réactif optiquement pur comme le FLEC, cf équation ci-après.



Session : 1

EPREUVE : Examen de Chromatographie

Durée : 1 h 30

Aucun document n'est autorisé - Les portables doivent être éteints et rangés.

On rappelle qu'en chromatographie, pour une phase mobile de vitesse moyenne \bar{u} , l'équation de van Deemter s'exprime par la relation simplifiée suivante :

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

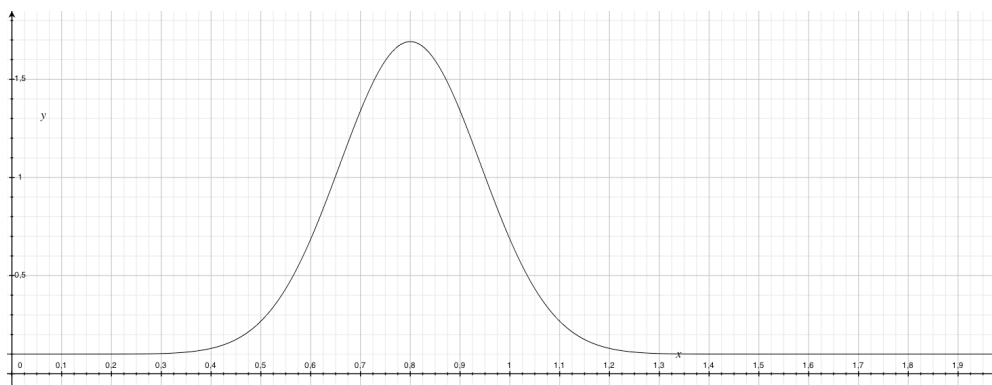
où B est proportionnel au coefficient de diffusion D_G du soluté dans la phase mobile, et C lui est inversement proportionnel.

A – Chromatographie – Généralités

1 – Dans la théorie de van Deemter, comment appelle-t-on le paramètre H ? Pourquoi dit-on que H doit être le plus petit possible ?

2 – L'allure d'un pic chromatographique suit une courbe de Gauss. Ce pic est souvent caractérisé par les quatre paramètres t_R , σ , δ et ω .

- Donner la signification de chacun de ces paramètres.
- Placer chacun d'entre-eux sur le pic ci-dessous en justifiant brièvement.



3 – Donner une formule permettant de calculer le facteur de résolution R entre deux pics chromatographiques consécutifs.

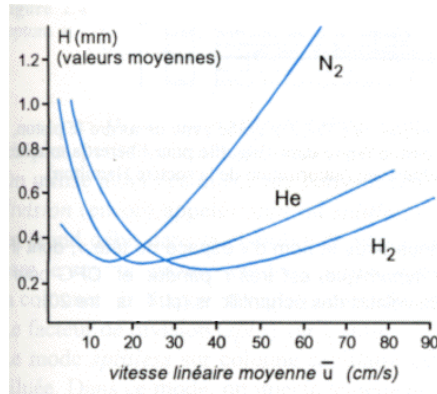
A partir de quelle valeur de R considère-t-on que ces deux pics sont bien séparés ?

4 – Un utilisateur inexpérimenté a injecté une quantité trop importante de composé dans un chromatographe. Quelle sera l'allure du pic obtenu par rapport à un pic idéal qui serait parfaitement Gaussien ? Justifier en quelques lignes en expliquant de façon qualitative ce qui se passe alors dans la colonne.

5 – Expliquer en quoi consiste la méthode de l'étalon externe.

B – Chromatographies en phase gazeuse (CPG)

6 – En CPG, trois gaz vecteurs sont principalement utilisés : N₂, He et H₂. En utilisant les courbes de van Deemter représentées ci-après, quel est d'après vous le gaz vecteur le plus performant ? Pourquoi ?



7 – Qu'est-ce qu'une injection en mode *split* ? Quelle est la différence avec une injection en mode *splitless* ?

8 – La colonne que vous avez utilisée en TP sur le GC-MS est une colonne Equity-5. Pourquoi la phase stationnaire de cette colonne est-elle qualifiée de « liquide supporté » ?

9 – Pour ne pas abîmer la phase stationnaire de la colonne, quelle sont les précautions à prendre vis-à-vis du gaz vecteur utilisé ?

10 – Une analyse CPG est faite sur un appareil muni d'un détecteur FID. Est-il possible de déterminer les proportions relatives approchées de ces deux composés sans avoir à utiliser d'étalon ? Justifier.

C – Chromatographies Liquide Haute Performance (HPLC ou CLHP)

11 – D'après-vous, quels sont les avantages et inconvénients de l'HPLC par rapport à la CPG ?

12 – En général, une chaîne HPLC est munie d'un dégazeur de solvant. Quelle est l'utilité de celui-ci ? Quel est le type de dégazeur qui est monté sur la chaîne HPLC que vous avez utilisé en TP ?

13 – Sur une pompe HPLC, par couple de pistons montés en série, pourquoi l'un des deux est-il deux fois plus gros que le second ?

14 – Quels sont les deux grands types de phase stationnaire utilisés en HPLC ? Donner brièvement leurs caractéristiques générales. Préciser dans chaque cas le type de phase mobile à utiliser.

15 – Lors de l'utilisation d'un mélange de solvants comme phase mobile, qu'appelle-t'on "*mode isocratique*" ? Par opposition, quel autre mode peut être utilisé et en quoi consiste t'il ? Quel est son principal inconvénient ?

16 – On réalise la synthèse d'un aminoalcool par hydrogénation asymétrique du chlorhydrate de 3-(N,N-diméthylamino)propiophénone. Par quelle méthode est-il possible de déterminer l'excès énantiomérique obtenu si on ne dispose que d'une colonne HPLC contenant une phase stationnaire achirale ? Détailler votre réponse.

Session : 1

EPREUVE : **Examen de Chromatographie Corrigé**

Durée : 1 h 30

Aucun document n'est autorisé - Les portables doivent être éteints et rangés.

On rappelle qu'en chromatographie, pour une phase mobile de vitesse moyenne \bar{u} , l'équation de van Deemter s'exprime par la relation simplifiée suivante :

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

où B est proportionnel au coefficient de diffusion D_G du soluté dans la phase mobile, et C lui est inversement proportionnel.

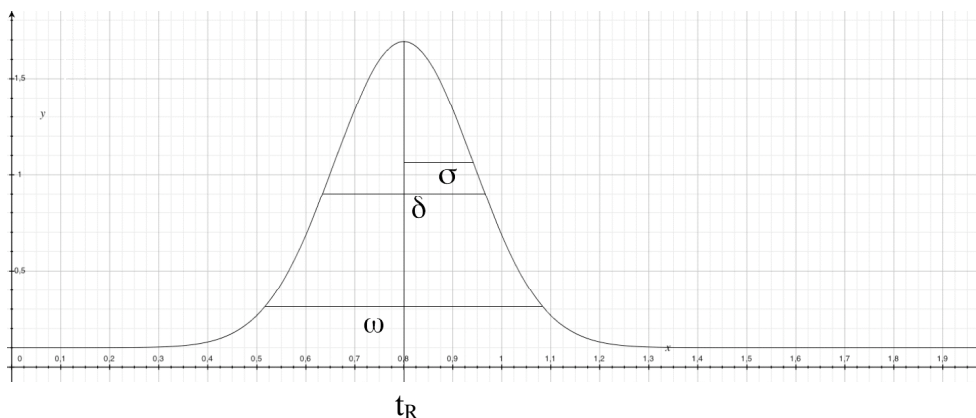
A – Chromatographie – Généralités

1 – Dans la théorie de van Deemter, comment appelle-t-on le paramètre H ? Pourquoi dit-on que H doit être le plus petit possible ? **1 point**

H est la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT). H doit être le plus petit possible de façon à avoir un nombre N de plateaux théoriques le plus grand ($N = L/H$ avec L : longueur de la colonne) et donc à avoir la meilleure séparation possible.

2 – L'allure d'un pic chromatographique suit une courbe de Gauss. Ce pic est souvent caractérisé par les quatre paramètres t_R , σ , δ et ω . **2 points**

- Donner la signification de chacun de ces paramètres.
 t_R : temps de rétention du composé
 σ : demi-largeur au niveau des points d'inflexion (écart type de la gaussienne)
 δ : largeur à mi-hauteur
 ω : largeur à la base du pic
- Placer chacun d'entre-eux sur le pic ci-dessous en justifiant brièvement.



- t_R : abscisse du sommet du pic
- σ : demi-largeur à 60,6 % de la hauteur
- δ : largeur à 50 % de la hauteur
- ω : largeur à 13,5 % de la hauteur

3 – Donner une formule permettant de calculer le facteur de résolution R entre deux pics chromatographiques consécutifs. **2 points**

Facteur de résolution : $R = 2 \cdot \frac{t_R^2 - t_R^1}{\omega_1 + \omega_2}$ avec ω = largeur du pic à 13,5% de sa hauteur

ou, plus facile à utiliser : $R = 1,18 \cdot \frac{t_R^2 - t_R^1}{\delta_1 + \delta_2}$ avec δ = largeur du pic à mi-hauteur.

A partir de quelle valeur de R considère-t'on que ces deux pics sont bien séparés ?

On considère que deux pics sont bien résolus si $R > 1,5$.

4 – Un utilisateur inexpérimenté a injecté une quantité trop importante de composé dans un chromatographe. Quelle sera l'allure du pic obtenu par rapport à un pic idéal qui serait parfaitement Gaussien ? Justifier en quelques lignes en expliquant de façon qualitative ce qui se passe alors dans la colonne. **2 points**

Lors de l'injection d'une trop grande quantité de soluté dans une colonne, la phase stationnaire se retrouve saturée et, en 1^{ère} approximation, on peut considérer qu'une grande partie de l'échantillon reste dans la phase mobile. On peut alors concevoir que cette fraction de l'échantillon sortira très vite, conduisant à une montée abrupte du pic, tandis que le reste, ralenti par la phase stationnaire, génèrera une traînée ("Tailing").

5 – Expliquer en quoi consiste la méthode de l'étalon externe. **3 points**

- injection d'une solution étalon contenant une quantité connue du composé à analyser,

- intégration de l'aire du pic chromatographique :

$$m_i = Q_i \times A_i \Rightarrow Q_i = m_i / A_i$$

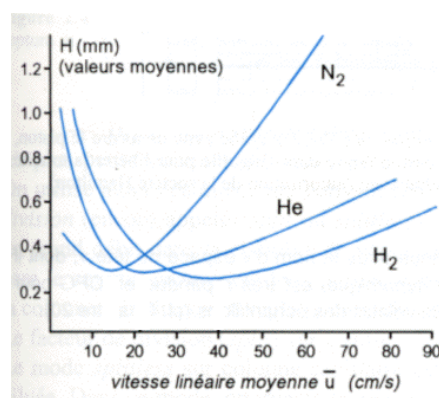
- injection, dans les mêmes conditions, d'une solution de l'échantillon à quantifier et intégration de l'aire obtenue A'_i . On a alors :

$$m'_i = Q_i \times A'_i = m_i \times A'_i / A_i$$

Rmq : il est préférable de préparer plusieurs gammes de concentrations de solutions étalons afin de tracer une droite d'étalonnage de l'appareil. De plus, le résultat sera plus fiable si on moyenne les résultats sur plusieurs injections.

B – Chromatographies en phase gazeuse (CPG)

6 – En CPG, trois gaz vecteurs sont principalement utilisés : N_2 , He et H_2 . En utilisant les courbes de van Deemter représentées ci-après, quel est d'après vous le gaz vecteur le plus performant ? Pourquoi ? **3 points**



Le gaz vecteur le plus performant est H_2 . Sa HEPT a une valeur plus faible que celle des deux autres gaz, elle correspond à une vitesse de gaz plus élevée d'où une plus grande rapidité d'analyse et la pente de la courbe remonte moins fortement après la HEPT donc il y a plus de latitude pour jouer sur le débit sans trop pénaliser la séparation.

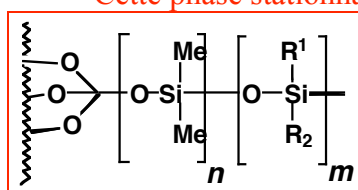
7 – Qu'est-ce qu'une injection en mode *split* ? Quelle est la différence avec une injection en mode *splitless* ? 1 point

Mode split : Une fuite volontaire est créée en bas de l'injecteur par une vanne de façon que seule une petite partie (1/20e à 1/500e) de l'échantillon injecté ne passe dans la colonne.

Mode splitless : On utilisera cette méthode pour l'analyse d'échantillons très dilués (traces). La totalité de l'échantillon va se recondenser en tête de colonne, celle-ci étant maintenue à une température suffisamment basse pour que le solvant précède les composés dans la colonne (recondensation des composés en tête de colonne). Lorsque tout l'échantillon est parti dans la colonne (env. 1 min.), on ouvre la vanne pour éliminer les traces éventuelles qui parasiteraient les injections suivantes.

8 – La colonne que vous avez utilisée en TP sur le GC-MS est une colonne Equity-5. Pourquoi la phase stationnaire de cette colonne est-elle qualifiée de « liquide supporté » ? 1 point

Cette phase stationnaires est à base de polysiloxanes greffés.



* si $R^1 = \text{Me}$, $R^2 = \text{Ph}$

$n = 95$, $m = 5$

Cette phase peut être qualifiée de "liquide supporté" car elle est constituée de très longues chaînes greffées en une de leur extrémité sur le colonne. La longueur de ces chaînes permet une grande fluxionalité et, par conséquent, un comportement proche de celui-d'un liquide.

9 – Pour ne pas abîmer la phase stationnaire de la colonne, quelle sont les précautions à prendre vis-à-vis du gaz vecteur utilisé ? 1 point

Ce gaz doit être de pureté suffisante et en particulier être exempt de traces d'eau (risque d'hydrolyse de la phase stationnaire) et d'oxygène (dégradation de la phase stationnaire).

10 – Une analyse CPG est faite sur un appareil muni d'un détecteur FID. Est-il possible de déterminer les proportions relatives approchées de ces deux composés sans avoir à utiliser d'étalon? Justifier. 2 points

Sans étalonnage, il est possible de déterminer les proportions approchées de ces deux composés car le chromatographe utilisé est muni d'un détecteur à ionisation de flamme (FID), ce qui permet de calculer empiriquement la réponse de molécules organiques en termes de "nombre de carbones effectifs" et ainsi, d'obtenir une valeur approchée des coefficients de réponse relatifs des deux composés par rapport à un étalon.

C – Chromatographies Liquide Haute Performance (HPLC ou CLHP)

11 – D'après-vous, quels sont les avantages et inconvénients de l'HPLC par rapport à la CPG ? 2 points

Avantages :

- grande sensibilité du détecteur
- vaste domaine d'application :
 - => même les composés non volatils peuvent être élués
 - => travail à température proche de la température ambiante donc même les composés thermo-sensibles peuvent être analysés
- phase mobile liquide => meilleure solubilité des analytes donc moins de limitations
- possibilité de travailler avec un mélange de solvants comme phase mobile

Inconvénients :

- coût (phase mobile = solvant)

NB : d'autres aspects peuvent avoir été évoqués, il ne s'agit dans cette correction que de quelques exemples.

12 – En général, une chaîne HPLC est munie d'un dégazeur de solvant. Quelle est l'utilité de celui-ci ? Quel est le type de dégazeur qui est monté sur la chaîne HPLC que vous avez utilisé en TP ?

2 points

Le dégazeur, comme son nom l'indique, permet d'éliminer les gaz dissous dans la phase mobile (N_2 , O_2 , CO_2 ...) qui peuvent modifier la compressibilité de celle-ci et par conséquent perturber l'élution. La chaîne HPLC de TP possède un dégazeur à membrane (polyfluoroéthylène).

13 – Sur une pompe HPLC, par couple de pistons montés en série, pourquoi l'un des deux est-il deux fois plus gros que le second ? 1 point

Lorsque le piston le plus gros se vide, une partie de la phase mobile qu'il contient est utilisée pour remplir le piston de plus petit volume pendant que l'autre partie est envoyée vers la colonne. De cette façon, il n'y a pas interruption du débit dans la colonne.

14 – Quels sont les deux grands types de phase stationnaire utilisés en HPLC ? Donner brièvement leurs caractéristiques générales. Préciser dans chaque cas le type de phase mobile à utiliser.

2 points

Il s'agit de la phase dite « normale » et de la phase dite « inverse ». L'HPLC en phase normale est l'utilisation d'une phase polaire, généralement un gel de silice qui possède en surface des groupes silanol (Si-OH). L'HPLC en phase inverse consiste à utiliser une phase apolaire constituée d'une silice sur laquelle est greffée une couche de molécules carbonées linéaires à longues chaînes (C_8 à C_{18}).

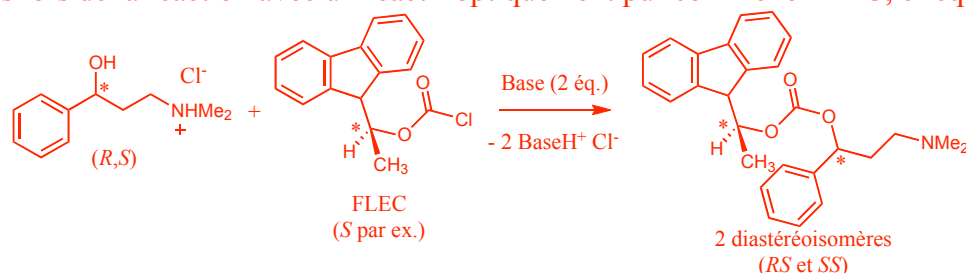
En HPLC sur phase normale, on utilise une phase mobile peu polaire alors qu'en HPLC sur phase inverse, on utilise une phase mobile polaire.

15 – Lors de l'utilisation d'un mélange de solvants comme phase mobile, qu'appelle-t-on "mode isocratique" ? Par opposition, quel autre mode peut être utilisé et en quoi consiste-t'il ? Quel est son principal inconvénient ? 3 points

Le mode isocratique consiste à utiliser une même composition de phase mobile tout au long de l'analyse. A l'inverse, on peut utiliser un mode gradients qui consiste à faire varier la composition de la phase mobile au cours de l'analyse. Le principal inconvénient de ce dernier mode est qu'avant de pouvoir recommencer une analyse, il faut purger le système (environ 10 fois le volume mort) pour revenir à l'état initial.

16 – On réalise la synthèse d'un aminoalcool par hydrogénation asymétrique du chlorhydrate de 3-(N,N-diméthylamino)propiophénone. Par quelle méthode est-il possible de déterminer l'excès énantiomérique obtenu si on ne dispose que d'une colonne HPLC contenant une phase stationnaire achirale ? Détailler votre réponse. 2 points

Il est possible de déterminer l'excès énantiomérique du produit obtenu lors de cette réaction en formant des diastéréoisomères par dérivation pré-colonne. En effet, on peut faire réagir les énantiomères obtenus lors de la réaction avec un réactif optiquement pur comme le FLEC, cf équation ci-après.



Session : 1

EPREUVE : Examen de Chromatographie

Durée : 1 h 30

Aucun document n'est autorisé - Les téléphones portables doivent être éteints et rangés.

On rappelle qu'en chromatographie, pour une phase mobile de vitesse moyenne \bar{u} , l'équation de van Deemter s'exprime par la relation simplifiée suivante :

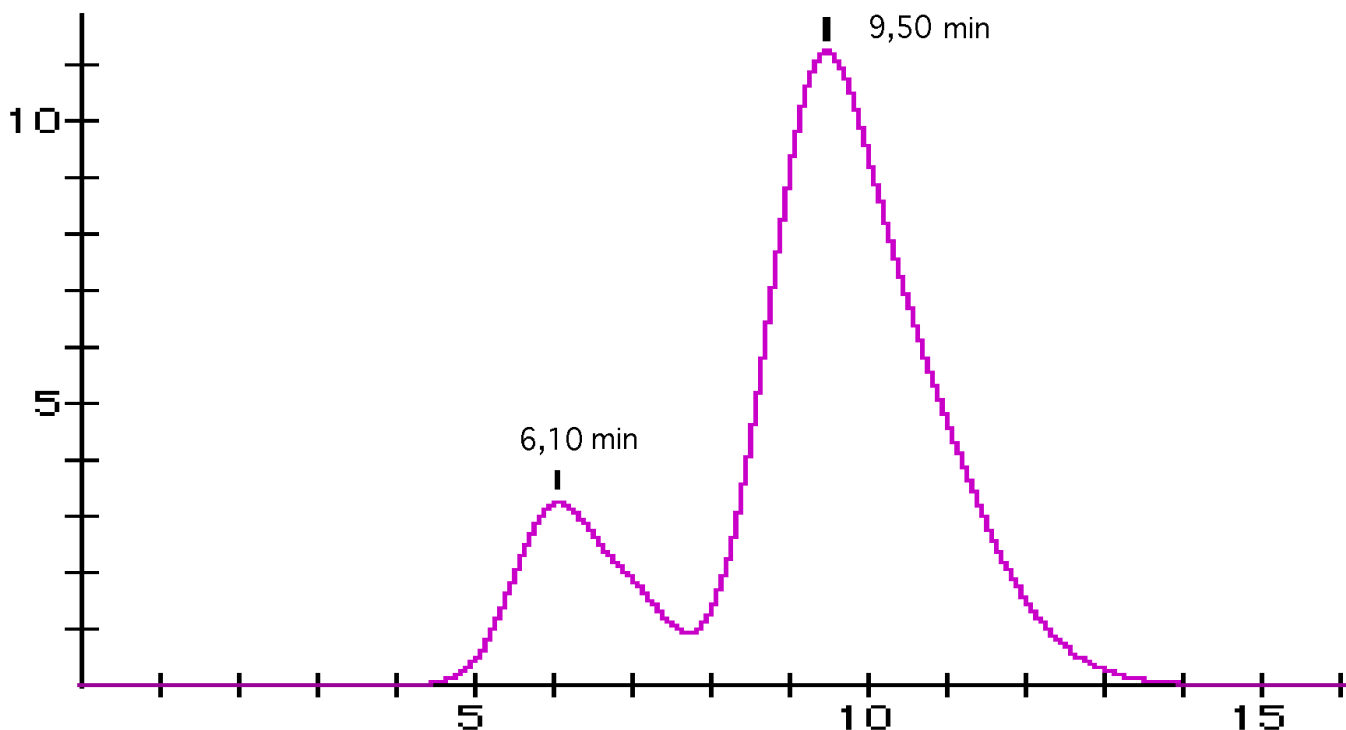
$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C\bar{u}$$

où B est proportionnel au coefficient de diffusion D_G du soluté dans la phase mobile, et C lui est inversement proportionnel.

A – Chromatographie – Généralités

1 – Dans la théorie de van Deemter, comment appelle-t-on le paramètre H ? Pour avoir une bonne séparation chromatographique, vaut-il mieux avoir un H petit ou grand ? Pourquoi ?

2 – Donner une formule permettant de calculer le facteur de résolution entre deux pics chromatographiques et l'appliquer au chromatogramme ci-après. A votre avis, les deux pics de ce chromatogramme sont-ils bien résolus ? Pourquoi ?



3 – En négligeant les volumes morts de l'injecteur et du détecteur d'un chromatographe, et en considérant qu'à débit D constant, on peut passer de la grandeur "temps" (t) à la grandeur "volume" (V) par la relation $V = t \times D$:

- Comment peut-on déterminer, en s'aidant d'un chromatogramme, le volume de phase stationnaire dans la colonne ?
- Comment peut-on, d'après ce chromatogramme, calculer le facteur de rétention k d'un composé sur cette colonne ? Justifier votre réponse.
- De quoi k est-il révélateur ? En règle générale, préfère-t-on avoir une valeur de k élevée ou faible ? Pourquoi ?

4 – Expliquer en quoi consiste la méthode de l'étalon interne.

B – Chromatographies en phase gazeuse (CPG)

5 – Lors de l'utilisation d'un gaz vecteur de faible densité comme le dihydrogène (H_2), une vitesse moyenne élevée de phase mobile doit être utilisée afin d'obtenir une séparation satisfaisante. Expliquer pourquoi en utilisant l'équation de van Deemter.

6 – Qu'est-ce qu'une injection en mode *split* ? Quelle est la différence avec une injection en mode *splitless* ?

7 – Dessiner la coupe transversale schématique d'une colonne capillaire 0,25 mm et en indiquer les différents constituants.

8 – Pour ne pas abîmer la phase stationnaire de la colonne, quelles sont les précautions à prendre vis-à-vis du gaz vecteur utilisé ?

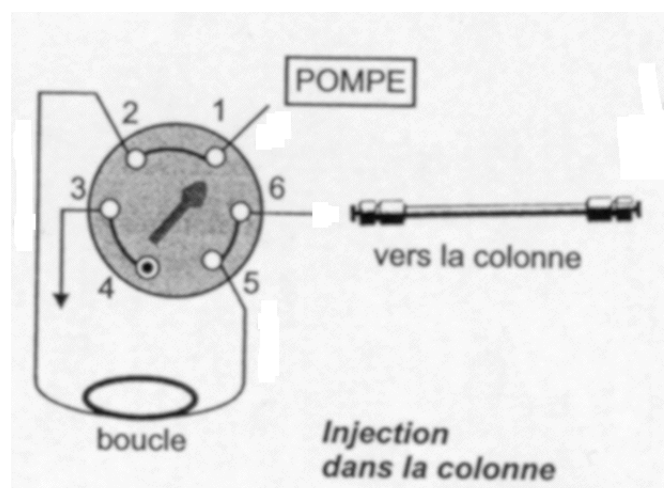
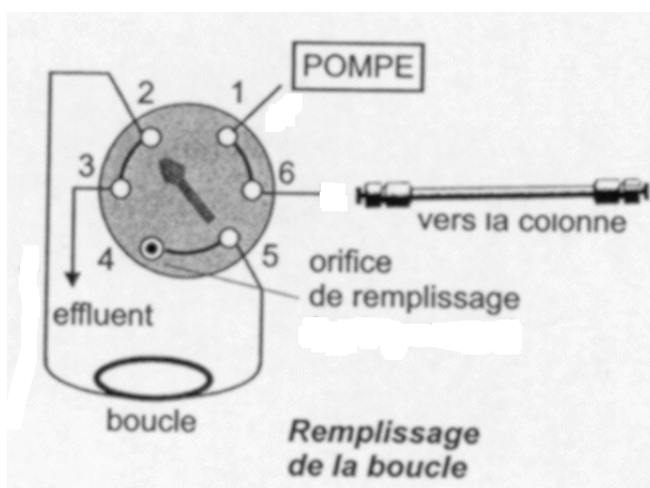
9 – Une analyse CPG est faite sur un appareil muni d'un détecteur FID. Est-il possible de déterminer les proportions relatives approchées de ces deux composés sans avoir à utiliser d'étalon? Justifier.

C – Chromatographies Liquide Haute Performance (HPLC ou CLHP)

10 – D'après-vous, quels sont les avantages et inconvénients de l'HPLC par rapport à la CPG ?

11 – L'utilisation d'une vanne Rheodyne® est très courante parmi les méthodes d'injection possibles en HPLC.

- Expliquer son principe à l'aide des schémas ci-dessous.
- Quelle condition doit alors remplir le volume prélevé à la seringue ?



12 – Sur une pompe HPLC, par couple de pistons montés en série, pourquoi l'un des deux est-il deux fois plus gros que le second ?

13 – Citer deux types de détecteurs utilisables en HPLC.

14 – Lors de l'utilisation d'un mélange de solvants comme phase mobile, qu'appelle-t'on "*mode isocratique*" ? Par opposition, quel autre mode peut être utilisé et en quoi consiste t'il ? Quel est son principal inconvénient ?

15 – Qu'appelle-t'on "chromatographie en phase normale" ?

Session : 1

EPREUVE : Examen de Chromatographie

Durée : 1 h 30

Aucun document n'est autorisé - Les téléphones portables doivent être éteints et rangés.

On rappelle qu'en chromatographie, pour une phase mobile de vitesse moyenne \bar{u} , l'équation de van Deemter s'exprime par la relation simplifiée suivante :

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

où B est proportionnel au coefficient de diffusion D_G du soluté dans la phase mobile, et C lui est inversement proportionnel.

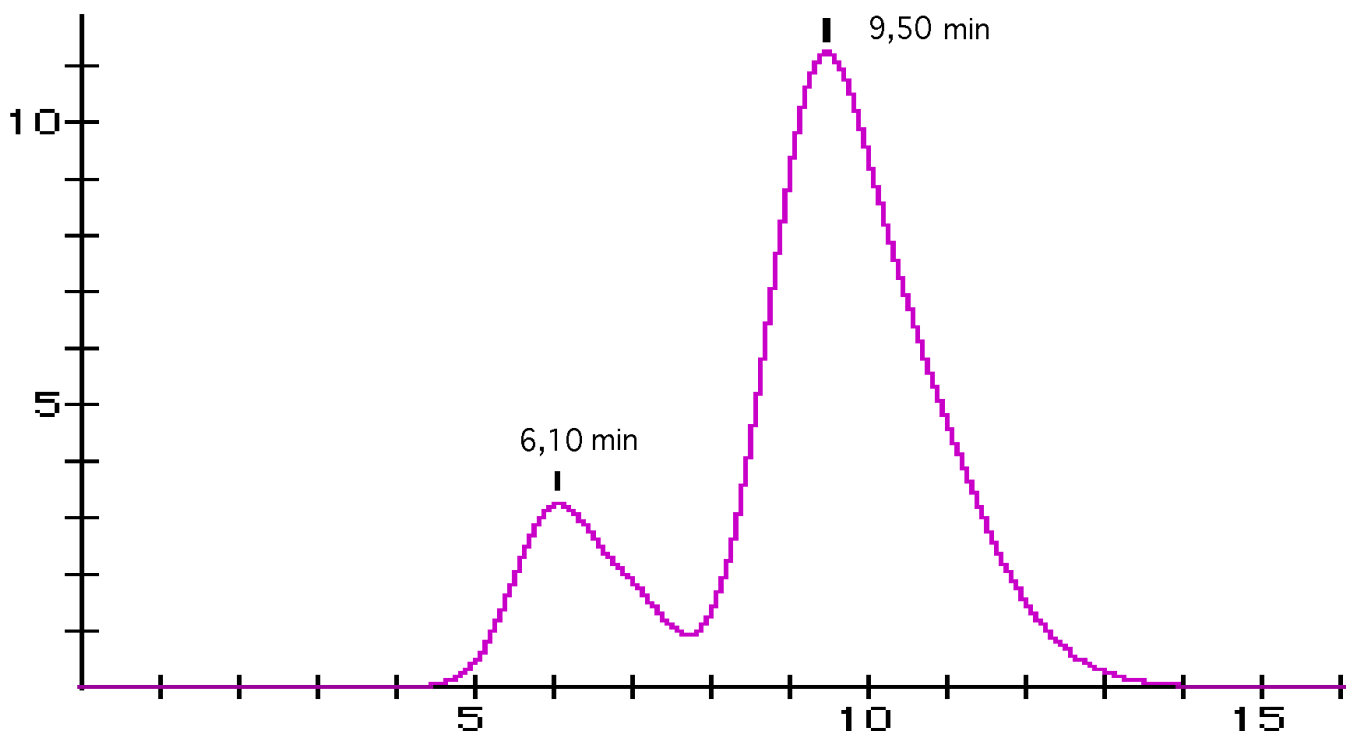
A – Chromatographie – Généralités

1 – Dans la théorie de van Deemter, comment appelle-t-on le paramètre H ? Pour avoir une bonne séparation chromatographique, vaut-il mieux avoir un H petit ou grand ? Pourquoi ? **1 point**

H est la Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique (HEPT).

La HEPT est aussi donnée par la relation $H = L/N$ où L est la longueur de la colonne et N le nombre de plateaux théoriques, inversement proportionnel à H . Etant donné que plus N est grand, meilleure est la séparation, il faut donc avoir H petit pour avoir une bonne séparation.

2 – Donner une formule permettant de calculer le facteur de résolution entre deux pics chromatographiques et l'appliquer au chromatogramme ci-après. A votre avis, les deux pics de ce chromatogramme sont-ils bien résolus ? Pourquoi ? **3 points**



Facteur de résolution : $R = 2 \cdot \frac{t_R^2 - t_R^1}{\omega_1 + \omega_2}$ avec ω = largeur du pic à 13,5% de sa hauteur

ou, plus facile à utiliser : $R = 1,18 \cdot \frac{t_R^2 - t_R^1}{\delta_1 + \delta_2}$ avec δ = largeur du pic à mi-hauteur.

NB : pour l'application au chromatogramme ci-avant, si la mesure des t_R est en min, il faut prendre δ en min également. Sinon, utiliser les cm pour δ et t_R . Dans la correction ci-après, les mesures sont en cm.

Sur le chromatogramme, cela donne : $R = 1,18 \cdot \frac{9,95 - 6,30}{1,85 + 2,25} = 1,05$

Les deux pics sont donc mal résolus puisque l'on considère que deux pics sont bien résolus si $R > 1,5$.

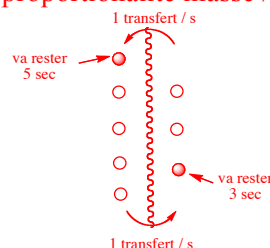
NB : cela se voit nettement sur le chromatogramme car il n'y a pas retour à la ligne de base entre les deux pics.

3 – En négligeant les volumes morts de l'injecteur et du détecteur d'un chromatographe, et en considérant qu'à débit D constant, on peut passer de la grandeur "temps" (t) à la grandeur "volume" (V) par la relation $V = t \times D$:

- Comment peut-on déterminer, en s'aidant d'un chromatogramme, le volume de phase stationnaire dans la colonne ? **1 point** Si un produit n'est pas retenu par la phase stationnaire, on peut considérer qu'il n'est présent que dans la phase mobile. Par conséquent, le temps de rétention de ce produit, alors également temps mort de la colonne, représente la durée que met la phase mobile à parcourir la colonne. A débit D constant, on peut donc obtenir le volume de phase mobile : $V_M = t_M \times D$. Pour calculer le volume de phase stationnaire de la colonne, il suffit alors de retrancher ce volume de phase mobile V_M au volume total de la colonne, calculé d'après ses dimensions

- Comment peut-on, d'après ce chromatogramme, calculer le facteur de rétention k d'un composé sur cette colonne ? Justifier votre réponse. **2 points** $k = t_R / t_M$. En effet, le temps passé par chaque molécule dans chaque phase est proportionnel au nombre de ces molécules, donc à la masse de composé, dans chaque phase. Donc étant donné que $k = m_S / m_M$, nous avons également la relation $k = t_S / t_M$. En négligeant les temps morts de l'injecteur et du détecteur, t_S peut être assimilé à t_R donc $k = t_R / t_M$, mesurable sur le chromatogramme.

Illustration de la proportionalité masse / durée de séjour :



- De quoi k est-il révélateur ? En règle générale, préfère-t-on avoir une valeur de k élevée ou faible ? Pourquoi ? **1 point** k est révélateur du comportement de la colonne vis-à-vis du composé. On préfère avoir une valeur de k faible pour ne pas rallonger la durée de l'analyse

4 – Expliquer en quoi consiste la méthode de l'étalon interne. **2 points**

- injection d'une solution contenant des quantités connues des composés à analyser et d'un étalon,
- détermination du coefficient de réponse relatif de chaque composé par rapport à l'étalon par intégration des aires de chaque pic chromatographique :

$$Q_{i/ét} = m_i/m_{ét} \times A_{ét} \cdot A_i$$

- injection, dans les mêmes conditions, d'une solution de l'échantillon à quantifier contenant une masse connue d'étalon $m'_{ét}$ et intégration des aires obtenues A'_i et $A'_{ét}$. On a alors :

$$m'_i = m'_{ét} \times Q_{i/ét} \times A'_i/A'_{ét}$$

Rmq : il est préférable de préparer plusieurs gammes de concentrations de solutions étalons afin de réaliser une droite d'étalonnage de l'appareil. De plus, le résultat sera plus fiable si on moyenne les résultats sur plusieurs injections.

B – Chromatographies en phase gazeuse (CPG)

5 – Lors de l'utilisation d'un gaz vecteur de faible densité comme le dihydrogène (H_2), une vitesse moyenne élevée de phase mobile doit être utilisée afin d'obtenir une séparation satisfaisante. Expliquer pourquoi en utilisant l'équation de van Deemter. **2 points**

Lors de l'utilisation d'un gaz vecteur peu dense, il y aura peu de chocs entre les molécules de gaz vecteur et la substance à analyser (faible probabilité de rencontre des molécules). On peut donc considérer que cette substance sera difficilement "poussée" dans la colonne par le gaz et aura le temps de diffuser. Le coefficient de diffusion D_G sera donc grand, ce qui entraîne que dans l'équation de van Deemter, la valeur de B sera également grande tandis que celle de C sera petite. Par suite, le terme B/u l'emporte sur le terme C et l'équation de van Deemter devient en première approximation :

$$H \approx A + \frac{B}{u}$$

Pour avoir une efficacité maximum de la colonne (donc H le plus petit possible), il faudra utiliser une vitesse de gaz vecteur (u) élevée.

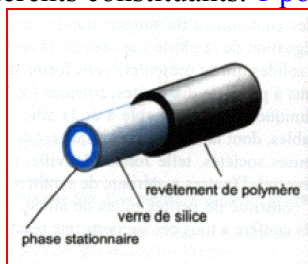
NB : Cela revient à augmenter la probabilité de chocs entre molécules du gaz vecteur et molécules du soluté par unité de temps.

6 – Qu'est-ce qu'une injection en mode *split* ? Quelle est la différence avec une injection en mode *splitless* ? **1 point**

Mode split : Une fuite volontaire est créée en bas de l'injecteur par une vanne de façon que seule une petite partie (1/20e à 1/500e) de l'échantillon injecté ne passe dans la colonne.

Mode splitless : On utilisera cette méthode pour l'analyse d'échantillons très dilués (traces). La totalité de l'échantillon va se recondenser en tête de colonne, celle-ci étant maintenue à une température suffisamment basse pour que le solvant précède les composés dans la colonne (recondensation des composés en tête de colonne). Lorsque tout l'échantillon est parti dans la colonne (env. 1 min.), on ouvre la vanne pour éliminer les traces éventuelles qui parasiteraient les injections suivantes.

7 – Dessiner la coupe transversale schématique d'une colonne capillaire 0,25 mm et en indiquer les différents constituants. **1 point**



8 – Pour ne pas abîmer la phase stationnaire de la colonne, quelles sont les précautions à prendre vis-à-vis du gaz vecteur utilisé ? **1 point**

Ce gaz doit être de pureté suffisante et en particulier être exempt de traces d'eau (risque d'hydrolyse de la phase stationnaire) et d'oxygène (dégradation de la phase stationnaire).

9 – Une analyse CPG est faite sur un appareil muni d'un détecteur FID. Est-il possible de déterminer les proportions relatives approchées de ces deux composés sans avoir à utiliser d'étalon? Justifier. 2 points

Sans étalonnage, il est possible de déterminer les proportions approchées de ces deux composés car le chromatographe utilisé est muni d'un détecteur à ionisation de flamme (FID), ce qui permet de calculer empiriquement la réponse de molécules organiques en termes de "nombre de carbones effectifs" et ainsi, d'obtenir une valeur approchée des coefficients de réponse relatifs des deux composés par rapport à un étalon.

C – Chromatographies Liquide Haute Performance (HPLC ou CLHP)

10 – D'après-vous, quels sont les avantages et inconvénients de l'HPLC par rapport à la CPG ? 2 points

Avantages :

- grande sensibilité du détecteur
- vaste domaine d'application :
 - => même les composés non volatils peuvent être élués
 - => travail à température proche de la température ambiante donc même les composés thermo-sensibles peuvent être analysés
- phase mobile liquide => meilleure solubilité des analytes donc moins de limitations
- possibilité de travailler avec un mélange de solvants comme phase mobile

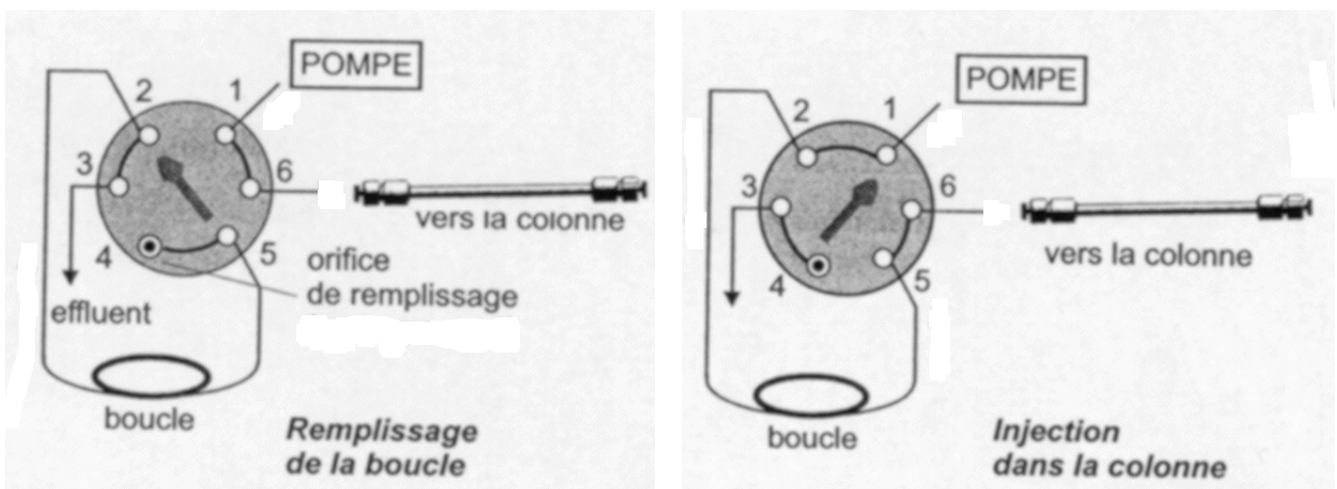
Inconvénients :

- coût (phase mobile = solvant)

NB : d'autres aspects peuvent avoir été évoqués, il ne s'agit dans cette correction que de quelques exemples.

11 – L'utilisation d'une vanne Rheodyne® est très courante parmi les méthodes d'injection possibles en HPLC.

- Expliquer son principe à l'aide des schémas ci-dessous. 1 point
- Quelle condition doit alors remplir le volume prélevé à la seringue ? 1 point



Principe : En position A, la colonne (port 6) est directement connectée à la pompe (port 1) et est donc alimentée en phase mobile. En parallèle, la solution à chromatographier est injectée en port 4 dans une boucle jusqu'à ce que celle-ci déborde (sortie par le port 3).

Pour l'injection, la manette est tournée de façon à connecter la boucle au circuit de phase mobile. Cette dernière va donc entraîner la solution présente dans la boucle vers la colonne.

Condition : le volume de solution prélevé à la seringue doit être supérieur au volume de la boucle de façon à la remplir totalement.

12 – Sur une pompe HPLC, par couple de pistons montés en série, pourquoi l'un des deux est-il deux fois plus gros que le second ? **1 point**

Lorsque le piston le plus gros se vide, une partie de la phase mobile qu'il contient est utilisée pour remplir le piston de plus petit volume pendant que l'autre partie est envoyée vers la colonne. De cette façon, il n'y a pas interruption du débit dans la colonne.

13 – Citer deux types de détecteurs utilisables en HPLC. **1 point**

Détecteur UV-Vis et réfractomètre.

14 – Lors de l'utilisation d'un mélange de solvants comme phase mobile, qu'appelle-t-on "*mode isocratique*" ? Par opposition, quel autre mode peut être utilisé et en quoi consiste t'il ? Quel est son principal inconvénient ? **3 points**

Le mode isocratique consiste à utiliser une même composition de phase mobile tout au long de l'analyse. A l'inverse, on peut utiliser un mode gradients qui consiste à faire varier la composition de la phase mobile au cours de l'analyse. Le principal inconvénient de ce dernier mode est qu'avant de pouvoir recommencer une analyse, il faut purger le système (environ 10 fois le volume mort) pour revenir à l'état initial.

15 – Qu'appelle-t-on "chromatographie en phase normale" ? **1 point**

L'HPLC en phase normale est l'utilisation d'une phase polaire. On utilise alors une phase mobile peu polaire.

Session : 1

EPREUVE : Examen de Chromatographie

Durée : 1 h 30

Aucun document n'est autorisé - Les téléphones portables doivent être éteints et rangés.

On rappelle qu'en chromatographie, pour une phase mobile de vitesse moyenne \bar{u} , l'équation de van Deemter s'exprime par la relation simplifiée suivante :

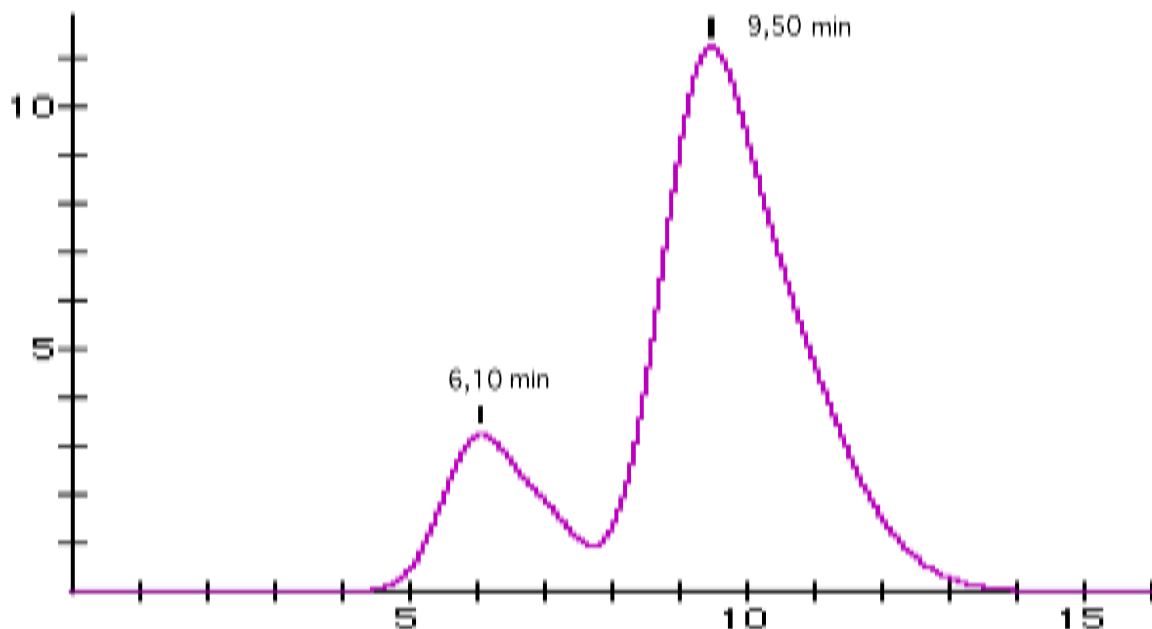
$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C\bar{u}$$

où B est proportionnel au coefficient de diffusion D_G du soluté dans la phase mobile, et C lui est inversement proportionnel.

A – Chromatographie – Généralités

1 – Dans la théorie de van Deemter, comment appelle-t-on le paramètre H ? Pour avoir une bonne séparation chromatographique, vaut-il mieux avoir un H petit ou grand ? Pourquoi ?

2 – Donner une formule permettant de calculer le facteur de résolution entre deux pics chromatographiques et l'appliquer au chromatogramme ci-après. A votre avis, les deux pics de ce chromatogramme sont-ils bien résolus ? Pourquoi ?



3 – Lorsqu'un composé est élué sur une colonne et génère un pic chromatographique parfaitement gaussien, comment peut-on déterminer le nombre de plateaux théoriques N correspondant à ce composé sur cette colonne ?

4 – Expliquer en quoi consiste la méthode de l'étalon interne.

B – Chromatographies en phase gazeuse (CPG)

5 – Lors de l'utilisation d'un gaz vecteur de faible densité comme le dihydrogène (H_2), une vitesse moyenne élevée de phase mobile doit être utilisée afin d'obtenir une séparation satisfaisante. Expliquer pourquoi en utilisant l'équation de van Deemter.

6 – Qu'est-ce qu'une injection en mode *splitless* ? Quelle est la différence avec une injection en mode *split* ?

7 – Dessiner la coupe transversale schématique d'une colonne 0,53 mm et en indiquer les différents constituants.

La colonne que vous avez utilisée en TP sur le GC-MS est une colonne Equity-5. Préciser la structure de la phase stationnaire contenue dans cette colonne.

8 – Pour ne pas abîmer la phase stationnaire de la colonne, quelles sont les précautions à prendre vis-à-vis du gaz vecteur utilisé ?

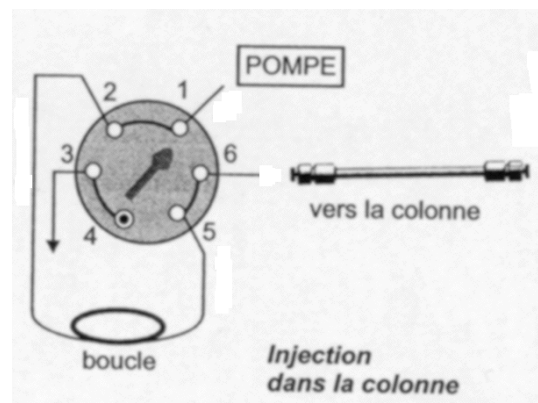
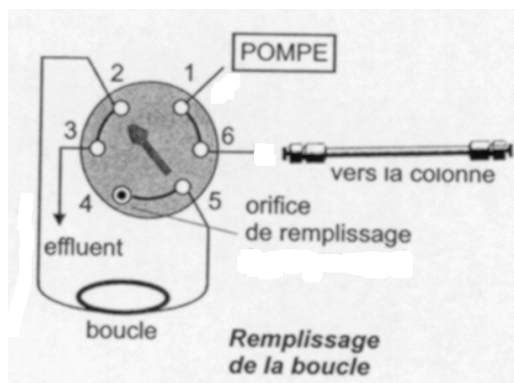
9 – Une analyse CPG est faite sur un appareil muni d'un détecteur FID. Est-il possible de déterminer les proportions relatives approchées de ces deux composés sans avoir à utiliser d'étalon? Justifier.

C – Chromatographies Liquide Haute Performance (HPLC ou CLHP)

10 – D'après-vous, quels sont les avantages et inconvénients de l'HPLC par rapport à la CPG ?

11 – L'utilisation d'une vanne Rheodyne[®] est très courante parmi les méthodes d'injection possibles en HPLC.

- Expliquer son principe à l'aide des schémas ci-dessous.
- Quelle condition doit alors remplir le volume prélevé à la seringue ?



12 – Quels sont les deux grands types de phase stationnaire utilisés en HPLC ? Donner brièvement leurs caractéristiques générales. Préciser dans chaque cas le type de phase mobile à utiliser.

13 – Citer deux types de détecteurs utilisables en HPLC.

14 – Lors de l'utilisation d'un mélange de solvants comme phase mobile, qu'appelle-t-on "*mode isocratique*" ? Par opposition, quel autre mode peut être utilisé et en quoi consiste-t'il ? Quel est son principal inconvénient ?

Session : 1

EPREUVE : **Examen de Chromatographie**

Corrigé Note = total / 30 x 20

Durée : 1 h 30

Aucun document n'est autorisé - Les téléphones portables doivent être éteints et rangés.

On rappelle qu'en chromatographie, pour une phase mobile de vitesse moyenne \bar{u} , l'équation de van Deemter s'exprime par la relation simplifiée suivante :

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

où B est proportionnel au coefficient de diffusion D_G du soluté dans la phase mobile, et C lui est inversement proportionnel.

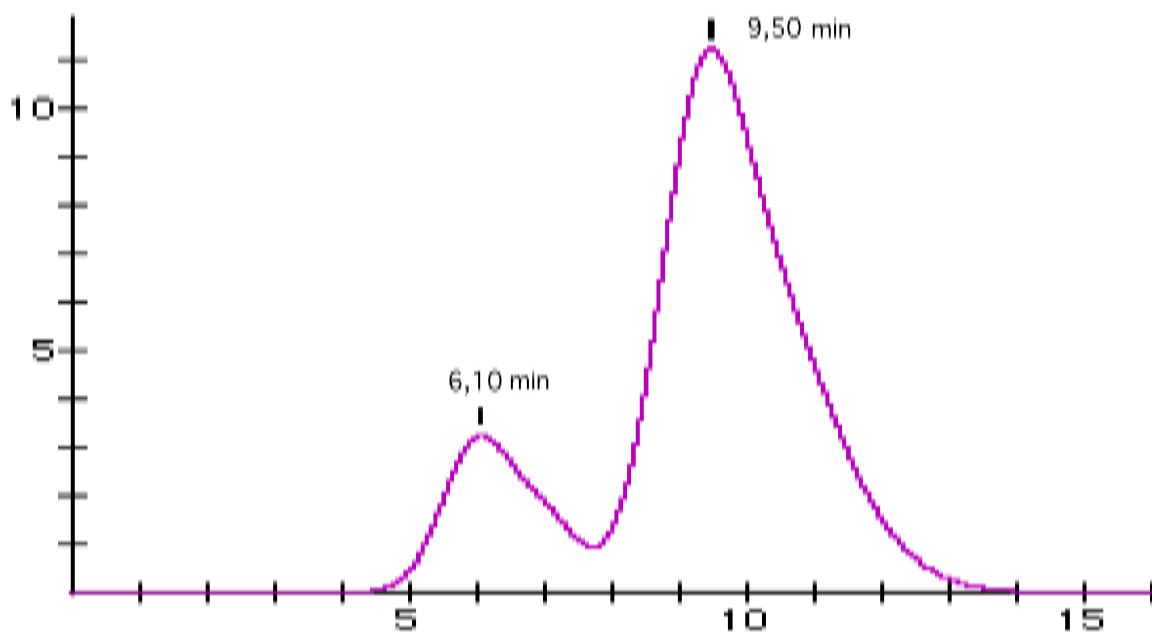
A – Chromatographie – Généralités

1 – Dans la théorie de van Deemter, comment appelle-t-on le paramètre H ? Pour avoir une bonne séparation chromatographique, vaut-il mieux avoir un H petit ou grand ? Pourquoi ? **2 points**

H est la Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique (HEPT).

La HEPT est aussi donnée par la relation $H = L/N$ où L est la longueur de la colonne et N le nombre de plateaux théoriques, inversement proportionnel à H . Etant donné que plus N est grand, meilleure est la séparation, il faut donc avoir H petit pour avoir une bonne séparation.

2 – Donner une formule permettant de calculer le facteur de résolution entre deux pics chromatographiques et l'appliquer au chromatogramme ci-après. A votre avis, les deux pics de ce chromatogramme sont-ils bien résolus ? Pourquoi ? **3 points**



Facteur de résolution : $R = 2 \cdot \frac{t_R^2 - t_R^1}{\omega_1 + \omega_2}$ avec ω = largeur du pic à 13,5% de sa hauteur

ou, plus facile à utiliser : $R = 1,18 \cdot \frac{t_R^2 - t_R^1}{\delta_1 + \delta_2}$ avec δ = largeur du pic à mi-hauteur.

NB : pour l'application au chromatogramme ci-avant, si la mesure des t_R est en min, il faut prendre δ en min également. Sinon, utiliser les cm pour δ et t_R . Dans la correction ci-après, les mesures sont en cm.

Sur le chromatogramme, cela donne : $R = 1,18 \frac{8,5 - 5,45}{1,6 + 1,9} = 1,03$

Les deux pics sont donc mal résolus puisque l'on considère que deux pics sont bien résolus si $R > 1,5$.

NB : cela se voit nettement sur le chromatogramme car il n'y a pas retour à la ligne de base entre les deux pics.

3 – Lorsqu'un composé est élué sur une colonne et génère un pic chromatographique parfaitement gaussien, comment peut-on déterminer le nombre de plateaux théoriques N correspondant à ce composé sur cette colonne ? **1 point**

$N = t_R^2 / \sigma^2$ avec t_R = temps de rétention, σ = demi-largeur à 60,6 % de la hauteur du pic (point d'inflexion).

4 – Expliquer en quoi consiste la méthode de l'étalon interne. **3 points**

- injection d'une solution contenant des quantités connues des composés à analyser et d'un étalon,
- détermination du coefficient de réponse relatif de chaque composé par rapport à l'étalon par intégration des aires de chaque pic chromatographique :

$$Q_{i/ét} = m_i/m_{ét} \times A_{ét} \cdot A_i,$$

- injection, dans les mêmes conditions, d'une solution de l'échantillon à quantifier contenant une masse connue d'étalon $m'_{ét}$ et intégration des aires obtenues A'_i et $A'_{ét}$. On a alors :

$$m'_i = m'_{ét} \times Q_{i/ét} \times A'_i/A'_{ét}$$

Rmq : il est préférable de préparer plusieurs gammes de concentrations de solutions étalons afin de réaliser une droite d'étalonnage de l'appareil. De plus, le résultat sera plus fiable si on moyenne les résultats sur plusieurs injections.

B – Chromatographies en phase gazeuse (CPG)

5 – Lors de l'utilisation d'un gaz vecteur de faible densité comme le dihydrogène (H_2), une vitesse moyenne élevée de phase mobile doit être utilisée afin d'obtenir une séparation satisfaisante. Expliquer pourquoi en utilisant l'équation de van Deemter. **3 points**

Lors de l'utilisation d'un gaz vecteur peu dense, il y aura peu de chocs entre les molécules de gaz vecteur et la substance à analyser (faible probabilité de rencontre des molécules). On peut donc considérer que cette substance sera difficilement "poussée" dans la colonne par le gaz et aura le temps de diffuser. Le coefficient de diffusion D_G sera donc grand, ce qui entraîne que dans l'équation de van Deemter, la valeur de B sera également grande tandis que celle de C sera petite. Par suite, le terme B/u l'emporte sur le terme $C \cdot u$ et l'équation de van Deemter devient en première approximation :

$$H \approx A + \frac{B}{u}$$

Pour avoir une efficacité maximum de la colonne (donc H le plus petit possible), il faudra utiliser une vitesse de gaz vecteur (u) élevée.

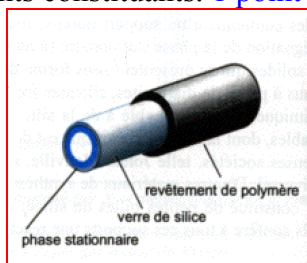
NB : Cela revient à augmenter la probabilité de chocs entre molécules du gaz vecteur et molécules du soluté par unité de temps.

6 – Qu'est-ce qu'une injection en mode *splitless* ? Quelle est la différence avec une injection en mode *split* ? **1 point**

Mode splitless : On utilisera cette méthode pour l'analyse d'échantillons très dilués (traces). La totalité de l'échantillon va se recondenser en tête de colonne, celle-ci étant maintenue à une température suffisamment basse pour que le solvant précède les composés dans la colonne (recondensation des composés en tête de colonne). Lorsque tout l'échantillon est parti dans la colonne (env. 1 min.), on ouvre la vanne pour éliminer les traces éventuelles qui parasiteraient les injections suivantes.

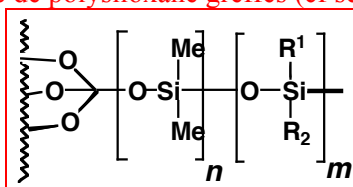
Mode split : Une fuite volontaire est créée en bas de l'injecteur par une vanne de façon que seule une petite partie (1/20e à 1/500e) de l'échantillon injecté ne passe dans la colonne.

7 – Dessiner la coupe transversale schématique d'une colonne 0,53 mm et en indiquer les différents constituants. 1 point



La colonne que vous avez utilisée en TP sur le GC-MS est une colonne Equity-5. Préciser la structure de la phase stationnaire contenue dans cette colonne. 1 point

Phase stationnaire à base de polysiloxane greffés (cf schéma) contenant 5% de Ph.



8 – Pour ne pas abîmer la phase stationnaire de la colonne, quelles sont les précautions à prendre vis-à-vis du gaz vecteur utilisé ? 2 points

Ce gaz doit être de pureté suffisante et en particulier être exempt de traces d'eau (risque d'hydrolyse de la phase stationnaire) et d'oxygène (dégradation de la phase stationnaire).

9 – Une analyse CPG est faite sur un appareil muni d'un détecteur FID. Est-il possible de déterminer les proportions relatives approchées de ces deux composés sans avoir à utiliser d'étalon? Justifier. 2 points

Sans étalonnage, il est possible de déterminer les proportions approchées de ces deux composés car le chromatographe utilisé est muni d'un détecteur à ionisation de flamme (FID), ce qui permet de calculer empiriquement la réponse de molécules organiques en termes de "nombre de carbones effectifs" et ainsi, d'obtenir une valeur approchée des coefficients de réponse relatifs des deux composés par rapport à un étalon.

C – Chromatographies Liquide Haute Performance (HPLC ou CLHP)

10 – D'après-vous, quels sont les avantages et inconvénients de l'HPLC par rapport à la CPG ? 2 points

Avantages :

- grande sensibilité du détecteur
- vaste domaine d'application :
 - => même les composés non volatils peuvent être élués
 - => travail à température proche de la température ambiante donc même les composés thermo-sensibles peuvent être analysés
- phase mobile liquide => meilleure solubilité des analytes donc moins de limitations

- possibilité de travailler avec un mélange de solvants comme phase mobile

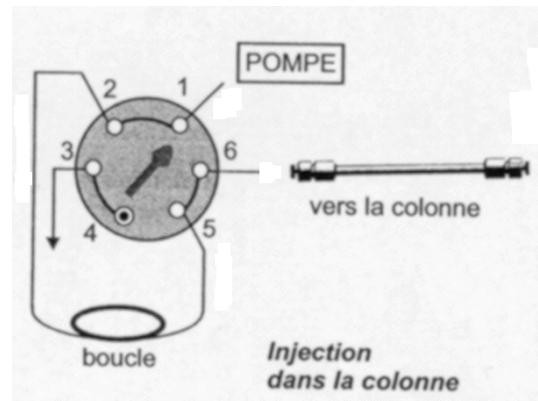
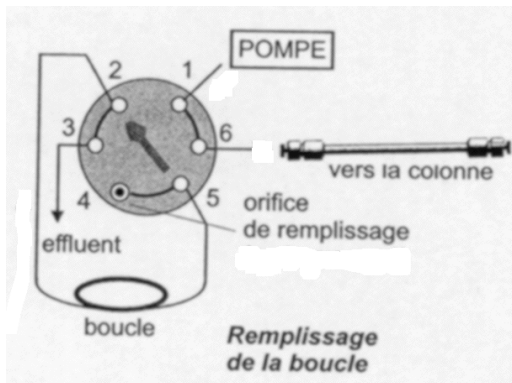
Inconvénients :

- coût (phase mobile = solvant)

NB : d'autres aspects peuvent avoir été évoqués, il ne s'agit dans cette correction que de quelques exemples.

11 – L'utilisation d'une vanne Rheodyne® est très courante parmi les méthodes d'injection possibles en HPLC.

- Expliquer son principe à l'aide des schémas ci-dessous. **1 point**
- Quelle condition doit alors remplir le volume prélevé à la seringue ? **1 point**



Principe : En position A, la colonne (port 6) est directement connectée à la pompe (port 1) et est donc alimentée en phase mobile. En parallèle, la solution à chromatographier est injectée en port 4 dans une boucle jusqu'à ce que celle-ci déborde (sortie par le port 3).

Pour l'injection, la manette est tournée de façon à connecter la boucle au circuit de phase mobile. Cette dernière va donc entraîner la solution présente dans la boucle vers la colonne.

Condition : le volume de solution prélevé à la seringue doit être supérieur au volume de la boucle de façon à la remplir totalement.

12 – Quels sont les deux grands types de phase stationnaire utilisés en HPLC ? Donner brièvement leurs caractéristiques générales. Préciser dans chaque cas le type de phase mobile à utiliser.

3 points

Il s'agit de la phase dite « normale » et de la phase dite « inverse ». L'HPLC en phase normale est l'utilisation d'une phase polaire, généralement un gel de silice qui possède en surface des groupes silanol (Si-OH). L'HPLC en phase inverse consiste à utiliser une phase apolaire constituée d'une silice sur laquelle est greffée une couche de molécules carbonées linéaires à longues chaînes (C₈ à C₁₈).

En HPLC sur phase normale, on utilise une phase mobile peu polaire alors qu'en HPLC sur phase inverse, on utilise une phase mobile polaire.

13 – Citer deux types de détecteurs utilisables en HPLC. **1 point**

Détecteur UV-Vis et réfractomètre.

14 – Lors de l'utilisation d'un mélange de solvants comme phase mobile, qu'appelle-t-on "mode isocratique" ? Par opposition, quel autre mode peut être utilisé et en quoi consiste-t'il ? Quel est son principal inconvénient ? **3 points**

Le mode isocratique consiste à utiliser une même composition de phase mobile tout au long de l'analyse. A l'inverse, on peut utiliser un mode gradients qui consiste à faire varier la composition de la phase mobile au cours de l'analyse. Le principal inconvénient de ce dernier mode est qu'avant de pouvoir recommencer une analyse, il faut purger le système (environ 10 fois le volume mort) pour revenir à l'état initial.

Session : 1

EPREUVE : Examen de Chromatographie

Durée : 1 h 30

Aucun document n'est autorisé - Les téléphones portables doivent être éteints et rangés.

On rappelle qu'en chromatographie, pour une phase mobile de vitesse moyenne \bar{u} , l'équation de van Deemter s'exprime par la relation simplifiée suivante :

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

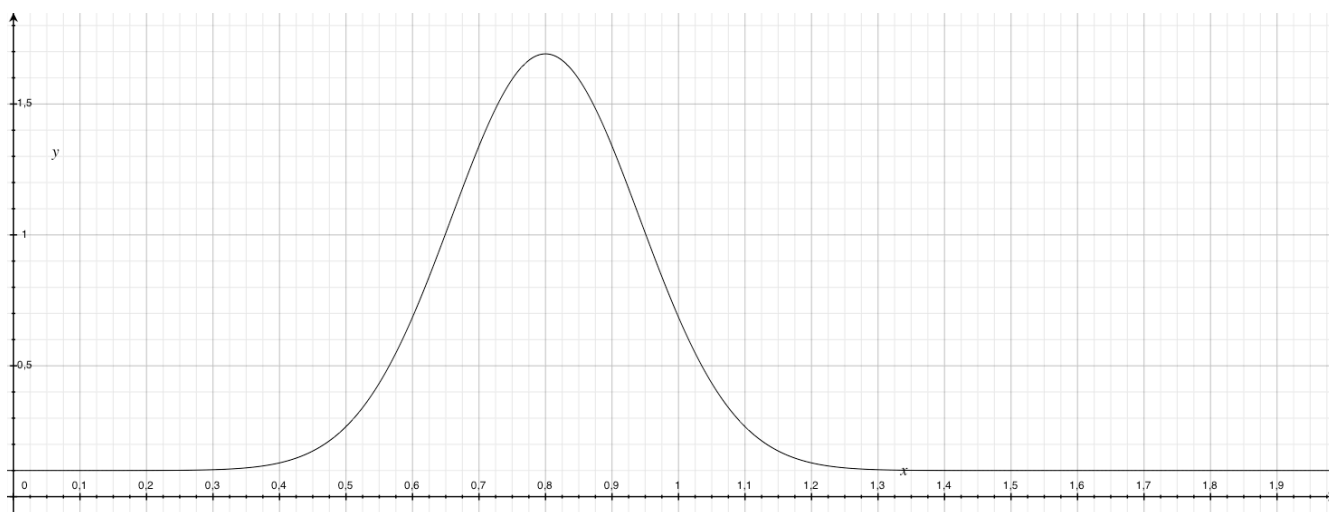
où B est proportionnel au coefficient de diffusion D_G du soluté dans la phase mobile, et C lui est inversement proportionnel.

A – Chromatographie – Généralités

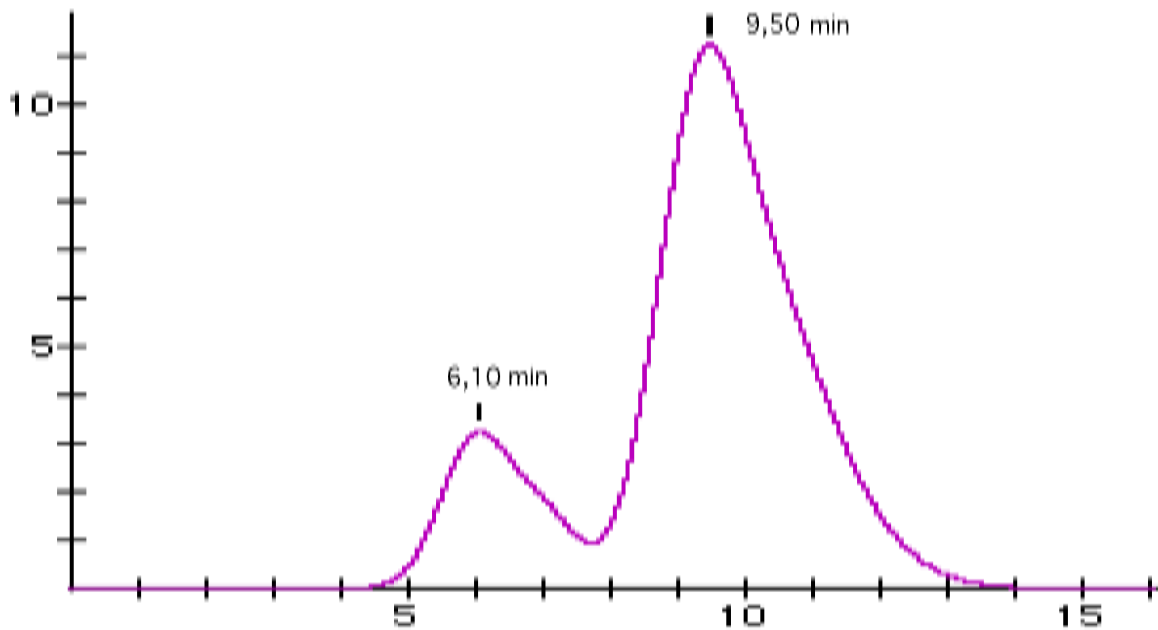
1 – Dans la théorie de van Deemter, comment appelle-t-on le paramètre H ? Pour avoir une bonne séparation chromatographique, vaut-il mieux avoir un H petit ou grand ? Pourquoi ?

2 – L'allure d'un pic chromatographique suit une courbe de Gauss. Ce pic est caractérisé par les quatre paramètres t_R , σ , δ et ω .

- Donner la signification de chacun de ces paramètres.
- Placer chacun d'entre-eux sur le pic ci-dessous en justifiant brièvement.



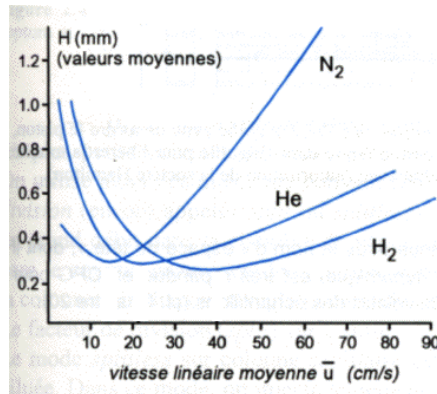
3 – Donner une formule permettant de calculer le facteur de résolution entre deux pics chromatographiques et l'appliquer au chromatogramme ci-après. A votre avis, les deux pics de ce chromatogramme sont-ils bien résolus ? Pourquoi ?



4 – Expliquer en quoi consiste la méthode de l'étalon interne.

B – Chromatographies en phase gazeuse (CPG)

5 – En CPG, trois gaz vecteurs sont principalement utilisés : N_2 , He et H_2 . En utilisant les courbes de van Deemter représentées ci-après, quel est d'après vous le gaz vecteur le plus performant ? Pourquoi ?



6 – Qu'est-ce qu'une injection en mode *splitless* ? Quelle est la différence avec une injection en mode *split* ?

7 – Citer un type de phase stationnaire utilisé classiquement en CPG et en donner la structure. Pourquoi peut-on qualifier ces phases stationnaires de "liquide supporté" ?

8 – Une analyse CPG est faite sur un appareil muni d'un détecteur FID. Est-il possible de déterminer les proportions relatives approchées de ces deux composés sans avoir à utiliser d'étalon ? Justifier brièvement.

C – Chromatographies Liquide Haute Performance (HPLC)

- 9** – D'après-vous, quels sont les avantages et inconvénients de l'HPLC par rapport à la CPG ?
- 10** – Sur une pompe HPLC, par couple de pistons montés en série, pourquoi l'un des deux est-il deux fois plus gros que le second ?
- 11** – Que sont l'HPLC en phase normale et en phase inverse ? Préciser dans chaque cas le type de phase mobile à utiliser.
- 12** – Citer deux types de détecteurs utilisables en HPLC.
- 13** – Lors de l'utilisation d'un mélange de solvants comme phase mobile, qu'appelle-t'on "*mode isocratique*" ? Par opposition, quel autre mode peut être utilisé et en quoi consiste t'il ? Quel est son principal inconvénient ?

Session : 1

EPREUVE : Examen de Chromatographie **Corrigé ; Note = total/30x20**

Durée : 1 h 30

Aucun document n'est autorisé - Les téléphones portables doivent être éteints et rangés.

On rappelle qu'en chromatographie, pour une phase mobile de vitesse moyenne \bar{u} , l'équation de van Deemter s'exprime par la relation simplifiée suivante :

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

où B est proportionnel au coefficient de diffusion D_G du soluté dans la phase mobile, et C lui est inversement proportionnel.

A – Chromatographie – Généralités

1 – Dans la théorie de van Deemter, comment appelle-t-on le paramètre H ? Pour avoir une bonne séparation chromatographique, vaut-il mieux avoir un H petit ou grand ? Pourquoi ? **2 points**

H est la Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique (HEPT).

La HEPT est aussi donnée par la relation $H = L/N$ où L est la longueur de la colonne et N le nombre de plateaux théoriques, inversement proportionnel à H . Etant donné que plus N est grand, meilleure est la séparation, il faut donc avoir H petit pour avoir une bonne séparation.

2 – L'allure d'un pic chromatographique suit une courbe de Gauss. Ce pic est caractérisé par les quatre paramètres t_R , σ , δ et ω . **4 points**

- Donner la signification de chacun de ces paramètres.

t_R : temps de rétention du composé

σ : demi-largeur au niveau des points d'inflexion (écart type de la gaussienne)

δ : largeur à mi-hauteur

- ω : largeur à la base du pic

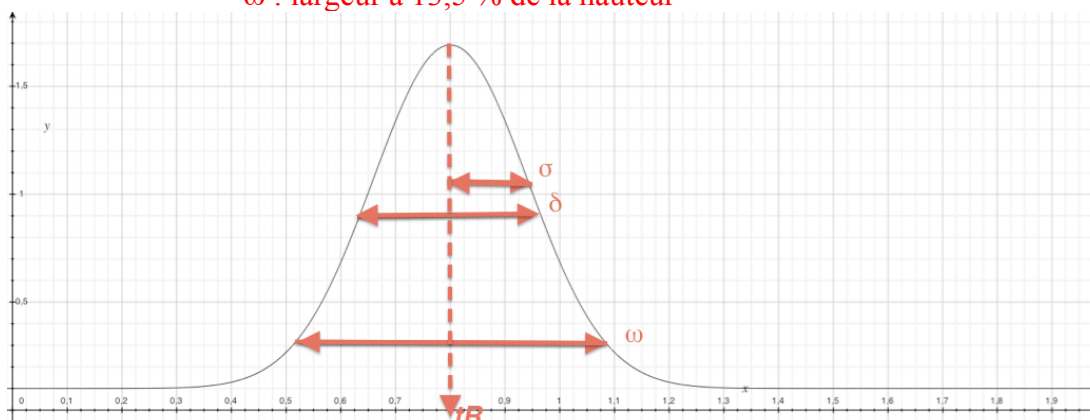
- Placer chacun d'entre-eux sur le pic ci-dessous en justifiant brièvement.

t_R : abscisse du sommet du pic

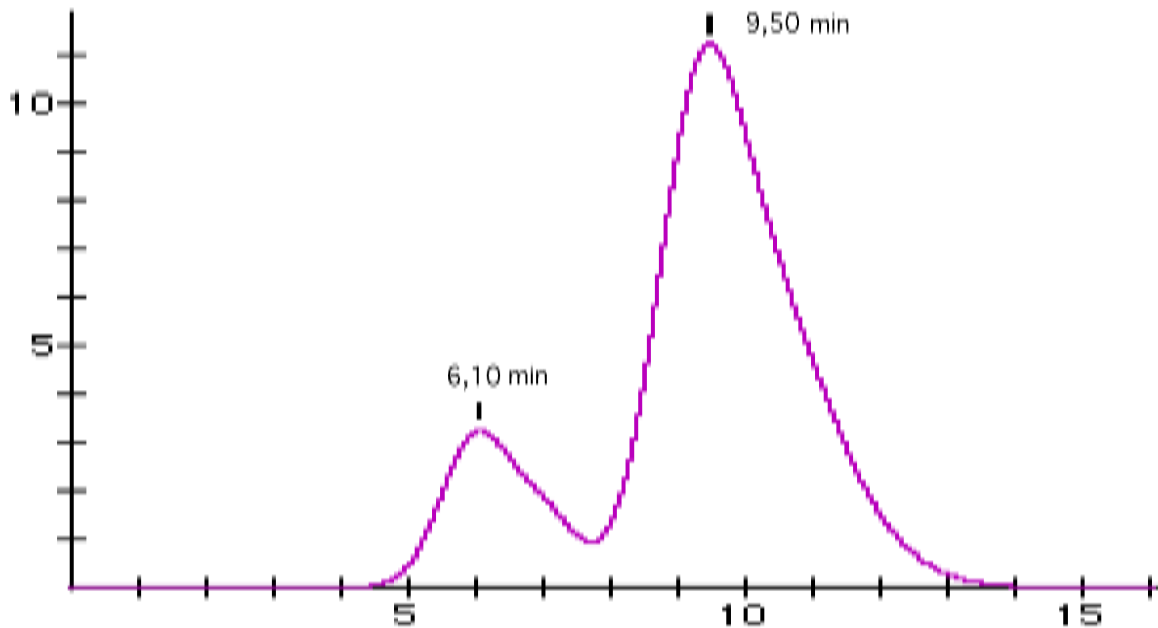
σ : demi-largeur à 60,6 % de la hauteur

δ : largeur à 50 % de la hauteur

ω : largeur à 13,5 % de la hauteur



3 – Donner une formule permettant de calculer le facteur de résolution entre deux pics chromatographiques et l'appliquer au chromatogramme ci-après. A votre avis, les deux pics de ce chromatogramme sont-ils bien résolus ? Pourquoi ? 4 points



Facteur de résolution : $R = 2 \cdot \frac{t_R^2 - t_R^1}{\omega_1 + \omega_2}$ avec ω = largeur du pic à 13,5% de sa hauteur

ou, plus facile à utiliser : $R = 1,18 \cdot \frac{t_R^2 - t_R^1}{\delta_1 + \delta_2}$ avec δ = largeur du pic à mi-hauteur.

NB : pour l'application au chromatogramme ci-avant, si la mesure des t_R est en min, il faut prendre δ en min également. Sinon, utiliser les cm pour δ et t_R . Dans la correction ci-après, les mesures sont en cm.

Sur le chromatogramme, cela donne : $R = 1,18 \frac{8,5 - 5,45}{1,6 + 1,9} = 1,03$

Les deux pics sont donc mal résolus puisque l'on considère que deux pics sont bien résolus si $R > 1,5$.

NB : cela se voit nettement sur le chromatogramme car il n'y a pas retour à la ligne de base entre les deux pics.

4 – Expliquer en quoi consiste la méthode de l'étalon interne. 2 points

- injection d'une solution contenant des quantités connues des composés à analyser et d'un étalon,
 - détermination du coefficient de réponse relatif de chaque composé par rapport à l'étalon par intégration des aires de chaque pic chromatographique :

$$Q_{i/ét} = m_i/m_{ét} \times A_{ét}/A_i,$$

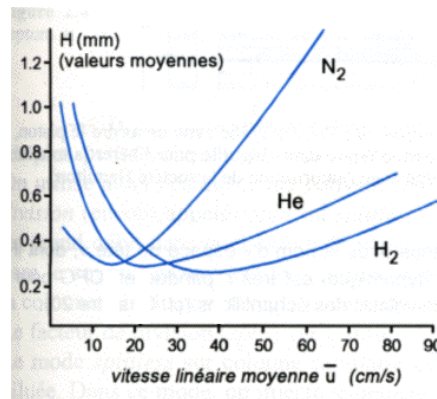
- injection, dans les mêmes conditions, d'une solution de l'échantillon à quantifier contenant une masse connue d'étalon $m'_{ét}$ et intégration des aires obtenues A'_i et $A'_{ét}$. On a alors :

$$m'_i = m'_{ét} \times Q_{i/ét} \times A'_i/A'_{ét}$$

Rmq : il est préférable de préparer plusieurs gammes de concentrations de solutions étalons afin de réaliser une droite d'étalonnage de l'appareil. De plus, le résultat sera plus fiable si on moyenne les résultats sur plusieurs injections.

B – Chromatographies en phase gazeuse (CPG)

5 – En CPG, trois gaz vecteurs sont principalement utilisés : N₂, He et H₂. En utilisant les courbes de van Deemter représentées ci-après, quel est d'après vous le gaz vecteur le plus performant ? Pourquoi ? 2 points



Le gaz vecteur le plus performant est H₂. Sa HEPT a une valeur plus faible que celle des deux autres gaz, elle correspond à une vitesse de gaz plus élevée d'où une plus grande rapidité d'analyse et la pente de la courbe remonte moins fortement après la HEPT donc il y a plus de latitude pour jouer sur le débit sans trop pénaliser la séparation.

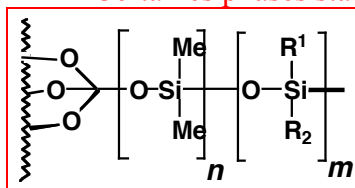
6 – Qu'est-ce qu'une injection en mode *splitless* ? Quelle est la différence avec une injection en mode *split* ? 2 points

Mode *splitless* : On utilisera cette méthode pour l'analyse d'échantillons très dilués (traces). La totalité de l'échantillon va se recondenser en tête de colonne, celle-ci étant maintenue à une température suffisamment basse pour que le solvant précède les composés dans la colonne (recondensation des composés en tête de colonne). Lorsque tout l'échantillon est parti dans la colonne (env. 1 min.), on ouvre la vanne pour éliminer les traces éventuelles qui parasiteraient les injections suivantes.

Mode *split* : Une fuite volontaire est créée en bas de l'injecteur par une vanne de façon que seule une petite partie (1/20e à 1/500e) de l'échantillon injecté ne passe dans la colonne.

7 – Citer un type de phase stationnaire utilisé classiquement en CPG et en donner la structure. Pourquoi peut-on qualifier ces phases stationnaires de "liquide supporté" ? 2 points

Certaines phases stationnaires sont à base de polysiloxanes greffés.



* si R¹, R² = Me :

colonnes de type OV-1 ou SPB-1

* si R¹ = Me, R² = Ph :

colonnes de type DB-5, HP-5

(cf. colonne GC-MS TP)

* autres : R¹, R² = (CH₂)₃-CN, C₂H₄-CF₃, ...

La combinaison des différents groupes R¹ et R² en diverses proportions permet de moduler la polarité et les caractéristiques de la colonne (ex. : T° d'utilisation, ...).

Ces phases sont qualifiées de "liquide supporté" car elles sont constituées de très longues chaînes greffées en une de leur extrémité sur le colonne. La longueur de ces chaînes permet une grande fluxionalité et, par conséquent, un comportement proche de celui d'un liquide.

8 – Une analyse CPG est faite sur un appareil muni d'un détecteur FID. Est-il possible de déterminer les proportions relatives approchées de ces deux composés sans avoir à utiliser d'étalon ? Justifier brièvement. 2 points

Sans étalonnage, il est possible de déterminer les proportions approchées de ces deux composés car le chromatographe utilisé est muni d'un détecteur à ionisation de flamme (FID), ce qui permet de

calculer empiriquement la réponse de molécules organiques en termes de "nombre de carbones effectifs" et ainsi, d'obtenir une valeur approchée des coefficients de réponse relatifs des deux composés par rapport à un étalon.

C – Chromatographies Liquide Haute Performance (HPLC)

9 – D'après-vous, quels sont les avantages et inconvénients de l'HPLC par rapport à la CPG ? 2 points

Avantages :

- grande sensibilité du détecteur
- vaste domaine d'application :
 - => même les composés non volatils peuvent être élués
 - => travail à température proche de la température ambiante donc même les composés thermo-sensibles peuvent être analysés
- phase mobile liquide => meilleure solubilité des analytes donc moins de limitations
- possibilité de travailler avec un mélange de solvants comme phase mobile

Inconvénients :

- coût (phase mobile = solvant)

NB : d'autres aspects peuvent avoir été évoqués, il ne s'agit dans cette correction que de quelques exemples.

10 – Sur une pompe HPLC, par couple de pistons montés en série, pourquoi l'un des deux est-il deux fois plus gros que le second ? 2 points

Lorsque le piston le plus gros se vide, une partie de la phase mobile qu'il contient est utilisée pour remplir le piston de plus petit volume pendant que l'autre partie est envoyée vers la colonne. De cette façon, il n'y a pas interruption du débit dans la colonne.

11 – Que sont l'HPLC en phase normale et en phase inverse ? Préciser dans chaque cas le type de phase mobile à utiliser. 2 points

L'HPLC en phase normale est l'utilisation d'une phase polaire. L'HPLC en phase inverse consiste à utiliser une phase apolaire.

En HPLC sur phase normale, on utilise une phase mobile peu polaire alors qu'en HPLC sur phase inverse, on utilise une phase mobile polaire.

12 – Citer deux types de détecteurs utilisables en HPLC. 2 points

Détecteur UV-Vis et réfractomètre.

13 – Lors de l'utilisation d'un mélange de solvants comme phase mobile, qu'appelle-t'on "mode isocratique" ? Par opposition, quel autre mode peut être utilisé et en quoi consiste t'il ? Quel est son principal inconvénient ? 2 points

Le mode isocratique consiste à utiliser une même composition de phase mobile tout au long de l'analyse. A l'inverse, on peut utiliser un mode gradients qui consiste à faire varier la composition de la phase mobile au cours de l'analyse. Le principal inconvénient de ce dernier mode est qu'avant de pouvoir recommencer une analyse, il faut purger le système (environ 10 fois le volume mort) pour revenir à l'état initial.

Session : 1

EPREUVE : **Examen de Chromatographie**

Durée : 1 h 30

Aucun document n'est autorisé - Les téléphones portables doivent être éteints et rangés.

On rappelle qu'en chromatographie, pour une phase mobile de vitesse moyenne \bar{u} , l'équation de van Deemter s'exprime par la relation simplifiée suivante :

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

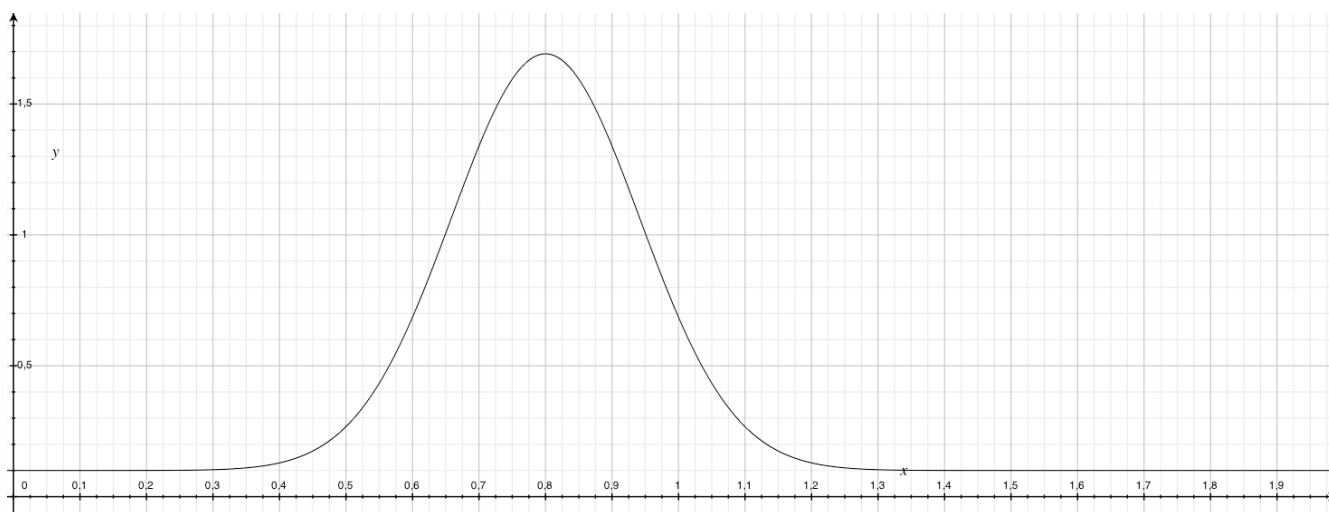
où B est proportionnel au coefficient de diffusion D_G du soluté dans la phase mobile, et C lui est inversement proportionnel.

A – Chromatographie – Généralités

1 – Dans la théorie de van Deemter, comment appelle-t-on le paramètre H ? Pour avoir une bonne séparation chromatographique, vaut-il mieux avoir un H petit ou grand ? Pourquoi ?

2 – Lorsqu'il est considéré comme étant parfaitement gaussien, un pic chromatographique est caractérisé par les quatre paramètres t_R , σ , δ et ω .

- Donner le nom de chacun de ces paramètres.
- Placer chacun d'entre-eux sur le pic ci-dessous en justifiant ce placement.



3 – Lorsqu'un composé est élué sur une colonne et génère un pic chromatographique parfaitement gaussien comme ci-dessus, quelle formule permet de déterminer le nombre de plateaux théoriques N correspondant à ce composé sur cette colonne ?

4 – Lorsqu'il est introduit dans une colonne, un composé se répartit en m_M , masse de composé dans la phase mobile, et m_S , masse de composé dans la phase stationnaire.

- Donner la formule reliant le facteur de rétention k à m_M et m_S .

- Comment peut-on, sur un chromatogramme, calculer ce facteur de rétention k du composé sur cette colonne ? Justifier votre réponse.

- De quoi k est-il révélateur ? En règle générale, préfère-t-on avoir une valeur de k élevée ou faible ? Pourquoi ?

5 – Un utilisateur inexpérimenté a injecté une quantité trop importante de composé dans un chromatographe. Quelle seront les allures de l'isotherme de partage et du pic obtenus ? Justifier en quelques lignes en expliquant de façon qualitative ce qui se passe alors dans la colonne.

6 – Donner une formule permettant de calculer le facteur de résolution entre deux pics chromatographiques consécutifs. A quelle condition peut-on dire que ces deux pics sont bien résolus.

7 – Expliquer en quoi consiste la méthode de l'étalon interne.

B – Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

8 – Qu'est-ce qu'une injection en mode *split* ? Quelle est la différence avec une injection en mode *splitless* ?

9 – Une analyse CPG est faite sur un appareil muni d'un détecteur FID. Est-il possible de déterminer les proportions relatives approchées de ces deux composés sans avoir à utiliser d'étalon ? Justifier brièvement.

10 – Lors de l'utilisation d'un gaz vecteur de faible densité comme le dihydrogène (H_2), une vitesse moyenne élevée de phase mobile doit être utilisée afin d'obtenir une séparation satisfaisante. Expliquer pourquoi en utilisant l'équation de van Deemter.

C – Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

11 – Sur une pompe HPLC, par couple de pistons montés en série, pourquoi l'un des deux est-il deux fois plus gros que le second ?

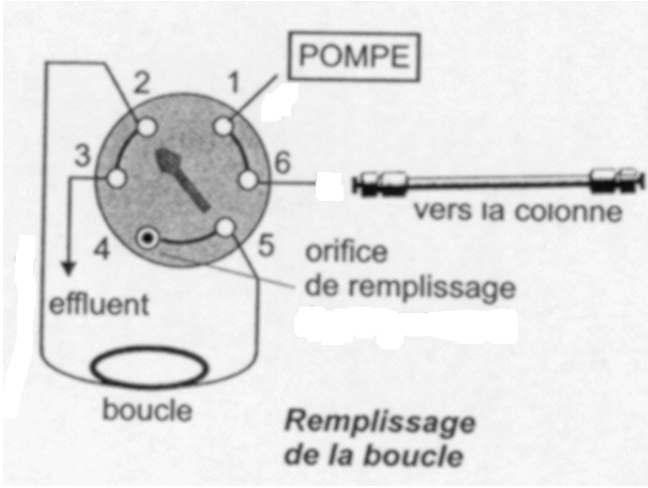
12 – Que sont l'HPLC en phase normale et en phase inverse ? Préciser dans chaque cas le type de phase mobile à utiliser.

13 – Citer deux types de détecteurs utilisables en HPLC.

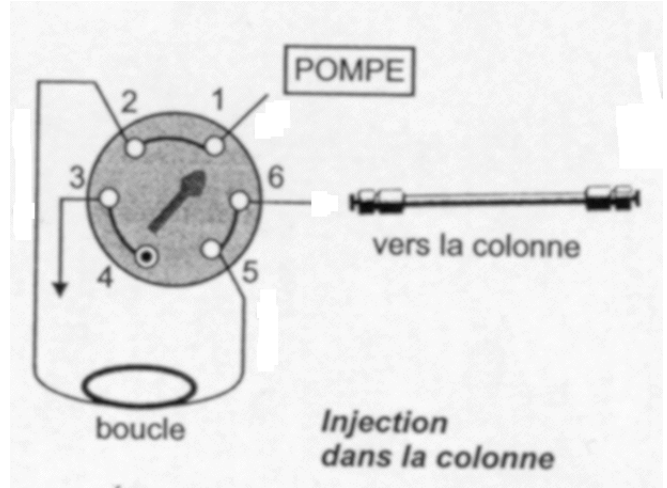
14 – Lors de l'utilisation d'un mélange de solvants comme phase mobile, qu'appelle-t-on "*mode isocratique*" ? Par opposition, quel autre mode peut être utilisé et en quoi consiste-t'il ? Quel est son principal inconvénient ?

15 – L'utilisation d'une vanne Rheodyne® est très courante parmi les méthodes d'injection possibles en HPLC.

- Expliquer son principe à l'aide des schémas ci-dessous.
- Quelle condition doit alors remplir le volume prélevé à la seringue ?



A



B

Session : 1

Corrigé EPREUVE : Examen de Chromatographie

Durée : 1 h 30

Aucun document n'est autorisé - Les téléphones portables doivent être éteints et rangés.

On rappelle qu'en chromatographie, pour une phase mobile de vitesse moyenne \bar{u} , l'équation de van Deemter s'exprime par la relation simplifiée suivante :

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

où B est proportionnel au coefficient de diffusion D_G du soluté dans la phase mobile, et C lui est inversement proportionnel.

A – Chromatographie – Généralités

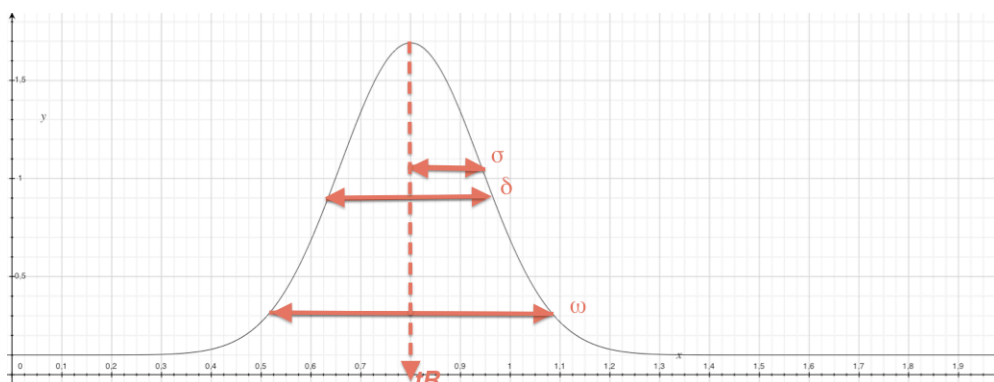
1 – Dans la théorie de van Deemter, comment appelle-t-on le paramètre H ? Pour avoir une bonne séparation chromatographique, vaut-il mieux avoir un H petit ou grand ? Pourquoi ? **2 points**

H est la Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique (HEPT).

La HEPT est aussi donnée par la relation $H = L/N$ où L est la longueur de la colonne et N le nombre de plateaux théoriques, inversement proportionnel à H . Etant donné que plus N est grand, meilleure est la séparation, il faut donc avoir H petit pour avoir une bonne séparation.

2 – Lorsqu'il est considéré comme étant parfaitement gaussien, un pic chromatographique est caractérisé par les quatre paramètres t_R , σ , δ et ω . **6 points**

- Donner le nom de chacun de ces paramètres.
 t_R : temps de rétention du composé
 σ : demi-largeur au niveau des points d'inflexion (écart type de la gaussienne)
 δ : largeur à mi-hauteur
 ω : largeur à la base du pic
- Placer chacun d'entre-eux sur le pic ci-dessous en justifiant ce placement.
- t_R : abscisse du sommet du pic
- σ : demi-largeur à 60,6 % de la hauteur
- δ : largeur à 50 % de la hauteur
- ω : largeur à 13,5 % de la hauteur



3 – Lorsqu'un composé est élué sur une colonne et génère un pic chromatographique parfaitement gaussien comme ci-dessus, quelle formule permet de déterminer le nombre de plateaux théoriques N correspondant à ce composé sur cette colonne ? 1 point

$N = t_R^2 / \sigma^2$ avec t_R = temps de rétention, σ = demi-largeur à 60,6 % de la hauteur du pic (point d'inflexion).

4 – Lorsqu'il est introduit dans une colonne, un composé se répartit en m_M , masse de composé dans la phase mobile, et m_S , masse de composé dans la phase stationnaire.

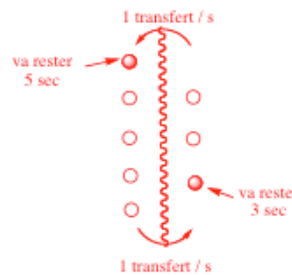
- Donner la formule reliant le facteur de rétention k à m_M et m_S . 1 point

$$k = m_S/m_M$$

- Comment peut-on, sur un chromatogramme, calculer ce facteur de rétention k du composé sur cette colonne ? Justifier votre réponse. 3 points

$k = t'_R / t_M$. En effet, le temps passé par chaque molécule dans chaque phase est proportionnel au nombre de ces molécules, donc à la masse de composé, dans chaque phase. Donc étant donné que $k = m_S/m_M$, nous avons également la relation $k=t'_S/t_M$. En négligeant les temps morts de l'injecteur et du détecteur, t_S peut être assimilé à t'_R donc $k=t'_R/t_M$, mesurable sur le chromatogramme.

Illustration de la proportionalité masse / durée de séjour :



- De quoi k est-il révélateur ? En règle générale, préfère-t-on avoir une valeur de k élevée ou faible ? Pourquoi ? 2 point

k est révélateur du comportement de la colonne vis-à-vis du composé. On préfère avoir une valeur de k faible pour ne pas rallonger la durée de l'analyse

5 – Un utilisateur inexpérimenté a injecté une quantité trop importante de composé dans un chromatographe. Quelles seront les allures de l'isotherme de partage et du pic obtenus ? Justifier en quelques lignes en expliquant de façon qualitative ce qui se passe alors dans la colonne. 2 points

Lors de l'injection d'une trop grande quantité de soluté dans une colonne, la phase stationnaire se retrouve saturée et, en 1^{ère} approximation, on peut considérer qu'une grande partie de l'échantillon reste dans la phase mobile. L'isotherme de partage n'est alors plus linéaire, mais est courbe (convexe) avec une augmentation de C_M non proportionnelle à C_S . On peut alors concevoir que la fraction de l'échantillon présente dans la phase mobile sortira très vite, conduisant à une montée abrupte du pic, tandis que le reste, ralenti par la phase stationnaire, génèrera une traînée ("Tailing").

6 – Donner une formule permettant de calculer le facteur de résolution entre deux pics chromatographiques consécutifs. A quelle condition peut-on dire que ces deux pics sont bien résolus.

2 points

Facteur de résolution : $R = 2 \cdot \frac{t_R^2 - t_R^1}{\omega_1 + \omega_2}$ avec ω = largeur du pic à 13,5% de sa hauteur

ou, plus facile à utiliser : $R = 1,18 \cdot \frac{t_R^2 - t_R^1}{\delta_1 + \delta_2}$ avec δ = largeur du pic à mi-hauteur.

On considère que deux pics sont bien résolus si $R > 1,5$.

7 – Expliquer en quoi consiste la méthode de l'étalon interne. 3 points

- injection d'une solution contenant des quantités connues des composés à analyser et d'un étalon,
- détermination du coefficient de réponse relatif de chaque composé par rapport à l'étalon par intégration des aires de chaque pic chromatographique :

$$Q_{i/ét} = m_i/m_{ét} \times A_{ét}/A_i,$$

- injection, dans les mêmes conditions, d'une solution de l'échantillon à quantifier contenant une masse connue d'étalon $m'_{ét}$ et intégration des aires obtenues A'_i et $A'_{ét}$. On a alors :

$$m'_i = m'_{ét} \times Q_{i/ét} \times A'_i/A'_{ét}$$

Rmq : il est préférable de préparer plusieurs gammes de concentrations de solutions étalons afin de réaliser une droite d'étalonnage de l'appareil. De plus, le résultat sera plus fiable si on moyenne les résultats sur plusieurs injections.

B – Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

8 – Qu'est-ce qu'une injection en mode *split* ? Quelle est la différence avec une injection en mode *splitless* ? 1 point

Mode split : Une fuite volontaire est créée en bas de l'injecteur par une vanne de façon que seule une petite partie (1/20e à 1/500e) de l'échantillon injecté ne passe dans la colonne.

Mode splitless : On utilisera cette méthode pour l'analyse d'échantillons très dilués (traces). La totalité de l'échantillon va se recondenser en tête de colonne, celle-ci étant maintenue à une température suffisamment basse pour que le solvant précède les composés dans la colonne (recondensation des composés en tête de colonne). Lorsque tout l'échantillon est parti dans la colonne (env. 1 min.), on ouvre la vanne pour éliminer les traces éventuelles qui parasiteraient les injections suivantes.

9 – Une analyse CPG est faite sur un appareil muni d'un détecteur FID. Est-il possible de déterminer les proportions relatives approchées de ces deux composés sans avoir à utiliser d'étalon ? Justifier brièvement. 2 points

Sans étalonnage, il est possible de déterminer les proportions approchées de ces deux composés car le chromatographe utilisé est muni d'un détecteur à ionisation de flamme (FID), ce qui permet de calculer empiriquement la réponse de molécules organiques en termes de "nombre de carbones effectifs" et ainsi, d'obtenir une valeur approchée des coefficients de réponse relatifs des deux composés par rapport à un étalon.

10 – Lors de l'utilisation d'un gaz vecteur de faible densité comme le dihydrogène (H_2), une vitesse moyenne élevée de phase mobile doit être utilisée afin d'obtenir une séparation satisfaisante. Expliquer pourquoi en utilisant l'équation de van Deemter. 3 points

Lors de l'utilisation d'un gaz vecteur peu dense, il y aura peu de chocs entre les molécules de gaz vecteur et la substance à analyser (faible probabilité de rencontre des molécules). On peut donc considérer que cette substance sera difficilement "poussée" dans la colonne par le gaz et aura le temps de diffuser. Le coefficient de diffusion D_G sera donc grand, ce qui entraîne que dans l'équation de van Deemter, la valeur de B sera également grande tandis que celle de C sera petite. Par suite, le terme B/u l'emporte sur le terme C et l'équation de van Deemter devient en première approximation :

$$H \approx A + \frac{B}{u}$$

Pour avoir une efficacité maximum de la colonne (donc H le plus petit possible), il faudra utiliser une vitesse de gaz vecteur (u) élevée.

NB : Cela revient à augmenter la probabilité de chocs entre molécules du gaz vecteur et molécules du soluté par unité de temps.

C – Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

11 – Sur une pompe HPLC, par couple de pistons montés en série, pourquoi l'un des deux est-il deux fois plus gros que le second ? **2 points**

Lorsque le piston le plus gros se vide, une partie de la phase mobile qu'il contient est utilisée pour remplir le piston de plus petit volume pendant que l'autre partie est envoyée vers la colonne. De cette façon, il n'y a pas interruption du débit dans la colonne.

12 – Que sont l'HPLC en phase normale et en phase inverse ? Préciser dans chaque cas le type de phase mobile à utiliser. **2 points**

L'HPLC en phase normale est l'utilisation d'une phase polaire. L'HPLC en phase inverse consiste à utiliser une phase apolaire.

En HPLC sur phase normale, on utilise une phase mobile peu polaire alors qu'en HPLC sur phase inverse, on utilise une phase mobile polaire.

13 – Citer deux types de détecteurs utilisables en HPLC. **2 points**

Détecteur UV-Vis et réfractomètre.

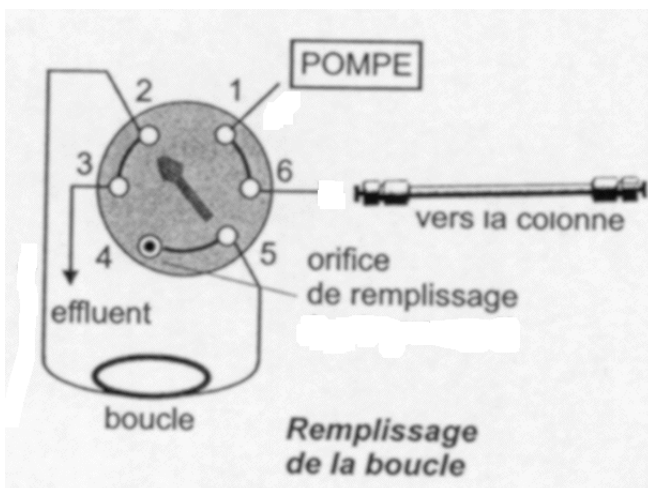
14 – Lors de l'utilisation d'un mélange de solvants comme phase mobile, qu'appelle-t-on "mode isocratique" ? Par opposition, quel autre mode peut être utilisé et en quoi consiste-t'il ? Quel est son principal inconvénient ? **3 points**

Le mode isocratique consiste à utiliser une même composition de phase mobile tout au long de l'analyse. A l'inverse, on peut utiliser un mode gradients qui consiste à faire varier la composition de la phase mobile au cours de l'analyse. Le principal inconvénient de ce dernier mode est qu'avant de pouvoir recommencer une analyse, il faut purger le système (environ 10 fois le volume mort) pour revenir à l'état initial.

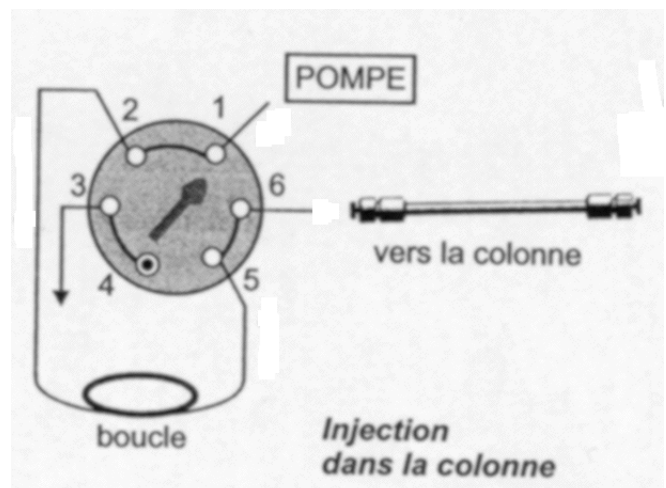
15 – L'utilisation d'une vanne Rheodyne® est très courante parmi les méthodes d'injection possibles en HPLC.

- Expliquer son principe à l'aide des schémas ci-dessous. **2 points**

- Quelle condition doit alors remplir le volume prélevé à la seringue ? **1 point**



A



B

Principe : En position A, la colonne (port 6) est directement connectée à la pompe (port 1) et est donc alimentée en phase mobile. En parallèle, la solution à chromatographier est injectée en port 4 dans une boucle jusqu'à ce que celle-ci déborde (sortie par le port 3).

Pour l'injection, la manette est tournée de façon à connecter la boucle au circuit de phase mobile. Cette dernière va donc entraîner la solution présente dans la boucle vers la colonne.

Condition : le volume de solution prélevé à la seringue doit être supérieur au volume de la boucle de façon à la remplir totalement.

Session : 1

EPREUVE : **Examen de Chromatographie**

Durée : 1 h

Aucun document n'est autorisé - Les téléphones portables doivent être éteints et rangés.

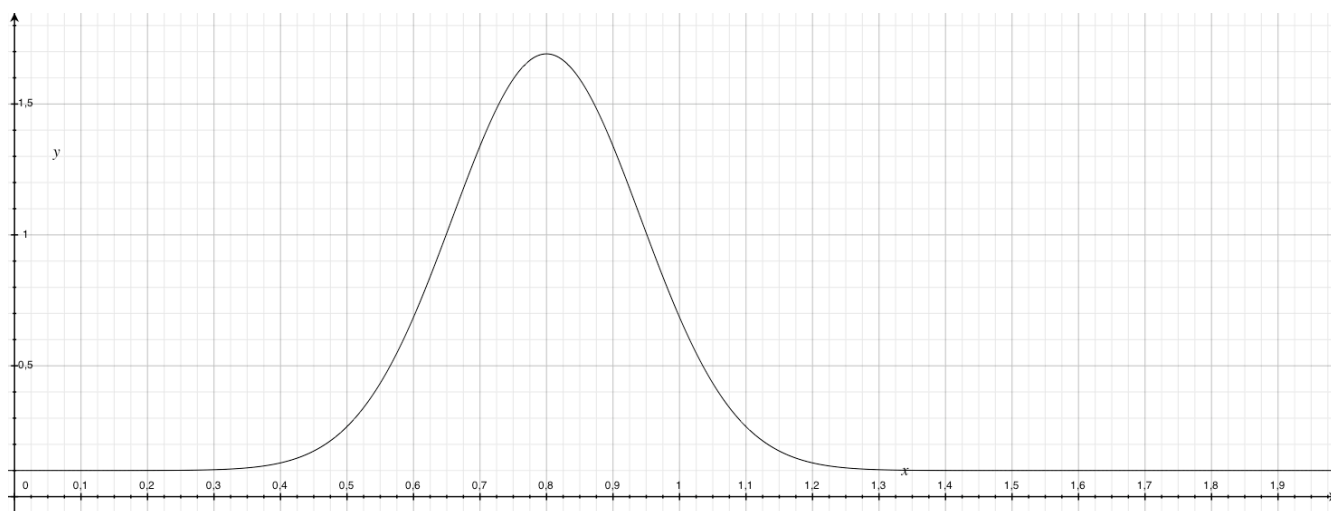
On rappelle qu'en chromatographie, pour une phase mobile de vitesse moyenne \bar{u} , l'équation de van Deemter s'exprime par la relation simplifiée suivante :

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

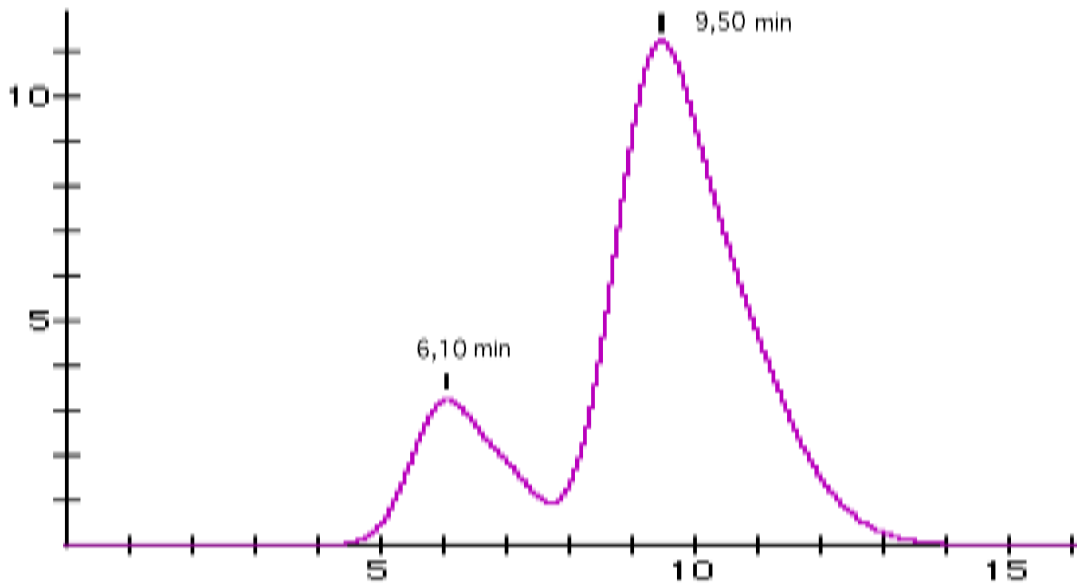
où B est proportionnel au coefficient de diffusion D_G du soluté dans la phase mobile, et C lui est inversement proportionnel.

A – Chromatographie – Généralités

- 1 – Dans la théorie de van Deemter, comment appelle-t-on le paramètre H ? Pour avoir une bonne séparation chromatographique, vaut-il mieux avoir un H petit ou grand ? Pourquoi ?
- 2 – La quasi-totalité des techniques chromatographiques fait appel à un coefficient de partage « K ». Définir ce qu'est ce coefficient de partage et donner son expression.
- 3 – L'allure d'un pic chromatographique suit une courbe de Gauss. Ce pic est caractérisé par les quatre paramètres t_R , σ , δ et ω .
 - Donner la signification de chacun de ces paramètres.
 - Placer chacun d'entre-eux sur le pic ci-dessous en justifiant brièvement.



- 4 – - Donner une formule permettant de calculer le facteur de résolution entre deux pics chromatographiques et l'appliquer au chromatogramme ci-après.
- D'après ce calcul, les pics de ce chromatogramme sont-ils bien résolus ? Pourquoi ?
 - L'observation visuelle de ce chromatogramme, sans faire le calcul, permettait-elle d'anticiper le résultat ?



5 – Si on introduit une quantité trop importante de composé dans une colonne chromatographique, quelle sera l'allure du pic obtenu ? Justifier en quelques lignes en expliquant de façon qualitative ce qui se passe alors dans la colonne.

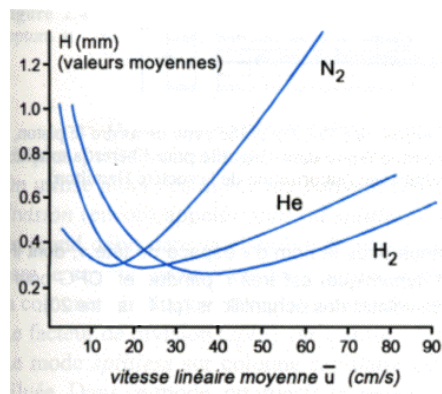
6 – Expliquer en quoi consiste la méthode de l'étalon interne.

B – Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

7 – Qu'est-ce qu'une injection en mode *split* ? Quelle est la différence avec une injection en mode *splitless* ? Dans quel(s) cas utilise-t-on l'un ou l'autre de ces modes ?

8 – Dessiner la coupe transversale schématique d'une colonne capillaire 0,25 mm et en indiquer les différents constituants.

9 – En CPG, trois gaz vecteurs sont principalement utilisés : N₂, He et H₂. En utilisant les courbes de van Deemter représentées ci-après, quel est d'après vous le gaz vecteur le plus performant ? Pourquoi ?



10 – Pour ne pas abîmer la phase stationnaire de la colonne, quelles sont les précautions à prendre vis-à-vis du gaz vecteur utilisé ?

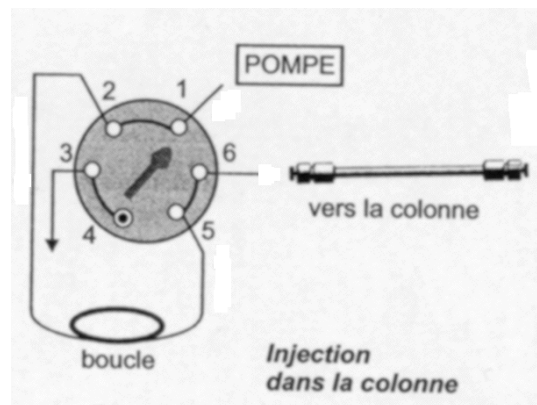
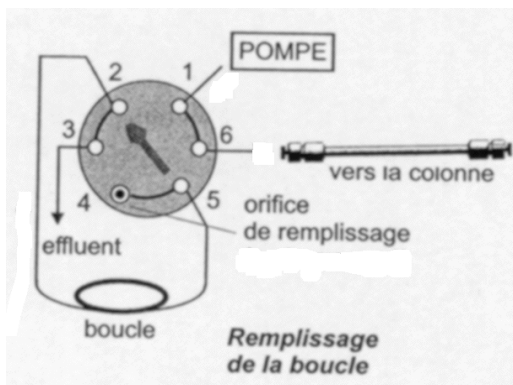
11 – Citer deux types de détecteurs utilisables en CPG.

C – Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

12 – Que sont l'HPLC en phase normale et en phase inverse ? Préciser dans chaque cas le type de phase mobile à utiliser.

13 – L'utilisation d'une vanne Rheodyne® est très courante parmi les méthodes d'injection possibles en HPLC.

- Expliquer son principe à l'aide des schémas ci-dessous.
- Quelle condition doit alors remplir le volume prélevé à la seringue ?



14 – Lors de l'utilisation d'un mélange de solvants comme phase mobile, qu'appelle-t'on « mode gradient » ? Par opposition, quel autre mode peut être utilisé et en quoi consiste-t'il ?

Session : 1

EPREUVE : Examen de Chromatographie **Corrigé**

Durée : 1 h

Aucun document n'est autorisé - Les téléphones portables doivent être éteints et rangés.

On rappelle qu'en chromatographie, pour une phase mobile de vitesse moyenne \bar{u} , l'équation de van Deemter s'exprime par la relation simplifiée suivante :

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

où B est proportionnel au coefficient de diffusion D_G du soluté dans la phase mobile, et C lui est inversement proportionnel.

A – Chromatographie – Généralités

1 – Dans la théorie de van Deemter, comment appelle-t-on le paramètre H ? Pour avoir une bonne séparation chromatographique, vaut-il mieux avoir un H petit ou grand ? Pourquoi ? **2 points**

H est la Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique (HEPT).

La HEPT est aussi donnée par la relation $H = L/N$ où L est la longueur de la colonne et N le nombre de plateaux théoriques, inversement proportionnel à H . Etant donné que plus N est grand, meilleure est la séparation, il faut donc avoir H petit pour avoir une bonne séparation.

2 – La quasi-totalité des techniques chromatographiques fait appel à un coefficient de partage « K ». Définir ce qu'est ce coefficient de partage et donner son expression. **2 points**

Il s'agit du coefficient de partage du soluté entre la phase stationnaire et la phase mobile. Il régit l'équilibre de répartition de ce soluté dans ces deux phases. Il est défini par $K = C_s/C_m$ où C_s est la concentration de soluté dans la phase stationnaire et C_m la concentration de soluté dans la phase mobile à l'équilibre.

NB : K n'est valable qu'à une température donnée.

3 – L'allure d'un pic chromatographique suit une courbe de Gauss. Ce pic est caractérisé par les quatre paramètres t_R , σ , δ et ω .

- Donner la signification de chacun de ces paramètres. **2 points**

t_R : temps de rétention du composé

σ : demi-largeur au niveau des points d'inflexion (écart type de la gaussienne)

δ : largeur à mi-hauteur

ω : largeur à la base du pic

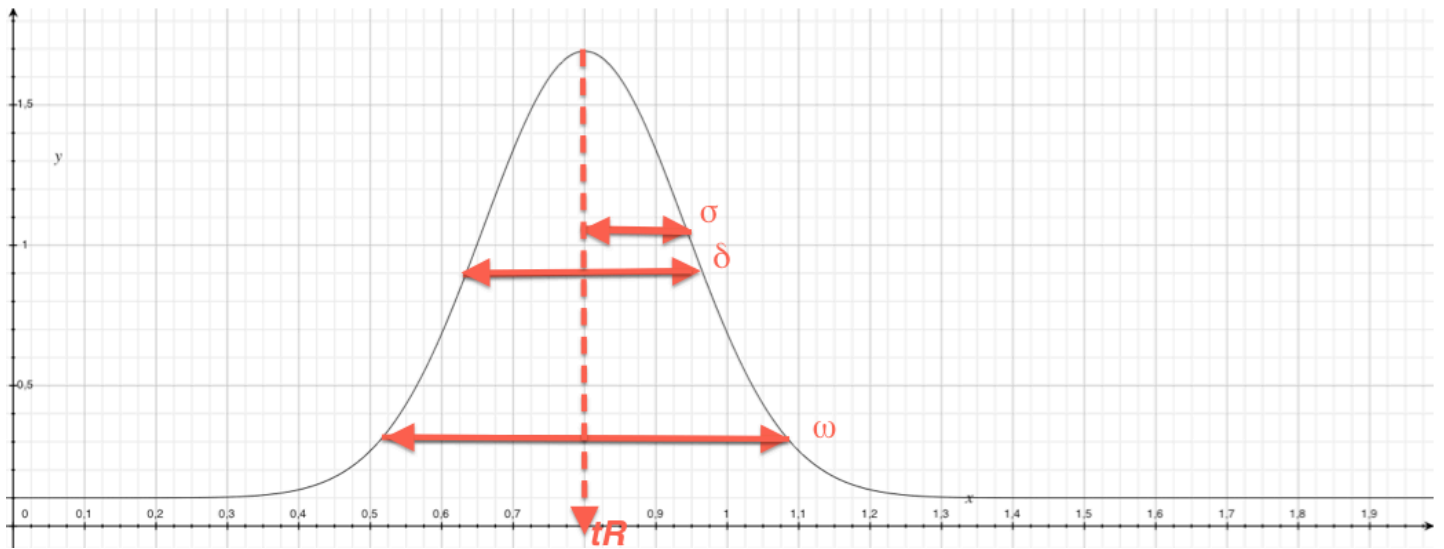
- Placer chacun d'entre-eux sur le pic ci-dessous en justifiant brièvement. **2 points**

t_R : abscisse du sommet du pic

σ : demi-largeur à 60,6 % de la hauteur

δ : largeur à 50 % de la hauteur

ω : largeur à 13,5 % de la hauteur



4 – - Donner une formule permettant de calculer le facteur de résolution entre deux pics chromatographiques et l'appliquer au chromatogramme ci-après. 2 points

Facteur de résolution : $R = 2 \frac{t_R^2 - t_R^1}{\omega_1 + \omega_2}$ avec ω = largeur du pic à 13,5% de sa hauteur

ou, plus facile à utiliser : $R = 1,18 \frac{t_R^2 - t_R^1}{\delta_1 + \delta_2}$ avec δ = largeur du pic à mi-hauteur.

NB : pour l'application au chromatogramme ci-après, si la mesure des t_R est en min, il faut prendre δ en min également. Sinon, utiliser les cm pour δ et t_R . Dans la correction ci-après, les mesures sont en cm.

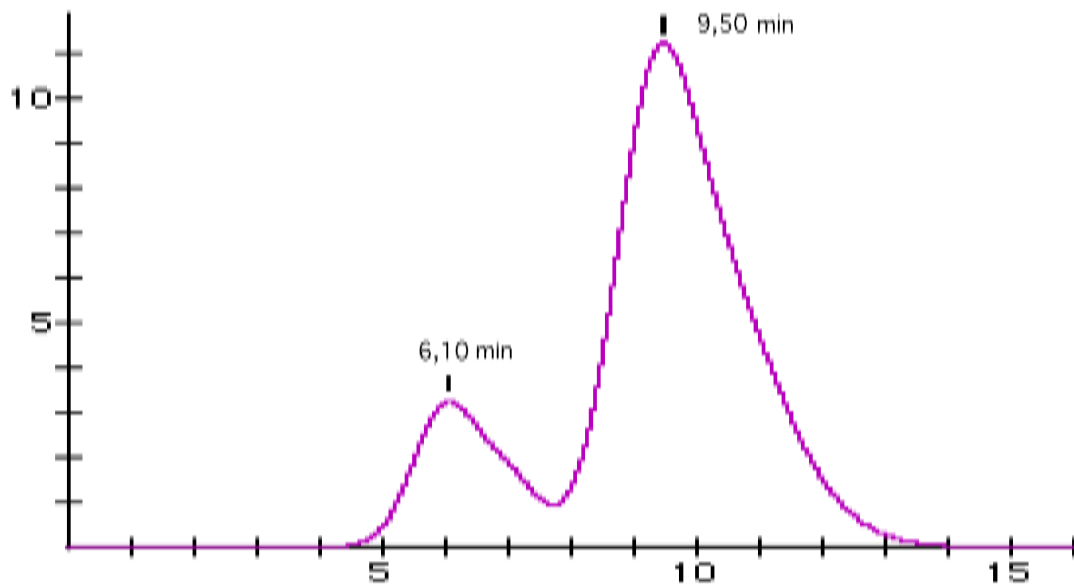
Sur le chromatogramme, cela donne : $R = 1,18 \frac{7,85 - 5,00}{1,40 + 1,75} = 1,07$

- D'après ce calcul, les pics de ce chromatogramme sont-ils bien résolus ? Pourquoi ? 1 point

Les deux pics sont donc mal résolus puisque l'on considère que deux pics sont bien résolus si $R > 1,5$.

- L'observation visuelle de ce chromatogramme, sans faire le calcul, permettait-elle d'anticiper le résultat ? 1 point

La mauvaise résolution des deux pics se voit nettement sur le chromatogramme car il n'y a pas retour à la ligne de base entre les deux pics.



5 – Si on introduit une quantité trop importante de composé dans une colonne chromatographique, quelle sera l'allure du pic obtenu ? Justifier en quelques lignes en expliquant de façon qualitative ce qui se passe alors dans la colonne. **4 points**

Lors de l'injection d'une trop grande quantité de soluté dans une colonne, la phase stationnaire se retrouve saturée et, en 1^{ère} approximation, on peut considérer qu'une grande partie de l'échantillon reste dans la phase mobile. On peut alors concevoir que la fraction de l'échantillon présente dans la phase mobile sortira très vite, conduisant à une montée abrupte du pic, tandis que le reste, ralenti par la phase stationnaire, génèrera une traînée ("Tailing").

6 – Expliquer en quoi consiste la méthode de l'étalon interne. **4 points**

- injection d'une solution contenant des quantités connues des composés à analyser et d'un étalon,
 - détermination du coefficient de réponse relatif de chaque composé par rapport à l'étalon par intégration des aires de chaque pic chromatographique :

$$Q_{i/ét} = m_i/m_{ét} \times A_{ét}.A_i,$$

- injection, dans les mêmes conditions, d'une solution de l'échantillon à quantifier contenant une masse connue d'étalon $m'_{ét}$ et intégration des aires obtenues A'_i et $A'_{ét}$. On a alors :

$$m'_i = m'_{ét} \times Q_{i/ét} \times A'_i/A'_{ét}$$

Rmq : il est préférable de préparer plusieurs gammes de concentrations de solutions étalons afin de réaliser une droite d'étalonnage de l'appareil. De plus, le résultat sera plus fiable si on moyenne les résultats sur plusieurs injections.

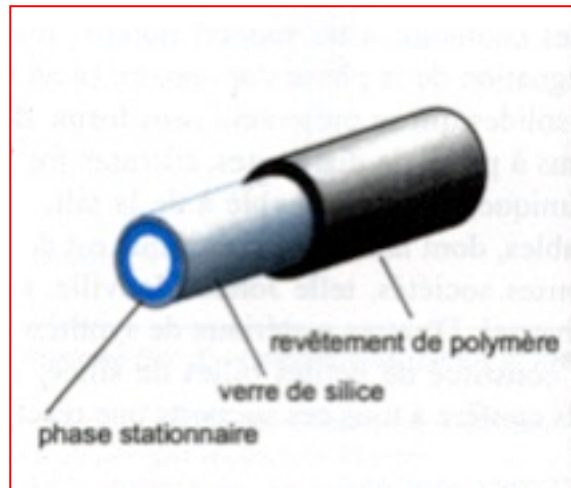
B – Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

7 – Qu'est-ce qu'une injection en mode *split* ? Quelle est la différence avec une injection en mode *splitless* ? Dans quel(s) cas utilise t'on l'un ou l'autre de ces modes ? **2 points**

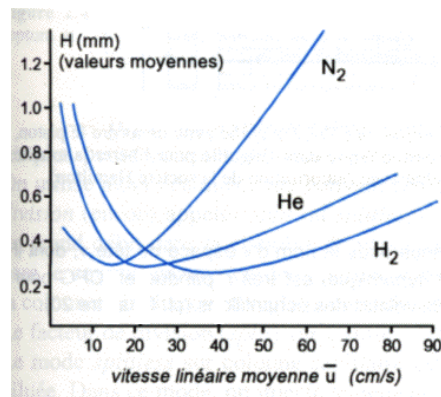
Mode split : Une fuite volontaire est créée en bas de l'injecteur par une vanne de façon que seule une petite partie (1/20e à 1/500e) de l'échantillon injecté ne passe dans la colonne. On utilise cette méthode pour des échantillons concentrés.

Mode splitless : On utilisera cette méthode pour l'analyse d'échantillons très dilués (traces). La totalité de l'échantillon va se recondenser en tête de colonne, celle-ci étant maintenue à une température suffisamment basse pour que le solvant précède les composés dans la colonne (recondensation des composés en tête de colonne). Lorsque tout l'échantillon est parti dans la colonne (env. 1 min.), on ouvre la vanne pour éliminer les traces éventuelles qui parasiteraient les injections suivantes.

8 – Dessiner la coupe transversale schématique d'une colonne capillaire 0,25 mm et en indiquer les différents constituants. 2 points



9 – En CPG, trois gaz vecteurs sont principalement utilisés : N_2 , He et H_2 . En utilisant les courbes de van Deemter représentées ci-après, quel est d'après vous le gaz vecteur le plus performant ? Pourquoi ? 2 points



Le gaz vecteur le plus performant est H_2 . Sa HEPT a une valeur plus faible que celle des deux autres gaz (meilleure efficacité) et correspond à une vitesse de gaz plus élevée d'où une plus grande rapidité d'analyse. De plus, la pente de la courbe remonte moins fortement après la HEPT donc il y a plus de latitude pour jouer sur le débit sans trop pénaliser la séparation.

10 – Pour ne pas abîmer la phase stationnaire de la colonne, quelles sont les précautions à prendre vis-à-vis du gaz vecteur utilisé ? 2 points

Ce gaz doit être de pureté suffisante et en particulier être exempt de traces d'eau (risque d'hydrolyse de la phase stationnaire) et d'oxygène (dégradation de la phase stationnaire).

11 – Citer deux types de détecteurs utilisables en CPG. 2 points

Détecteur à ionisation de flamme (FID), détecteur thermoionique (NPD), détecteur à capture d'électrons (ECD), détecteur à conductibilité thermique (TCD), détecteur de masse (MS)...

C – Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

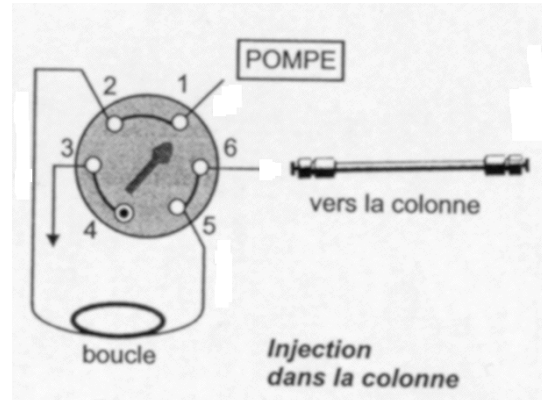
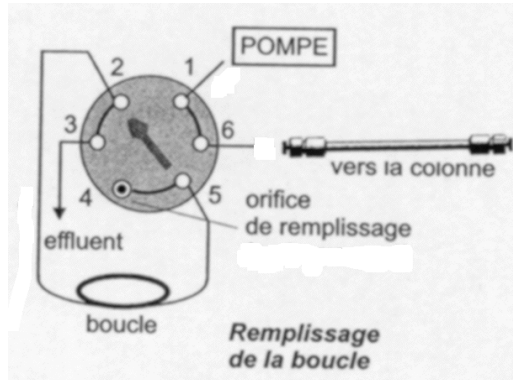
12 – Que sont l'HPLC en phase normale et en phase inverse ? Préciser dans chaque cas le type de phase mobile à utiliser. 4 points

L'HPLC en phase normale est l'utilisation d'une phase polaire. L'HPLC en phase inverse consiste à utiliser une phase apolaire.

En HPLC sur phase normale, on utilise une phase mobile peu polaire alors qu'en HPLC sur phase inverse, on utilise une phase mobile polaire.

13 – L'utilisation d'une vanne Rheodyne® est très courante parmi les méthodes d'injection possibles en HPLC.

- Expliquer son principe à l'aide des schémas ci-dessous. 3 points
- Quelle condition doit alors remplir le volume prélevé à la seringue ? 1 point



Principe : En position A, la colonne (port 6) est directement connectée à la pompe (port 1) et est donc alimentée en phase mobile. En parallèle, la solution à chromatographier est injectée en port 4 dans une boucle jusqu'à ce que celle-ci déborde (sortie par le port 3).

Pour l'injection, la manette est tournée de façon à connecter la boucle au circuit de phase mobile. Cette dernière va donc entraîner la solution présente dans la boucle vers la colonne.

Condition : le volume de solution prélevé à la seringue doit être supérieur au volume de la boucle de façon à la remplir totalement.

14 – Lors de l'utilisation d'un mélange de solvants comme phase mobile, qu'appelle-t-on « mode gradient » ? Par opposition, quel autre mode peut être utilisé et en quoi consiste t'il ? 2 points

Le mode gradients consiste à faire varier la composition de la phase mobile au cours de l'analyse.

Le mode isocratique, autre mode utilisable, consiste à employer une même composition de phase mobile tout au long de l'analyse.