

**TOUT EN
FICHES**

L'ESSENTIEL DE

**TECHNIQUES
INSTRUMENTALES
D'ANALYSE
CHIMIQUE**

**TOUT EN
FICHES**

Annick Rouessac

Maître de conférences
honoraire à l'IUT du Mans

Francis Rouessac

Professeur honoraire à l'IUT
du Mans

L'ESSENTIEL DE

**TECHNIQUES
INSTRUMENTALES
D'ANALYSE
CHIMIQUE**

BTS, LICENCE, BUT

DUNOD

Direction artistique : Nicolas Wiel

Illustrations de couverture : New Africa © Shutterstock

<p>Le pictogramme qui figure ci-contre mérite une explication. Son objet est d'alerter le lecteur sur la menace que représente pour l'avenir de l'écrit, particulièrement dans le domaine de l'édition technique et universitaire, le développement massif du photocopillage.</p> <p>Le Code de la propriété intellectuelle du 1^{er} juillet 1992 interdit en effet expressément la photocopie à usage collectif sans autorisation des ayants droit. Or, cette pratique s'est généralisée dans les établissements</p>	<p>d'enseignement supérieur, provoquant une baisse brutale des achats de livres et de revues, au point que la possibilité même pour les auteurs de créer des œuvres nouvelles et de les faire éditer correctement est aujourd'hui menacée.</p> <p>Nous rappelons donc que toute reproduction, partielle ou totale, de la présente publication est interdite sans autorisation de l'auteur, de son éditeur ou du Centre français d'exploitation du droit de copie (CFC, 20, rue des Grands-Augustins, 75006 Paris).</p>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------



© Dunod, 2011, 2021
11, rue Paul Bert 92240 Malakoff
www.dunod.com
ISBN 978-2-10-082588-2

Le Code de la propriété intellectuelle n'autorisant, aux termes de l'article L. 122-5, 2° et 3° a), d'une part, que les « copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective » et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, « toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause est illicite » (art. L. 122-4).

Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles L. 335-2 et suivants du Code de la propriété intellectuelle.

Table des matières

Avant-propos	VI
Fiche 1 Chromatographie – <i>Généralités</i>	1
Fiche 2 Chromatographie en phase liquide (CLHP)	10
Fiche 3 Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	21
Fiche 4 Chromatographie d'exclusion stérique	32
Fiche 5 Chromatographie – <i>Analyse quantitative</i>	41
Fiche 6 Chromatographie planaire	48
Fiche 7 Chromatographie par échange d'ions	55
Fiche 8 Électrophorèse capillaire	62
Fiche 9 Spectrométrie de l'UV-Visible et du Très Proche Infrarouge	72
Fiche 10 Analyses dans l'UV-Visible – <i>Méthodes colorimétriques</i>	82
Fiche 11 Spectroscopie infrarouge	90
Fiche 12 Infrarouge – <i>Applications qualitatives</i>	96
Fiche 13 Infrarouge quantitatif	104
Fiche 14 Spectroscopie de fluorescence	111
Fiche 15 Fluorescence X	120
Fiche 16 Spectrométrie d'absorption atomique	130
Fiche 17 Spectrométrie d'émission atomique	139
Fiche 18 Photométrie de flamme	147
Fiche 19 Spectrométrie de masse – <i>Généralités</i>	154
Fiche 20 Spectrométrie de masse – <i>Analyseurs</i>	163
Fiche 21 Spectrométrie de masse – <i>Applications</i>	171
Fiche 22 Résonance magnétique nucléaire	177
Fiche 23 Résonance magnétique nucléaire – <i>Applications</i>	185
Fiche 24 Les radioisotopes en analyse	192
Fiche 25 Ionométrie	201
Fiche 26 Analyseurs spécifiques	208
Quelques constantes physico-chimiques	216
Index	217

Avant-propos

Ce manuel a pour objectif de présenter un ensemble de connaissances de base sur les méthodes les plus souvent rencontrées en analyse chimique, qualitative, quantitative et structurale, dans des secteurs aussi variés que constituent les industries chimiques, pharmaceutiques, agroalimentaires, ainsi que pour répondre à des questions touchant à l'environnement ou aux réglementations diverses.

Pour en faire une sorte de panorama représentatif, à défaut d'être exhaustif, les auteurs ont développé 26 fiches indépendantes d'une dizaine de pages chacune, correspondant à une méthode importante de l'analyse chimique. Chaque fiche associe, après quelques lignes sur l'objectif de la technique décrite, un résumé des points essentiels agrémenté de figures, d'exemples et d'exercices d'application, suivis de leurs corrections détaillées.

Cet ouvrage s'adresse à un large éventail d'étudiants qu'ils soient engagés dans des licences de Sciences ou Professionnelles ou de Santé ainsi qu'à ceux des Classes Préparatoires ou des IUT (Départements chimie, mesures physiques, biologie appliquée...) ou bien encore dans des formations de BTS. Ce livre sera également utile aux participants de cycles de formation continue, aux formations du CNAM et aux agents de maîtrise de l'industrie, confrontés aux problèmes d'analyse dans des secteurs qui en étaient restés à l'écart et qui souhaitent une mise à niveau de leurs connaissances.

Ce livre constitue un complément de l'ouvrage des auteurs sur *l'Analyse chimique, Méthodes et techniques instrumentales*, publié chez le même éditeur.

Annick Rouessac
Francis Rouessac

Le Mans, avril 2021

La chromatographie désigne une méthode physico-chimique séparative très utilisée en analyse chimique pour identifier et quantifier des espèces moléculaires ou ioniques présentes, même à l'état de traces, dans toutes sortes d'échantillons. Le principe repose sur les différences d'affinité des composés du mélange quand ils sont mis en présence de deux phases non miscibles. L'une est immobile (dite phase stationnaire) alors que la seconde, dite phase mobile, se déplace au contact de la première, entraînant les composés du mélange analysé et provoquant leur séparation si les vitesses sont différentes. Ce procédé hydrodynamique en perpétuel perfectionnement a reçu de très nombreuses applications.

1. Principe de la séparation

Le principe de la chromatographie consiste à entraîner l'échantillon à l'aide d'un éluant (gazeux ou liquide) appelé ici phase mobile (PM), qui se déplace au contact d'une seconde phase fixée sur un support (colonne ou surface plane). Celle-ci, dite stationnaire (PS), est insoluble dans la première. Si les différents composés de l'échantillon (les solutés) présentent des affinités différentes pour le couple PM/PS, ils vont être plus ou moins ralentis dans leur progression par la phase stationnaire. Sous l'effet antagoniste des forces de rétention soluté/PS et des forces d'entraînement soluté/PM, ces composés vont pouvoir être recueillis séparément à l'issue de cette migration (chacun en solution dans la PM utilisée).

Chaque composé est caractérisé par son coefficient de distribution de Nernst K (appelé également coefficient de partition) défini comme suit :

$$K = \frac{C_s}{C_M} = \frac{\text{concentration du soluté dans la phase stationnaire}}{\text{concentration du soluté dans la phase mobile}}$$

Ce paramètre quantifie le rapport de concentration de chaque composé entre les deux phases en présence. Plus sa valeur est élevée, plus le soluté est retenu. K dépend de la température et de trois forces d'interaction : PS/soluté, PM/soluté et PM/PS.

2. Le chromatogramme

Tous les instruments, appelés chromatographes, comportent une colonne renfermant la phase stationnaire ainsi qu'un détecteur situé en aval pour repérer les changements de composition de la phase mobile au cours de son élution.

À chaque séparation correspond un enregistrement appelé **chromatogramme**. Le passage de chaque composé au niveau du détecteur se traduit par un pic sur cet enregistrement. Sur la figure 1.1, la courbe de gauche correspond à une image isochrone de la concentration d'un composé en cours de migration sur la colonne et la courbe de droite au chromatogramme correspondant, lorsque le composé a traversé la colonne puis le détecteur. Cette courbe est tracée en fonction du temps (t_R représente le temps de rétention du composé).

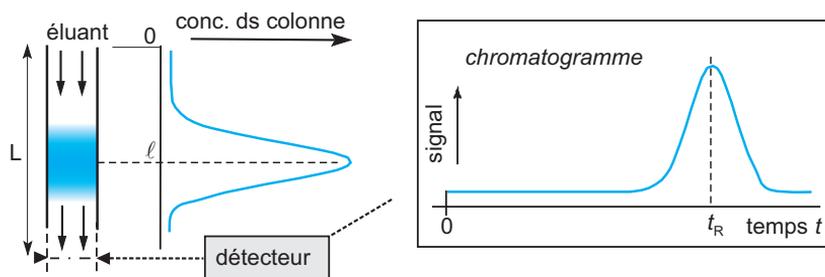


Figure 1.1

Les chromatographes actuels permettent de contrôler de manière très précise tous les paramètres pouvant influencer sur la migration (température, débits, composition des phases mobile et stationnaire). On atteint ainsi une parfaite reproductibilité des temps de migration pour un soluté donné au cours d'analyses successives même s'il est présent dans des échantillons différents. De ce fait, la chromatographie est devenue en soi une méthode d'analyse en se basant uniquement sur la **mesure des temps de migration des composés** pour les identifier.

MÉTHODE

L'identification d'un composé se fait par comparaison de son temps de rétention avec celui d'un composé authentique étudié dans les mêmes conditions.

Cette méthode comporte néanmoins une part aléatoire, l'identification à partir du seul chromatogramme n'étant pas absolue. Aussi, la pratique actuelle consiste à choisir un détecteur permettant de recueillir des informations complémentaires

sur le composé élué. On regagne ainsi, outre le temps de rétention, des informations indépendantes (données spectrales caractéristiques par exemple) qui vont permettre de déterminer avec certitude la nature et la composition de mélanges complexes, à partir de quantités qui, souvent, ne dépassent pas quelques nanogrammes (analyses de confirmation).

3. Pics d'élution parfaits

Un pic d'élution idéal a le même aspect que la représentation graphique de la courbe de Gauss. En chromatographie, δ désigne la largeur à mi-hauteur ($\delta = 2,35 \sigma$) et σ^2 la variance du pic. La largeur dite « à la base » du pic, ω , est mesurée à 13,5 % de la hauteur, point où, la courbe étant gaussienne, on a $\omega = 4\sigma$ par définition (figure 1.2). L'aire ainsi délimitée correspond à 95,4 % de l'aire du pic.

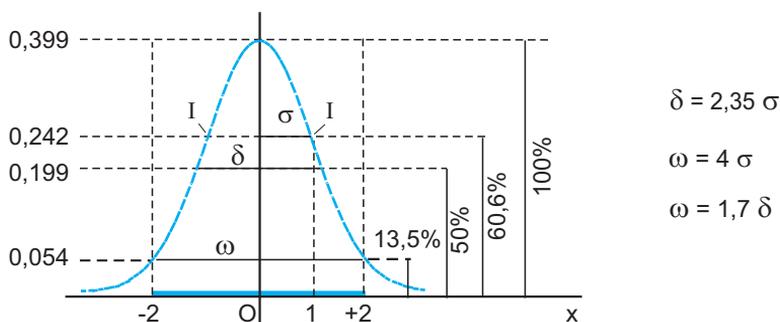


Figure 1.2

EXERCICE 1 Le pic Gaussien

La fonction « densité de probabilité » $y = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \cdot \exp\left[-\frac{x^2}{2}\right]$ permet de modéliser un pic d'élution parfait ; retrouver les valeurs numériques reportées sur la figure 1.2.

Solution

Si $x = 0$, on trouve $y = 0,399$. σ est calculé à l'ordonnée du point d'inflexion.

Pour $x = +$ ou -1 , $y = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \cdot \exp\left[-\frac{1}{2}\right] = 0,242$. Pour $x = 2$, on trouvera $y = 0,054$.

δ , largeur du pic à mi-hauteur, correspond donc à $y = 0,1995$. On doit donc trouver x dans l'expression $0,1995 = 0,399 \times \exp\left[-\frac{x^2}{2}\right]$ ce qui donne $x = 1,177$. Par suite $\delta = 2 \times 1,177 \cong 2,35$

4. Les principaux paramètres

Pour définir chaque composé et comparer les performances des colonnes ou des séparations, on utilise divers paramètres en plus des temps de rétention t_R :

- **efficacité** N : correspond au **nombre de plateaux théoriques** de la colonne en rappel du modèle de la théorie des plateaux. Il s'agit d'un paramètre relatif qui dépend du composé et des conditions opératoires

$$N = 16 \frac{t_R^2}{\omega^2} = 5,54 \frac{t_R^2}{\delta^2} ;$$

- la **hauteur équivalente à un plateau théorique** H (ou HEPT) : pour une colonne de longueur L , elle vaut $H = L / N$;
- **volume d'éluion** (ou de rétention) V_R : désigne le volume de phase mobile nécessaire pour faire migrer le soluté choisi d'une extrémité à l'autre de la colonne ;
- **volume mort** V_M : correspond au volume de phase mobile dans la colonne (volume interstitiel accessible aux composés chromatographiés) ;
- **volume de phase stationnaire** V_S : volume occupé, dans la colonne, par la phase stationnaire ;
- **rapport de phase** β : rapport entre le volume mort de la colonne et le volume de phase stationnaire. Caractéristique essentielle de toute colonne

$$\beta = \frac{V_M}{V_S} ;$$

- **facteur de rétention** (ou de **capacité**) k : correspond au rapport de la quantité fixée (m_S) sur la phase stationnaire et de celle restée dans la phase mobile (m_M). Ce paramètre rend compte de la capacité plus ou moins grande de la colonne à retenir un soluté. Il correspond également au rapport des temps passés dans ces deux phases, t_S (pour PS) et t_M (pour PM) :

$$k = \frac{m_S}{m_M} = \frac{t_S}{t_M}$$

sachant que globalement $t_S = t_R - t_M$ (encore appelé « temps réduit »)

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \text{ ou encore } t_R = t_M(1 + k);$$

- **sélectivité** α : correspond au rapport des facteurs de rétention k . Précise l'aptitude de la colonne à séparer deux composés. α est toujours > 1

$$\alpha = \frac{k_{(2)}}{k_{(1)}} = \frac{t_{R(2)} - t_M}{t_{R(1)} - t_M};$$

- **facteur de résolution** R : traduit la plus ou moins bonne séparation entre deux composés. On peut y accéder à partir du chromatogramme

$$R = 2 \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{\omega_1 + \omega_2}$$

EXERCICE 2 Application

À partir du chromatogramme de la figure 1.3, calculer pour les composés **1** et **2** à l'origine des pics correspondants :

1. Le volume mort de la colonne et les volumes de rétention.
2. Les facteurs de rétention, le facteur de sélectivité.
3. La hauteur d'un plateau théorique pour le composé **2** et le facteur de résolution entre les composés **1** et **2**.
4. Écrire la relation qui lie α aux facteurs de distribution K_1 et K_2 de **1** et **2**.

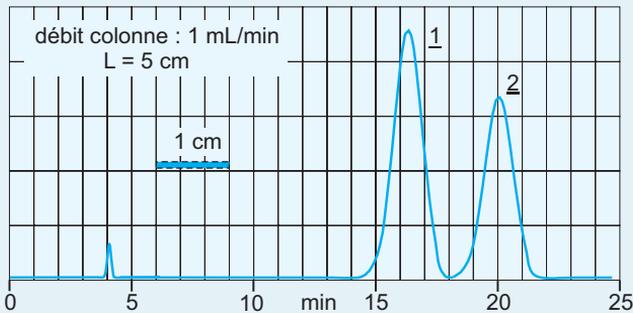


Figure 1.3

Solution

1. Pour déterminer le volume mort, on considérera que le premier pic, à 4 minutes, correspond à un composé non retenu. $V_M = t_M \cdot D$. Connaissant le débit de phase mobile D délivré par l'appareil ($1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), le volume mort est donc de 4 mL.

Les temps de rétention des composés **1** (16,3 min) et **2**, (20 min) conduisent par application de $V_R = t_R \cdot D$, à 16,3 mL et 20 mL.

2. Par application de la relation conduisant au facteur de capacité, la lecture du chromatogramme conduit à : $k_{(1)} = \frac{16,3 - 4}{4} = 3,1$ et $k_{(2)} = \frac{20 - 4}{4} = 4,0$

Le facteur de sélectivité entre les deux composés est de

$$\alpha = \frac{k_{(2)}}{k_{(1)}} = \frac{4}{3,1} = 1,3$$

3. Le calcul de l'HEPT (H), impose de connaître l'efficacité $N_{(2)}$ de la colonne pour le composé **2**. Pour ce calcul, la largeur à mi-hauteur δ et le temps de rétention $t_{R(2)}$ doivent être exprimés dans la même unité. En s'aidant, ici, d'un double-décimètre, on trouve $\delta_2 = 5 \text{ mm}$. Avec cette même unité $t_{R(2)} = 70 \text{ mm}$. On a donc :

$$N_{(2)} = 5,54 \frac{t_{R(2)}^2}{\delta_2^2} = 5,54 \frac{70^2}{5^2} = 1\,086 \text{ plateaux théoriques. Par suite,}$$

$$H_2 = 50/1\,086 = 46 \times 10^{-3} \text{ mm, soit } 46 \mu\text{m.}$$

Pour le calcul de la résolution R , il faut pouvoir évaluer les largeurs « à la base » des pics (soit ω_1 et ω_2). La mesure n'étant pas toujours précise, on transformera la formule classique afin de faire apparaître la largeur à mi-hauteur δ .

Sachant que $\omega = 1,7\delta$, on peut écrire :

$$R = 2 \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{1,7\delta_1 + 1,7\delta_2} = 1,117 \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{\delta_1 + \delta_2}$$

En prenant 5 mm comme valeur commune pour les largeurs à mi-hauteur des pics

1 et **2**, on a : $R = 1,117 \frac{70 - 86}{5 + 5} = 1,65$

Lorsque $R > 1,5$, on considère que la séparation est totale.

4. En faisant apparaître masses et volumes dans l'écriture de K , on a :

$$K = \frac{m_S}{V_S} \cdot \frac{V_M}{m_M} = \frac{m_S}{m_M} \cdot \frac{V_M}{V_S} = k \cdot \beta$$

par suite pour les deux composés, le rapport V_M/V_S étant le même,

$$\alpha = \frac{k_{(2)}}{k_{(1)}} = \frac{K_2}{K_1}$$

EXERCICE 3 Deux autres expressions de la résolution R

Parmi les expressions dérivées de la relation de base définissant la résolution R, deux expressions classiques sont souvent utilisées (A) et (B), dite formule de Purnell :

$$R = \frac{\sqrt{N}}{2} \cdot \left(\frac{k_2 - k_1}{2 + k_1 + k_2} \right) \quad (\text{A}) \quad R = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left(\frac{k_2}{1 + k_2} \right) \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \quad (\text{B})$$

Retrouver ces deux expressions A et B à partir des relations de base.

Solution

Rappel de trois formules de base :

$$N = 16 \frac{t_R^2}{\omega^2} \quad (1) \quad R = 2 \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{\omega_1 + \omega_2} \quad (2) \quad t_R = t_M \cdot (1 + k) \quad (3)$$

– Formule de Purnell. B

Si $\omega_1 = \omega_2 = \omega$, la relation (2) devient :

$$R = 2 \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{2 \cdot \omega}$$

Compte tenu de (3) le numérateur devient égal à $t_M(k_2 - k_1)$

D'autre part, l'expression de l'efficacité (1) permet d'extraire

$$\omega = \frac{4 \cdot t_{R(2)}}{\sqrt{N}}$$

$$\text{soit } R = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{t_M \cdot (k_2 - k_1)}{t_M \cdot (1 + k_2)}$$

pour faire apparaître le facteur de sélectivité $\alpha = k_2/k_1$ on divise haut et bas par

$$k_2, \text{ ce qui donne } R = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{(k_2 - k_1)/k_2}{(1 + k_2)/k_2} \text{ soit } R = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{(1 - 1/\alpha)}{(1 + k_2)/k_2}$$

qui n'est autre que la formule (B) de l'énoncé : $R = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left(\frac{k_2}{1 + k_2} \right) \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right)$

– Formule A

(1) permet d'écrire $\omega = \frac{4 \cdot t_{R(2)}}{\sqrt{N}}$ donc (2) peut s'écrire $R = \frac{\sqrt{N}}{2} \cdot \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{(t_{R(2)} + t_{R(1)})}$

puis, à partir de (3), $R = \frac{\sqrt{N}}{2} \cdot \frac{t_M(1 + k_2) - t_M(1 + k_1)}{t_M(1 + k_1) + t_M(1 + k_2)}$

soit, en simplifiant, la formule A.

5. Thermodynamique et chromatographie

Le facteur ou coefficient de partition K , sans dimension, correspond au rapport entre deux concentrations exprimées dans la même unité (masse par unité de volume ou $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). K peut être proche de 0 si le soluté n'a que très peu d'affinité pour la phase stationnaire. On peut appliquer à cet équilibre de distribution quelques paramètres fondamentaux de la thermodynamique. Un composé qui quitte la PM pour se fixer sur la PS voit son entropie diminuer. Le processus de dissolution dans la PM est spontané. Les variations de l'enthalpie libre, de l'enthalpie et de l'entropie sont négatives.

$$\boxed{d(\ln K)/dT = \Delta H^0/RT^2} \quad (\text{relation de van't Hoff}).$$

$$\Delta G^0 = -RT \ln K$$

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S$$

EXERCICE 4 Application

- Dans quel ordre deux composés A et B seront-ils élués à 100 °C sur une colonne dont le couple PS/PM est tel que l'on a :
Composé A : $\Delta H_A^0 = -40 \text{ kJ/mol}$; $\Delta S_A^0 = -60 \text{ J}^\circ\text{K}$
Composé B : $\Delta H_B^0 = -30 \text{ kJ/mol}$; $\Delta S_B^0 = -50 \text{ J}^\circ\text{K}$
- Relier le facteur de sélectivité entre ces deux composés aux enthalpies libres de dissolution dans la phase stationnaire.
- Calculer la différence d'enthalpie libre de dissolution entre deux composés pour lesquels le facteur de sélectivité est de $\alpha = 1,2$. Température colonne 37 °C ($R = 8,31 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$).

Solution

1. Il nous faut comparer les enthalpies libres (ΔG) par mole de ces deux composés, c'est-à-dire : $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ à 100 °C soit $T = 273 + 100 = 373 \text{ K}$.

Pour A : $\Delta G = -40 - 373 \times (-60/1000) = -17,62 \text{ kJ/mol}$.

Pour B : $\Delta G = -30 - 373 \times (-50/1000) = -11,35 \text{ kJ/mol}$.

B sera donc élué en premier, la valeur de ΔG étant plus petite que celle de A (plus ΔG est grand en valeur absolue, plus il est « dissous » dans la phase stationnaire).

2. Composé A : $K_A = [A]_S/[A]_M$ $\Delta G_A^0 = -RT \ln K_A$ $\ln K_A = -\Delta G_A^0/RT$
 Composé B : $K_B = [B]_S/[B]_M$ $\Delta G_B^0 = -RT \ln K_B$ $\ln K_B = -\Delta G_B^0/RT$
 or $\alpha = K_A/K_B$ (d'après la question 1, A est élué après B)

$$\text{soit } \boxed{\alpha = \exp(\Delta G_B^0 - \Delta G_A^0)/RT)}$$

3. L'expression précédente revient à écrire :

$$\boxed{\Delta G_1^0 - \Delta G_2^0 = RT \cdot \ln \alpha}$$

A. Num.

$$\Delta G_1^0 - \Delta G_2^0 = 8,31 \times 310 \times 0,182 = 469 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}.$$

Note : α étant pratiquement toujours proche de 1 on peut remplacer $\ln \alpha$ par $(\alpha - 1)$.

6. Influence de la température sur t_R et k

La relation de van't Hoff permet, connaissant le facteur de rétention (ou le temps réduit) d'un composé à deux températures différentes (mais proches), toutes conditions expérimentales identiques par ailleurs, de calculer, approximativement, la nouvelle valeur de k (ou du temps réduit) pour une autre température que l'on aura choisie.

$$\text{En partant de } K = \frac{C_S}{C_M} = \frac{m_S \cdot V_M}{m_M \cdot V_S}$$

$$\text{sachant que } k = \frac{m_S}{m_M} \text{ et en désignant par } \beta \text{ le rapport de phases } \beta = \frac{V_M}{V_S}$$

$$\text{on a donc } k = K/\beta \quad \text{par suite } t_R - t_M = t_M \cdot K/\beta.$$

$$\text{Soit : } \ln(t_R - t_M) = \ln t_M + \ln K - \ln \beta$$

$$\text{or } \ln K = -\Delta G^0/RT$$

$$\ln K = -(\Delta H^0 - T\Delta S)/RT.$$

Si on admet que l'enthalpie et l'entropie demeurent inchangées dans la plage de température concernée, on obtient une expression reliant la température et les temps de rétention du type :

$$\boxed{\ln(t_R - t_M) = a/T + b}$$

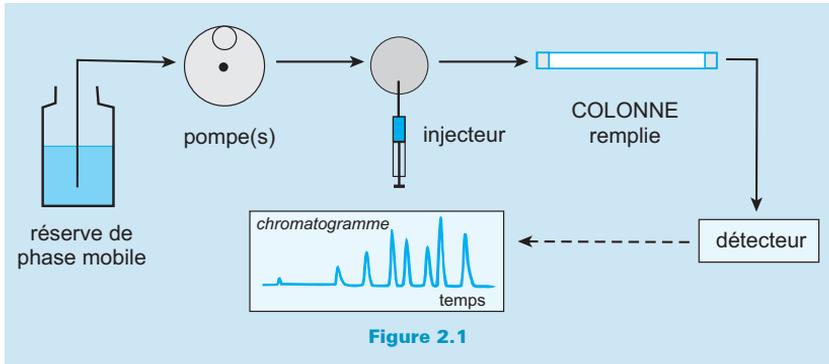
La CLHP fait partie des techniques chromatographiques qui font appel à une phase mobile liquide. Elle recouvre un très large champ d'applications concernant aussi bien les molécules thermolabiles que les biomolécules. L'amélioration continue des performances des colonnes a entraîné une évolution de l'appareillage pour gagner en rapidité et en coût de fonctionnement, donnant naissance à l'*ultra*-CLHP (ou *UPLC*). Enfin, la CLHP se prête au couplage avec plusieurs techniques spectrométriques d'identification.

1. Principes de base

La chromatographie liquide haute performance (CLHP — HPLC en anglais) est, en analyse, l'aboutissement de la chromatographie classique sur colonne dont les performances se sont trouvées grandement améliorées par :

- la miniaturisation, rendue possible par les progrès technologiques ;
- la mise au point de nombreuses phases stationnaires. Celles-ci permettent de réaliser des colonnes garnies très compactes, mais imposent *a contrario* l'emploi de pompes hautes pression pour assurer un débit suffisant de la phase mobile dans la colonne ;
- l'usage de colonnes de petits diamètres internes – moins de 1 mm (*nano*- ou *ultra*-CLHP), ce qui permet d'économiser les quantités de phase mobile nécessaires aux séparations.

Un chromatographe pour CLHP comporte plusieurs modules spécialisés (pompes, injecteur, colonne, détecteur), reliés entre eux par l'intermédiaire de canalisations de très faible diamètre et qui apparaissent soit séparés, soit intégrés dans un même châssis (figure 2.1). L'injecteur est conçu autour d'une vanne à boucle pour permettre l'introduction de l'échantillon sous très forte pression. Le détecteur est choisi en fonction des applications projetées. Ce peut être un réfractomètre différentiel ou un spectrophotomètre (UV, IR, Fluorimètre) ou encore un spectromètre de masse.



Quand on augmente la température, on réunit divers avantages :

- la viscosité de la PM diminue, donc la perte de charge dans la colonne ;
- le temps d'analyse diminue ainsi que l'asymétrie des pics ;
- un gradient de température permet de remplacer un gradient de solvant (PM).

EXERCICE 1 Intérêt des colonnes capillaires

On dispose de deux colonnes de même longueur, de même taux de remplissage (V_S/V_M) et contenant la même phase stationnaire. L'une (**A**) a un diamètre interne D_I de 4,6 mm et l'autre (**B**) est un capillaire pour lequel $D_I = 300 \mu\text{m}$. On décide de les utiliser avec le même chromatographe et dans des conditions identiques.

1. Sachant que le débit conseillé pour la colonne **A**, est de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, calculer la valeur de ce débit pour obtenir avec la colonne **B**, la même vitesse linéaire de phase mobile.
2. Quand on passe de **A** à **B**, le volume de rétention (ou d'élution) d'un même composé est-il modifié ?
3. Si la sensibilité du détecteur n'a pas été modifiée entre les deux expériences, les intensités des pics correspondants seront-elles différentes ?

Solution

1. Pour assurer la même vitesse linéaire, il faut que les débits soient dans le même rapport que celui des sections des deux colonnes (de la forme $S = \pi \cdot D_I^2 / 4$). On a : $S_A = \pi \cdot D_A^2 / 4$ et $S_B = \pi \cdot D_B^2 / 4$ soit $S_A / S_B = D_A^2 / D_B^2 = (4,6 / 0,3)^2 = 235$

Le débit dans la colonne **B** sera de $1/235 = 0,004 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (soit $4 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$).

2. Oui, il est dans le rapport précédent. Pour la colonne **B**, la quantité de phase mobile nécessaire sera 235 fois moins importante. Par exemple, pour un composé élué en 12 minutes, il faudra 12 mL pour **A** et $48 \mu\text{L}$ seulement (1 goutte) pour **B**.

3. Si la quantité injectée est la même, le signal détecté sera 235 fois plus intense avec la colonne **B**, le composé étant moins dilué dans la phase mobile.

2. Phases stationnaires

Les matériaux à usage de phases stationnaires se présentent sous forme soit de microsphères monosphère (diamètre de 1 à $12 \mu\text{m}$) soit de solides poreux de type monolithe. Ils comportent des **macropores** (quelques μm) permettant à la PM de circuler et des **mésopores** (quelques nm) qui créent la grande surface de contact (plusieurs centaines de m^2 par gramme) afin de favoriser les mécanismes de partition avec les solutés. Les colonnes monolithes, macroporeuses, sont plus perméables que celles obtenues par tassement de particules sphériques.

Dans l'élaboration des phases stationnaires actuelles, le gel de silice continue à tenir une place prépondérante en tant que matériau précurseur de beaucoup d'entre elles.

LE GEL DE SILICE

C'est un solide amorphe ayant pour formule de composition $\text{SiO}_2 (\text{H}_2\text{O})_n$ (avec n très proche de 0). Il est tout à fait différent de la silice naturelle cristalline (SiO_2) qui sert à le fabriquer. C'est un polymère inorganique réticulé, porteur de groupements silanols (Si-OH), responsables des propriétés catalytiques acides de ce matériau très polaire (Si-OH a un pK de 10, comme le phénol par exemple).

Ses propriétés dépendent de nombreux paramètres : **structure interne**, **porosité ouverte** (dimension et répartition des pores), **surface spécifique**, **résistance à l'écrasement** et **polarité**. Les gels de silice courants comportent quelques groupes silanols par nm^2 .

Le mécanisme d'action du gel de silice repose sur l'**adsorption** (figure 2.2), phénomène qui consiste en l'accumulation d'un composé à l'interface entre deux phases à la différence de l'**absorption**.