

Annick ROUESSAC
Maître de conférence honoraire
à l'IUT du Mans

Francis ROUESSAC
Professeur honoraire
à l'IUT du Mans

Techniques instrumentales d'analyse chimique en 23 fiches

DUNOD

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.

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

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. 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).



© Dunod, Paris, 2011
ISBN 978-2-10-056616-7

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	IV
Fiche 1 Chromatographie – Généralités	1
Fiche 2 Chromatographie en phase liquide (CLHP)	8
Fiche 3 Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	16
Fiche 4 Chromatographie d'exclusion stérique	24
Fiche 5 Chromatographie – Analyse quantitative	30
Fiche 6 Chromatographie sur couche mince (CCM)	36
Fiche 7 Électrophorèse capillaire	41
Fiche 8 Spectrométrie de l'UV-Visible et du très proche infrarouge	49
Fiche 9 Analyses dans l'UV et dosages colorimétriques	55
Fiche 10 Spectrométrie infrarouge	62
Fiche 11 Infrarouge – Applications qualitatives	66
Fiche 12 Infrarouge quantitatif	74
Fiche 13 Fluorimétrie et chimiluminescence	80
Fiche 14 Fluorescence X	87
Fiche 15 Spectrométrie d'absorption atomique	94
Fiche 16 Spectrométrie d'émission atomique	101
Fiche 17 Photométrie de flamme	108
Fiche 18 Spectrométrie de masse – Partie 1	114
Fiche 19 Spectrométrie de masse – Partie 2	121
Fiche 20 Spectrométrie de masse – Partie 3	127
Fiche 21 Méthodes par marquage radioactif	134
Fiche 22 Dosages potentiométriques	140
Fiche 23 Analyseurs spécifiques	146
Quelques constantes physico-chimiques	152
Index	153

Avant-propos

L'analyse chimique correspond à un domaine très vaste qui englobe un ensemble de techniques et de méthodes pour déterminer la nature et la composition, voire la structure d'échantillons variés. On la rencontre dans de nombreux secteurs qui vont des plus traditionnels comme ceux de la chimie ou de la parachimie, aux secteurs de la biochimie, de l'agroalimentaire, du diagnostic médical, de l'environnement ou de la sécurité (police scientifique, fraudes...).

Pour en faire une sorte de panorama représentatif, à défaut d'être exhaustif, les auteurs ont développé dans ce livre 23 fiches de 6 à 8 pages. Chacune a pour thème une méthode importante, abondamment utilisée en analyse chimique. Dans ce but, la fiche se compose de quelques lignes sur l'objectif de la méthode décrite puis d'un rappel des points essentiels agrémentés d'exercices d'application ou d'exemples de dosages, suivis de leurs corrections détaillées. Le niveau mathématique requis rend le contenu accessible aux étudiants de premier cycle universitaire, des IUT ou des BTS. Il va de soi que les calculs d'analyse demandés dans les exercices n'ont qu'un but pédagogique, les instruments actuels comportant presque toujours les outils informatiques qui dispensent l'opérateur de ces tâches.

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, Février 2011

Chromatographie

Généralités

La chromatographie est une méthode qui permet de séparer les constituants d'un mélange en phase homogène liquide ou gazeux. Elle tient une place très importante en analyse chimique pour identifier et quantifier, même à l'état de traces, toutes sortes de composés présents dans des échantillons les plus divers. Son champ d'application s'étend aussi aux échantillons à l'état solide ou hétérogènes à condition de disposer d'un solvant pour les mettre sous forme d'une solution homogène.

I 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.

II 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).

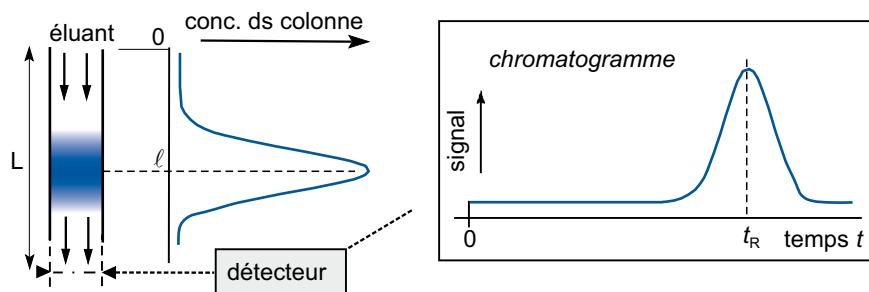


Figure 1.1

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).

III 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.

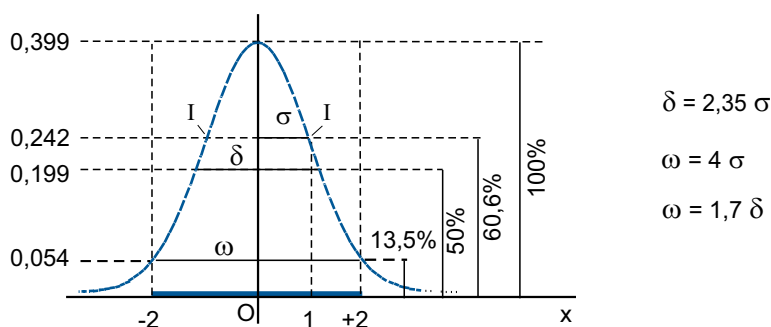


Figure 1.2

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 $\delta = 2 \times 1,177 \cong 2,35$

IV 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'élution** (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 »)

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

- **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 d'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**

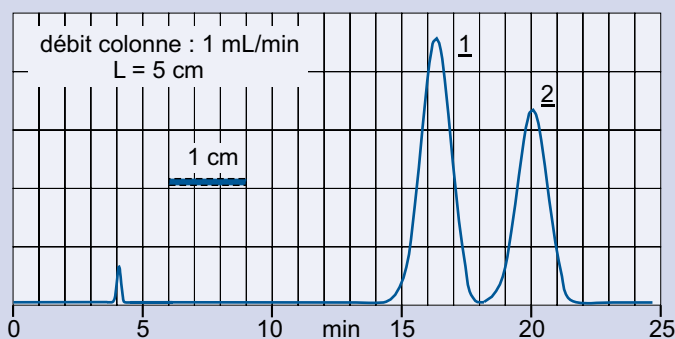


Figure 1.3

Solution

1. Pour déterminer le volume mort, on considérera que le premier pic, à 4 min, 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 :

$$R = 2 \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{1,7\delta_1 + 1,7\delta_2} = 1,177 \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{\delta_1 + \delta_2}$$

En prenant 5 mm comme valeur commune pour les largeurs à mi-hauteur des pics **1** et **2**, on a : $R = 1,177 \frac{70 - 56}{5 + 5} = 1,65$

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 :

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