

Fiche 1

Chromatographies

Comme les radiations lumineuses dans le spectre, les différents composants d'un mélange de pigments, obéissant à une loi, se trouvent séparés sur la colonne de carbonate de calcium et peuvent ensuite être déterminés qualitativement et quantitativement. J'appelle une telle préparation un chromatogramme et la méthode correspondante la méthode chromatographique.

Mikhaïl TSWETT, 1906

Ressources utilisées

- Leçon de T. OLLA et correction de M. ROUX
- Cours de C. MONNEREAU, prise de notes
- ROUESSAC, Analyse chimique ; pour un peu tout
- MARTINAND-LURIN, 40 Exp. ; fiche CPV
- BLANCHARD, ... ; nitration du toluène (p. 135)
- SKOOG, Chimie analytique ;
- BERNARD, Techniques expérimentales en chimie ; pour CCM et Colonne
- (BOBBIT, Introduction à la chromatographie)

Introduction

Il s'agit d'une leçon qui, en fonction de l'élément imposé, peut se placer à plusieurs niveaux.

Remarque Éléments imposés possibles : HPLC, CCM, CPV, utilisation en TP. Dans le cas d'un élément imposé autour des chromatographies autres que CCM, la leçon se place naturellement en L3, comme un cours d'introduction vers la chimie analytique.

En effet, en L3, les cours peuvent se permettre d'être plus axé sur la découverte d'une discipline en chimie, pour intéresser les étudiant·es et les amener à réfléchir au Master qu'ils souhaiteraient poursuivre. Cependant, bien que ce cours puisse être vu comme une introduction vers l'étude et le développement de techniques chromatographiques, il s'agit avant tout de donner aux étudiant·es la connaissance nécessaire à leur utilisation en séances de TP. On attachera donc une attention particulière à décrire les méthodes/protocoles employés, et à se rattacher à ce que les élèves peuvent rencontrer en TP parallèlement à ce cours.

Remarque Suivant la couleur qu'on souhaite donner à la leçon, on pourra mettre en pré-requis la classification des chromatographies/les définitions ; éventuellement la notion de plateau théorique.

Par rapport à la leçon proposée par T. OLLA, on s'en détache et s'oriente vers les données compilées par le livre de ROUESSAC et ceux de SKOOG et la proposition de plan de M. ROUX.

Les plans proposés par T. et M. sont respectivement :

1. Classification
2. Aspects quantitatifs de la chromatographie
 - (a) Les grandeurs chromatographiques
 - (b) Approche thermodynamique
 - (c) Approche cinétique
3. Exemple de la HPLC

et

1. Chromatographie en phase vapeur
 - (a) Caractéristiques chromatographiques
 - (b) Principe de la chromatographie de partage
 - (c) De l'injecteur au chromatogramme
2. Optimisation de la technique chromatographique
 - (a) Nombre et hauteur de plateaux théoriques effectifs
 - (b) Débit du gaz vecteur
 - (c) Facteur de résolution

Pour une leçon se plaçant à un niveau L3, les pré-requis seraient globalement (à moduler) :

- Pratique de la CCM en TP [secondaire, L1]
- Liaisons non covalentes (ioniques, hydrogène, de VAN DER WAALS) [L1]
- Fluide supercritique (définition et propriétés) [L1]
- Équilibres thermodynamiques et application à la distillation [L2]
- Écoulement de POISEUILLE, écoulement turbulent [L2]
- Diffusion de particules [L2]

Pédagogie Il faudra éviter, en particulier en leçon, de rester trop abstrait et théorique : trouver des exemples, des illustrations ; ancrer la leçon et les notions dans le réel...

Histoire L'invention de la chromatographie est attribuée à TSWETT, autour des années 1900, un biochimiste s'intéressant à l'extraction de la chlorophylle des plantes. Au cours de différents travaux (décrits brièvement en première page du ROUESSAC), il nomme certaines propriétés, comme l'adsorption, autour des composés qu'il étudie. C'est en 1906 qu'il écrit ce paragraphe souvent cité, cité en première page.

Aujourd'hui, les différentes techniques chromatographiques sont des techniques de routine pour le chimiste qui s'en sert tout au long d'une réaction : pour son suivi et la purification. La chromatographie présente également des intérêts industriels, comme le suggère l'utilisation de résine échangeuse d'ions.

Vous avez déjà rencontré et étudié particulièrement un type de chromatographie : la chromatographie d'adsorption. On rappelle.

1.1 Aspects généraux théoriques de la chromatographie

La chromatographie est un procédé *physico-chimique* de séparation des constituants d'un mélange homogène liquide ou gazeux. Le principe de base d'une méthode chromatographique est décrit ci-après 1.1 ; l'idée est de séparer les composants d'un mélange en jouant sur leur différence d'affinité avec une phase mobile ou une phase stationnaire.

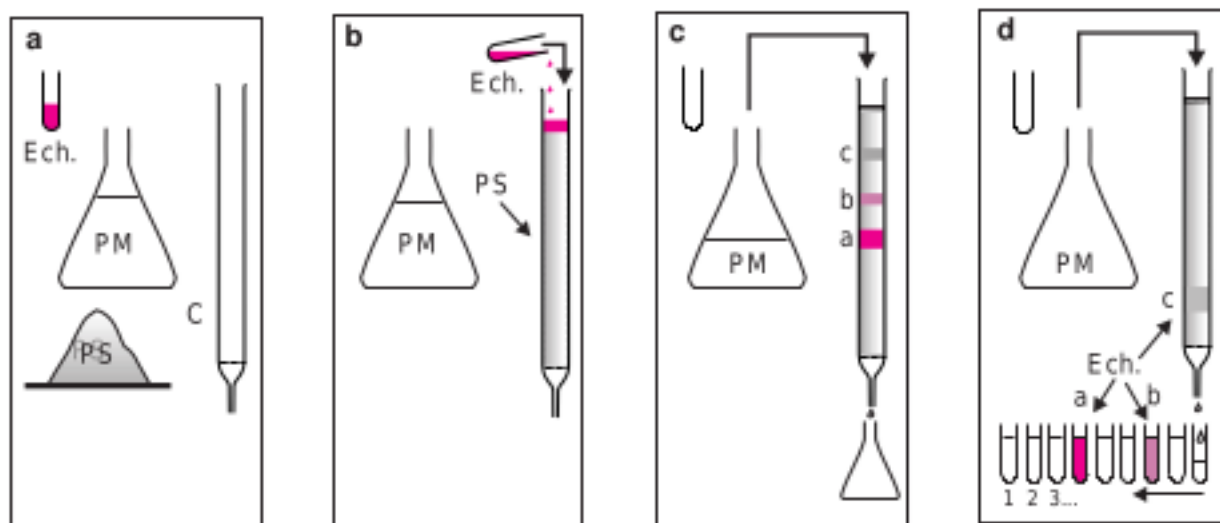


FIGURE 1.1 – L'expérience de base en chromatographie. a) Les ingrédients nécessaires C, colonne, PS, phase stationnaire, PM, phase mobile et E, échantillon ; b) le dépôt de l'échantillon ; c) le début de l'élution ; d) la récupération des produits après séparation. *Source, ROUESSAC, p. 6.*

La méthode ici présentée possède de nombreux inconvénients, dont la difficile reproductibilité à l'identique de l'expérience. Les temps de migration, c'est à dire le temps que met un composé à être extrait à partir de l'instant où la phase mobile est injecté, dépend énormément de l'expérience et ne peut être considéré comme une caractéristique absolue du composé étudié : on doit toujours le comparer à un composé qu'on sait authentique et qu'on soumet au même protocole.

C'est aujourd'hui un enjeu, auquel répondent les chromatographes les plus sophistiqués de notre époque, pilotés par logiciel, permettant de contrôler au mieux les différents paramètres (taille des phases, vitesse d'élution...) et de reproduire les temps de rétention/migration précisément.

1.1.1 Chromatogramme

Ces techniques permettent aujourd'hui d'établir des *chromatogrammes*, c'est-à-dire la courbe qui traduit la variation au cours du temps d'un paramètre relié à la concentration ou la quantité de soluté en sortie de colonne. On y porte le temps en abscisse, l'origine correspondant à l'introduction de l'échantillon.

Remarque Le temps ou parfois le volume d'élution, plus rare.

Un constituant (parmi ceux à séparer) est caractérisé par son temps de rétention t_R ; un constituant non retenu sort de la colonne à un temps t_M appelé temps mort ; on écrit alors le temps de rétention réduit :

$$t'_R = t_R - t_M, \text{ voir figure p. 8 du ROUESSAC.} \quad (1.1)$$

Remarque On retiendra que dans le cas idéal, t_R ne dépend pas de la quantité injectée et que plus le temps de rétention est élevé, plus le pic est large. *cf.* section du ROUESSAC sur les pics d'élution, p. 9.

1.1.2 Nombre et hauteur de plateaux théorique

Remarque De nombreuses approches des plateaux théoriques existent... on retiendra que la hauteur de plateau dépend de nombreux paramètres et que la notion de plateau théorique en chromatographie n'a plus rien à voir, aujourd'hui, avec la notion de plateau théorique en distillation (modèle analogue chromato/distill proposé par MARTIN et SYNGE, PN en 1952 ; obsolète aujourd'hui).

La notion de plateau théorique provient du modèle le plus ancien proposé par CRAIG, modèle jugé obsolète aujourd'hui ; avec analogie au modèle de la distillation par MARTIN et SYNGE.

Il s'agissait de décomposer la colonne, de toute sa hauteur L , en un nombre N de plateaux fictifs de même hauteur. On pouvait alors donner la hauteur équivalente à un plateau théorique HEPT :

$$H = \frac{L}{N}. \quad (1.2)$$

Aujourd'hui, on a tendance à parler de l'efficacité d'une colonne que l'on nomme N , correspondant aux précédents nombres de plateaux théoriques. Pour tout chromatogramme, à partir du pic d'éluion on mesure la variance au cours du temps :

$$\sigma^2 \text{ où } \sigma = \frac{\sigma_L}{v}, \quad (1.3)$$

avec σ_L la dispersion linéaire de la zone occupée par le soluté migrant dans la colonne :

$$\sigma_L^2 = HL \quad (1.4)$$

et v la vitesse moyenne d'éluion. On pourra alors calculer l'efficacité théorique N pour ce composé :

$$N = \frac{L^2}{\sigma_L^2} = \frac{L^2 v^2}{\sigma_L^2 v^2} = \frac{t_R^2}{\sigma^2}. \quad (1.5)$$

Et lorsque le temps mort est accessible, on définit l'efficacité réelle (le nombre de plateaux théoriques effectifs) :

$$N_{\text{eff}} = \frac{t_R^2}{\sigma^2}. \quad (1.6)$$

La hauteur de plateaux est alors :

$$H_{\text{eff}} = \frac{L}{N_{\text{eff}}}. \quad (1.7)$$

L'avantage de H est de pouvoir comparer toutes les techniques de chromatographies entre elles...

Parmi les paramètres qui entrent en jeu dans l'évolution de H et de fait de l'efficacité N (hauteur et nombre de plateaux théoriques), on retiens notamment la vitesse de la phase mobile. Il est important de prendre en compte la vitesse (ce qui n'était pas le cas dans tous les modèles statiques et thermodynamiques...) car, si elle devient trop importante, elle perturbe la cinétique de l'équilibre du soluté entre phase stationnaire et phase mobile.

La forme la plus connue de l'évolution de H est connue sous le nom de l'équation de VAN DEEMTER, proposée en 1956 :

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C\bar{u} \quad (1.8)$$

où \bar{u} est la valeur de la vitesse linéaire moyenne d'écoulement de la phase mobile ; les termes A , B et C sont des coefficients numériques expérimentaux liés à la colonne et aux conditions opératoires :

- A , terme de remplissage, en relation avec le profil d'écoulement de la phase mobile : on parle aussi de facteur de diffusion turbulente ; (considéré absent pour les colonnes capillaires, peu important pour les phases liquides)
- B , terme de diffusion dans la phase mobile, dépend de la diffusivité de l'analyte dans la phase mobile. En conséquence, à débit trop faible, les constituants se mélangent à nouveau, plus vite que ne s'opère la séparation par migration...
- C , terme de transfert de masse, dû à la résistance au transfert de masse du soluté entre les deux phases.

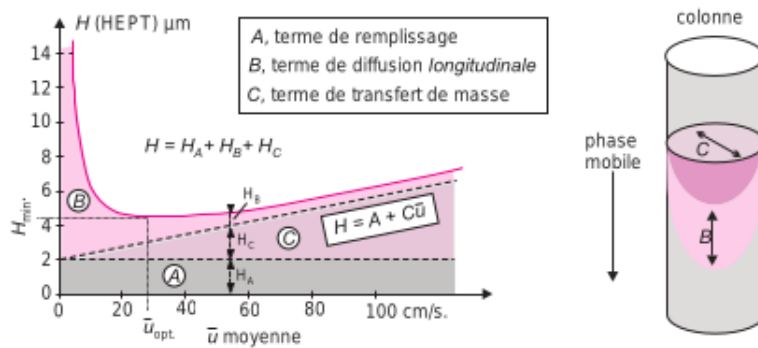


FIGURE 1.2 – Courbe de VAN DEEMTER en chromatographie gazeuse avec indication des domaines propres à A , B et C. *Source*, ROUESSAC, p. 21

Remarque Ne pas hésiter à lire au passage le SKOOG, schémas et calculs pouvant aider. Aussi, de nombreux exercices sont décrits et corrigés (succinctement), mais avec des exemples concrets.

1.1.3 Grandeurs de rétention

On peut définir pour les temps de rétention, rétention réduit et mort, les volumes associés, en multipliant ces premiers par le débit si celui-ci est stationnaire. Pour toutes les autres grandeurs, on pourra lire de ROUESSAC, p. 15.

Facteur de phase β rapport du volume de la phase stationnaire sur le volume de la phase mobile.

Facteur de rétention k , rapport de la masse de soluté en phase stationnaire par la masse de soluté en phase mobile. On fait en sorte d'avoir des facteurs de rétention autour de 5 (plus grand, temps d'élution trop longs...).

Facteur de séparation ou sélectivité entre deux composés, le rapport des temps de rétention réduits entre deux composés ; ou rapport des facteurs de rétention.

Facteur de résolution entre deux pics ; fait intervenir la largeur du pic, *cf.* section sur les pics d'élution...

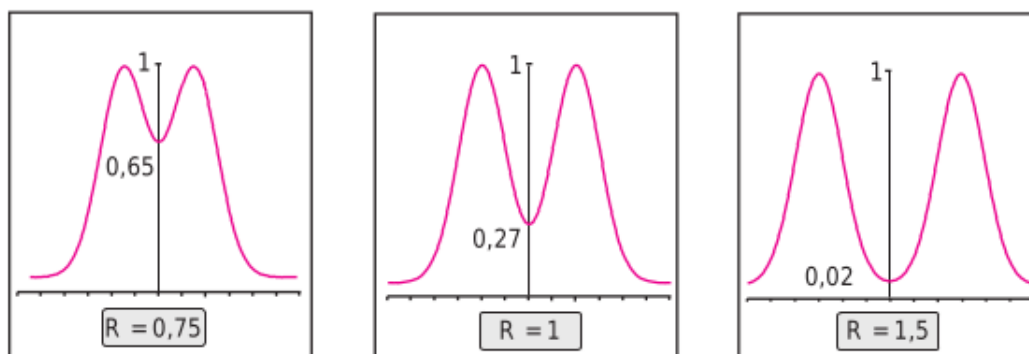


FIGURE 1.3 – Facteur de résolution, *Source* ROUESSAC, p. 18

1.2 Classification(s) des chromatographies

Chromatographie en phase liquide

Chromatographie en phase gaz

Chromatographie par exclusion stérique

Chromatographie par échange d'ions

Chromatographie en fluide supercritique

Remarque Voir tableau 30.4 p. 921 du SKOOG.

1.3 La chromatographie en pratique : CPV

Position du problème.

Exemple Nitration du toluène; voir BLANCHARD, p. 135.

1.3.1 Présentation de la technique chromatographique

La CPV repose elle aussi sur la la séparation des composés par une différence d'affinité entre deux phases, une stationnaire et une mobile. La phase stationnaire peut ici être un polymère liquide, placé dans une colonne dite *capillaire* (voir plus loin). La phase mobile, quant à elle, est un gaz appelé *vecteur* : par exemple, N_2 , He ou H_2 , qui présentent chacun des avantages et des inconvénients. (discuté et à discuter, dans le ROUESSAC, p. 38). On retiendra que H_2 apporte des avantages concernant la durée de vie de la colonne (moins de perte de charge car moins visqueux) et concernant la vitesse d'analyse (courbes de VAN DEEMTER).

Remarque On en profite pour présenter un schéma de l'installation CPV. À tirer du ROUESSAC ou du SKOOG.

La séparation, (différence d'affinité), repose sur un équilibre de partage (de solubilité) entre phase stationnaire (polymère) et mobile (gaz vecteur).

Paramètres opérationnels pour une phase stationnaire donnée :

- L, longueur de la colonne (lien avec N!);
- u, vitesse de la phase mobile (lien avec N!);
- T, température;
- β , rapport de phase (lien avec k!);

1.3.2 Quelle optimisation ?

Remarque En ouverture : vers l'analyse par spectrométrie de masse, GC-MS.

1.4 La chromatographie en pratique : HPLC

1.4.1 Présentation de la technique chromatographique

1.5 La chromatographie en pratique : CES

Quelques mots...

Exemple Détermination de masse molaire pour les macromolécules... ROUESSAC p. 145.

Conclusion