

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

UNIVERSITE Dr MOULAY TAHAR - SAIDA

Faculté des Sciences – Département de Chimie



Polycopié

Chimie Analytique

Méthodes séparatives et spectrales

Dr. MEDJAHED Baghdad

Maitre de Conférences « Classe A »

Année : 2021

Avant propos

Ce document de cours a été conçu plus particulièrement pour satisfaire le programme d'enseignement des étudiants en Master I Chimie Inorganique à l'université Dr Moulay Tahar de Saida. Il est aussi destiné à tous les étudiants en Master, autres spécialités, voulant approfondir leurs connaissances dans le domaine de la chimie analytique.

Ce cours est le fruit d'un enseignement de la Chimie Analytique depuis cinq ans au département de chimie, il est subdivisé en deux parties : Méthodes séparatives et spectrales.

Le but du cours est d'étendre aux méthodes instrumentales les plus courantes la formation de base en chimie analytique. Ces méthodes reposent sur l'application des connaissances acquises en chimie générale. Les objectifs des exercices d'applications présentés viseront à favoriser la compréhension, l'assimilation du cours et familiariser l'étudiant avec la relation théorie-expérience.

Les principaux thèmes abordés lors du cours sont la chromatographie comme étant une méthode analytique de séparation ainsi que les méthodes spectroscopiques d'analyse principalement la spectroscopie UV-Visible, Infrarouge et la résonance magnétique nucléaire. Pour chacun de ces thèmes, les bases théoriques des différentes méthodes analytiques seront décrites. L'ensemble permettra à l'étudiant d'acquérir des notions de base pour chaque technique analytique.

Dr MEDJAHED Baghdad

Sommaire

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

Partie I : Méthodes séparatives - Chromatographie

Chapitre I

Chromatographie – Aspects généraux

I.1 Historique.....	3
I.2 Généralités et définitions.....	3
I.3 Terminologie générale de la chromatographie	5
I.4 Objectif analytique	5
I.5 Principe de la chromatographie.....	5
I.6 Classification des méthodes chromatographiques.....	6
I.6.1 Selon la nature des phases	
I.6.2 Selon le support de la chromatographie	
I.6.3 Selon le mécanisme de rétention mis en jeu	
I.7 Choix de la technique	9

Chapitre II

Types de techniques chromatographiques

Introduction	12
II.1 Chromatographie d'adsorption	13
II.2 Chromatographie de partage.....	15
II.3 Chromatographie par échange d'ions.....	17
II.4 Chromatographie d'exclusion.....	21
II.5 Chromatographie d'affinité.....	23
II.6 Chromatographie chirale.....	27

Chapitre III

Analyse qualitative en chromatographie

Introduction.....	33
III.1 Paramètres et grandeurs fondamentales.....	33
III.1.1 Coefficient de distribution.....	33
III.1.2 Chromatogramme.....	33
III.1.2 Grandeurs de rétention.....	34
III.2 Performances des colonnes chromatographiques	35
III.2.1 Facteur de capacité.....	35
III.2.2 Sélectivité d'une colonne.....	36
III.2.3 Efficacité d'une colonne – Modèle des plateaux théoriques.....	37
III.2.4 Facteur de résolution	39
III.2.5 Perte de charge	40
III.2.6 Influence de la vitesse de la phase mobile	40
III.3 Optimisation d'analyse chromatographique	43
III.3.1 Modification du facteur de capacité.....	43
III.3.2 Modification de la hauteur équivalente du plateau théorique.....	44
III.3.3 Modification du facteur de sélectivité.....	45

Chapitre IV - Analyse quantitative en chromatographie	
Introduction.....	47
IV.1 Principe et relation de base	47
IV.2 Méthode d'étalonnage externe.....	48
IV.3 Méthode d'étalonnage interne	49
IV.4 Méthode par normalisation interne.....	51
Exercices d'applications.....	55
Bibliographie (Méthodes séparatives - Chromatographie).....	60

Partie II : Méthodes spectrales

Chapitre V - Spectrométrie UV-Visible

V.1 Généralités sur les méthodes spectroscopiques.....	63
V.2 Le spectre électromagnétique	64
V.3 Principe de la spectrométrie UV-Visible.....	65
V.4 Loi de Beer-Lambert.....	65
V.5 Allure d'un spectre d'absorption.....	66
V.6 Types de transitions électroniques.....	67
V.7 Additivité des absorbances.....	69
V.8 Analyse Multicomposants.....	69
V.8.1 Méthode algébrique de base.....	69
V.8.2 Régression linéaire multilongueur d'onde.....	70
V.9 Applications.....	71
Exercices d'applications.....	73

Chapitre VI - Spectrométrie Infrarouge

Introduction.....	80
VI.1 Présentation des spectres infrarouges.....	80
VI.2 Principe de la spectroscopie infrarouge.....	81
VI.2.1 Vibration des molécules diatomiques.....	81
VI.2.2 Vibration des molécules polyatomiques.....	83
VI.3 Etude des principales bandes caractéristiques.....	84
VI.4 Appareillage.....	84
VI.5 Fréquences de vibration certaines fonctions chimiques.....	86
VI.6 Spectres infrarouge de quelques fonctions organiques.....	88
Exercices d'applications.....	92

Chapitre VII - Résonance Magnétique Nucléaire

Introduction.....	98
VII.1 Spectre RMN.....	98
VII.2 Les protons équivalents.....	99
VII.3 Signification du déplacement chimique.....	100
VII.4 Les signaux à pics multiples.....	101
VII.5 Principe de la détermination de la structure d'une molécule.....	101
VII.6 Facteurs affectant les déplacements chimiques.....	102
VII.7 Appareillage et analyse en RMN.....	103
Bibliographie (Méthodes spectrales).....	105

Introduction générale :

La chimie analytique est la branche de la chimie qui a pour but l'identification, la caractérisation et la quantification des substances chimiques ainsi que le développement des méthodes nécessaires à cette analyse. Elle s'intéresse également à la compréhension des phénomènes mis en jeu dans les processus et les techniques d'analyse

La chimie analytique joue un rôle essentiel dans le contrôle de la qualité des produits, qui est indispensable pour les industries chimiques, pharmaceutiques, alimentaires et dans le domaine environnemental (contrôle du taux et de la nature des substances, polluantes).

L'analyse chimique fait preuve de beaucoup d'innovations. L'évolution des technologies a permis la réalisation d'instruments très performants, apportant des possibilités nouvelles, notamment avec l'introduction des méthodes couplées et des méthodes non destructives, qui se contentent de petits échantillons ne nécessitant pas, ou très peu, de préparation préalable à la mesure.

Les méthodes analytiques présentées dans ce cours sont classées en méthodes séparatives (chromatographie) et méthodes spectrales (Spectroscopie UV-Visible, Infrarouge et Résonance Magnétique Nucléaire RMN).

Dans la première partie, quatre chapitres ont été présentés pour décrire le principe de la chromatographie, les différents types de techniques chromatographiques, l'aspect qualitatif de la technique analytique ainsi que l'aspect quantitatif.

Dans la seconde partie, des méthodes analytiques spectrales ont été décrites. Pour chaque méthode, des notions théoriques de base ont été présentées principalement le principe de la technique d'analyse, l'exploitation des résultats expérimentaux ainsi que l'instrumentation correspondante à chaque méthode.

Partie I

Méthodes séparatives - Chromatographie

Chapitre I

Chromatographie – Aspects généraux

I.1 Historique :

En 1906 un chimiste russe, Tswett, a séparé des pigments végétaux colorés sur une colonne remplie de carbonate de calcium pulvérulent, les pigments étaient entraînés avec de l'éther de pétrole (mélange de pentane et d'hexane). Il a observé sur la colonne la formation de bandes de couleur différente (vert, orange, jaune...). Il a donné à cette technique le nom de chromatographie (écriture des couleurs). Il a défini également les termes : chromatogramme, élution, rétention.

Cette technique fut quasi-abandonnée jusqu'en 1930 où Edgar Lederer a purifié par la méthode de Tswett la lutéine du jaune d'œuf.

C'est effectivement au début du siècle qu'eut lieu la première expérience de chromatographie sur papier. Le botaniste russe Tswett sépara des pigments végétaux grâce à cette technique, qui fut dès lors utilisée dans de nombreux cas en chimie organique. En 1950 apparut la chromatographie en phase gazeuse, puis dans les années 60 la chromatographie d'exclusion. C'est en 1969, après le 5^e Symposium International « Advances in Chromatography », que la chromatographie en phase liquide s'est véritablement développée. En fait, dès 1958 Spackman, Stein et Moore analysèrent des acides aminés pour la première fois de manière automatique. Ceci marqua le début de la chromatographie en phase liquide moderne. Giddings œuvra pour le développement de cette technique

C'est grâce aux nouvelles technologies (notamment le traitement par ordinateur) que la chromatographie en phase liquide sur colonne est la plus utilisée en analyse.

I.2 Généralités et définitions :

La chromatographie est une méthode de séparation et de quantification de composés présents dans une phase homogène liquide ou gazeuse. Le principe de base qui régit pratiquement toute technique de purification ou de séparation en chimie se base sur la répartition ou distribution de l'analyte en deux phases.

L'analyte est une substance ou un produit chimique constituant le centre d'intérêt d'une procédure d'analyse chimique.

Exemples de techniques de séparation :

Extraction : Partition de l'analyte entre deux phases liquides non miscibles ou entre phase liquide et phase solide.

Distillation : Partition de la substance entre phase liquide et phase gazeuse.

Sublimation : Partition entre phase solide et phase gazeuse.

Cristallisation : Partition de la substance entre phase liquide et phase cristalline.

Chromatographie : Partition de l'analyte entre la phase stationnaire et la phase mobile.

La chromatographie est une technique dans laquelle les constituants d'un mélange homogène se séparent en fonction des vitesses auxquelles ils sont entraînés à travers une phase dite stationnaire par une phase dite mobile.

I.3 Terminologie générale de la chromatographie :

Phase stationnaire : c'est une phase qui reste en place (immobile) soit dans une colonne soit sur une surface plane.

Support: Un substrat inerte qui porte la phase stationnaire

Phase mobile : c'est une phase qui se déplace à travers la phase stationnaire entraînant l'analyte avec elle.

L'élution est un processus au cours duquel les analytes sont entraînés à travers une phase stationnaire par le mouvement d'une phase mobile.

Remplissage: l'ensemble des produits (adsorbant, support + phase stationnaire, etc...) qui garnissent une colonne chromatographique.

Colonne chromatographique: tube de diamètre et longueur variable, en verre, métal, ou autre substance, à l'intérieur duquel s'opèrent les séparations chromatographiques.

Chromatogramme : C'est un diagramme montrant l'évolution du signal du détecteur en fonction du temps de l'élution.

L'analyse du chromatogramme permet une analyse qualitative par l'identification des composés (position des pics) et quantitative (aire des pics).

I.4 Objectif analytique :

Il s'agit d'identifier des solutés qualitativement et/ou quantitativement, l'opération se faisant par le seul processus chromatographique, auquel peuvent être associées, en passage direct, d'autres techniques analytiques chimiques ou physico-chimiques destinées à faciliter l'analyse qualitative (on qualifie cela de couplage).

Les quantités analysées doivent être extrêmement minimales afin de ne pas s'écarter des règles d'idéalité de la thermodynamique (le coefficient de partage n'est autre qu'une constante d'équilibre thermodynamique, où les activités intervenant ne sont égales aux concentrations que si elles sont très faibles. Les systèmes de détection devront donc être très sensibles.

I.5 Principe de la chromatographie :

Soient deux composés chimiques A et B tels que le composé A possède une grande affinité pour la phase mobile et que le composé B a une grande affinité pour la phase stationnaire, le composé A aura tendance à être élué plus rapidement. Le temps de rétention du composé A sera alors plus petit que celui du composé B.

Cette différence d'affinité pour les deux phases est le principe de base de la chromatographie dans laquelle la partition d'un analyte entre la phase stationnaire et la phase mobile est en fonction des propriétés physico-chimiques des molécules comme :

- Polarité
- Volatilité
- Solubilité
- Hydrophobe / Hydrophile
- Acide/Base

Comme l'extraction la chromatographie est une méthode basée sur la différence de solvation S d'un soluté entre deux phases (Figure I.1).

- 1- Une phase mobile (pm) qui est un fluide qui traverse la colonne.
- 2- Une phase stationnaire (ps) qui est une substance fixée sur la colonne.

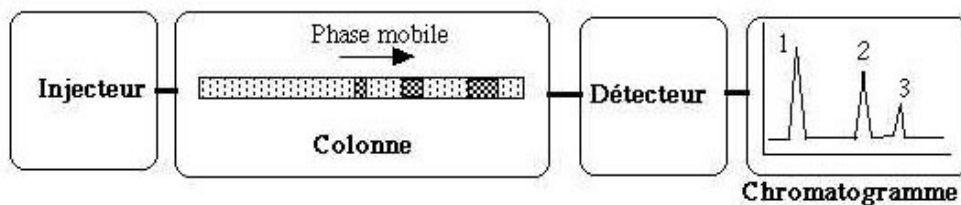
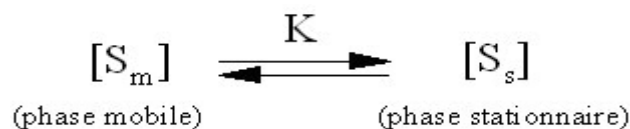


Figure I.1 : Schéma simplifié de la chromatographie

On a toujours $[S_m] \ll [S_s]$, d'où $K \gg 1$ suivant la valeur de K le produit sera plus ou moins retenu sur la colonne, il sera "élué" plus ou moins rapidement. Les répartitions différentes des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire viennent d'adsorptions différenciées des produits. A l'origine de ces phénomènes d'adsorption, il a des paramètres physiques (taille des particules, porosité, surface spécifique...) et des paramètres chimiques (interactions intermoléculaires comme les liaisons hydrogène, liaisons de Van der Waals...).



I.6 Classification des méthodes chromatographiques :

Les méthodes chromatographiques peuvent être classées selon trois façons :

- Selon l'état physique des phases
- Selon le support de la chromatographie
- Selon le mécanisme de rétention mis en jeu.

1.6.1 Classification selon la nature des phases :

A- Selon la nature physique de la phase stationnaire, on distingue :

- La chromatographie liquide /solide (CLS)

Phase normale :

pm = solvant peu polaire (pentane, acétate d'éthyle, éther, chlorométhane...méthanol)

ps = gel de silice ou d'alumine.

Les interactions sont des interactions électrostatiques du type dipôle-dipôle ou dipôle-dipôle induit (Si-O-Si-O-H ----- X)

Les solutés sont élués dans l'ordre de polarité croissante (par exemple carbure, puis cétone enfin alcool)

- La chromatographie liquide/liquide (CLL)

Phase inverse

pm = solvants polaires (eau- méthanol - acétonitrile)

ps = liquide greffé sur un gel de silice, on peut greffer de longues chaînes

aliphatiques pour obtenir par exemple le motif Si-O-Si-O-C₁₇H₃₄-CH₃, (ps C18)

ou des chaînes avec des substituants aromatiques. La phase stationnaire est dans ce cas assimilée à un liquide immobilisé sur la colonne.

Les interactions sont des interactions du type lipidique (interactions avec de longues chaînes hydrocarbonées)

A l'inverse de la chromatographie solide-liquide, les solutés sont élués dans l'ordre de polarité décroissante (par exemple alcool, puis cétone enfin carbure) ,

- La chromatographie gaz/solide (CGS)
- La chromatographie gaz/liquide (CGL)

B- Selon la nature physique de la phase mobile, on distingue :

- **La chromatographie en phase liquide**

La chromatographie en phase liquide (LC), où la phase mobile est un liquide), c'est la chromatographie la plus ancienne (Figure I.2).

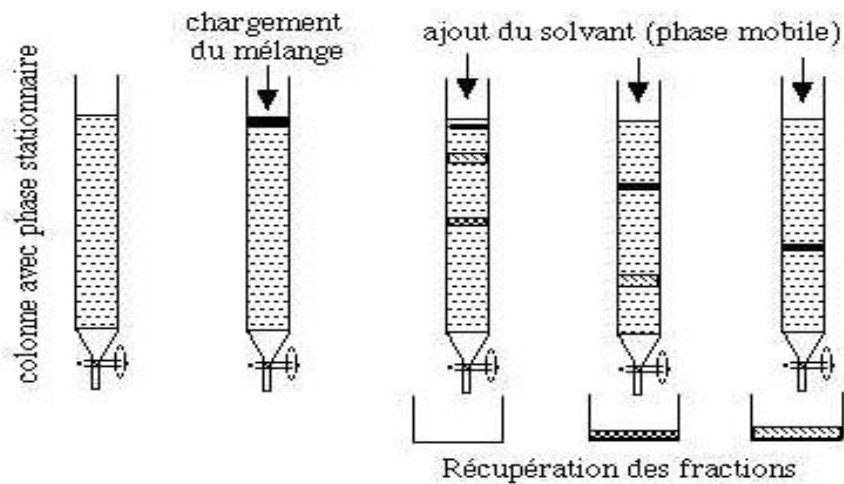


Figure I.2 : Schéma simplifié d'une chromatographie en phase liquide

La Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP ou HPLC en anglais) est une amélioration de la chromatographie en phase liquide, dans laquelle la phase mobile est utilisée sous haute pression. L'utilisation de la haute pression améliore l'efficacité des séparations et réduit fortement les temps d'analyse (Figure I.3).

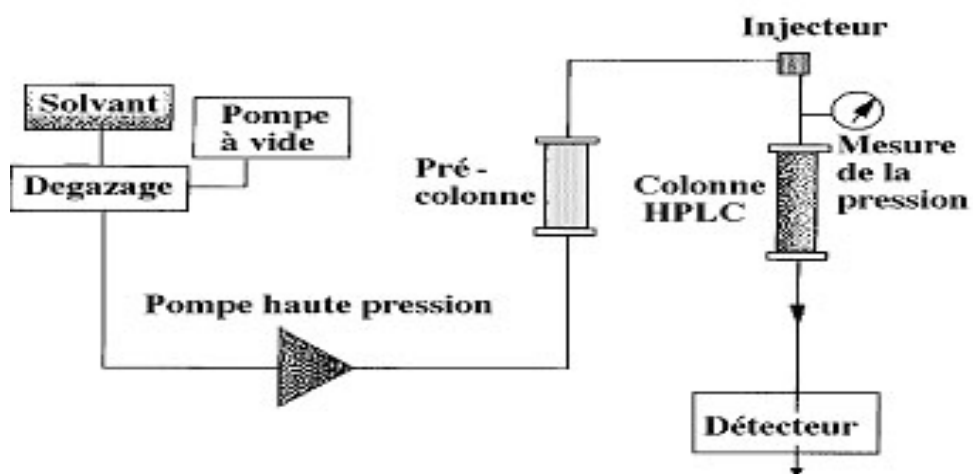


Figure I.3 : Schéma simplifié d'un chromatographe HPLC

- **La chromatographie en phase gazeuse**

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) (gas chromatography, GC, en anglais) est une technique de séparation d'un mélange de molécules volatiles, appelées ici « analytes ». Cette technique a été développée par A.J.P MARTIN et R.L.M. SYNGE, récipiendaires du Prix Nobel de chimie 1952 pour l'invention de la chromatographie de partage.

La technique CPG est utilisée dans des domaines très variés, tels que la parfumerie, l'œnologie, l'industrie pétrolière, la biologie, la chimie fine et l'industrie des matières plastiques.

La CPG repose sur l'équilibre de partage des analytes entre une phase stationnaire et une phase mobile gazeuse. La séparation des analytes repose sur la différence d'affinité de ces composés pour la phase mobile et pour la phase stationnaire.

Le mélange à analyser est vaporisé puis transporté à travers une colonne renfermant une substance liquide ou solide qui constitue la phase stationnaire. Le transport se fait à l'aide d'un gaz inerte, appelé « gaz vecteur », qui constitue la phase mobile.

Le gaz vecteur est le gaz qui circule à l'intérieur du chromatographe, entraînant les analytes à travers la colonne, depuis l'injecteur jusqu'au détecteur. Son choix dépend du type de détecteur utilisé ; cela peut être par exemple de l'hélium, de l'azote, de l'argon ou de l'hydrogène.

Le débit de ce gaz vecteur est de l'ordre de 30 à 40 mL/min pour les colonnes remplies et de 0,2 à 2 mL/min pour les colonnes capillaires (voir plus loin pour la description des deux types de colonne).

Le débit du gaz vecteur influe sur le pouvoir de résolution du chromatographe. Deux phénomènes, la diffusion longitudinale et la résistance au transfert de masse entre les phases mobile et stationnaire, ont des effets opposés sur le pouvoir de résolution de la colonne. L'opérateur choisit donc une valeur du débit afin d'optimiser le pouvoir de résolution du chromatographe.

I.6.2 Selon le support de la chromatographie :

Pour ce type de classification, on distingue :

- La chromatographie de surface (chromatographie sur couche mince CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique de chromatographie planaire dont la phase mobile est liquide. Elle est couramment utilisée pour séparer des composants dans un but d'analyse (CCM analytique) ou de purification (CCM préparative).

- La chromatographie sur colonne.

La chromatographie sur colonne est basée sur le même principe que la chromatographie sur couche mince, sauf que la phase stationnaire (la silice par exemple) ne se trouve pas sur une plaque mais dans une colonne. Cette technique est très utilisée dans la purification en chimie organique. La séparation des composés est provoquée par l'écoulement continu

d'un éluant passant dans la colonne par gravité ou sous l'effet d'une faible pression. Les composés sont entraînés par l'éluant à des vitesses différentes en fonction de leurs affinités avec la phase stationnaire et avec l'éluant. Ce procédé permet de séparer les différents composants d'un produit mais aussi de purifier le produit d'une réaction.

I.6.3 Classification selon le mécanisme de rétention mis en jeu :

a- Chromatographie de partage :

C'est une chromatographie liquide/liquide (CLL), dans ce cas la phase stationnaire est un liquide immobilisé sur un support solide inerte (solide poreux imprégné de liquide ou greffé).

b- Chromatographie d'adsorption :

Elle est aussi dite chromatographie liquide/solide. Dans ce cas, la phase stationnaire est un adsorbant solide polaire (silice, alumine ,,,,,). L'analyte adhère sur la phase stationnaire par physisorption ou chimisorption.

Remarque : la phase stationnaire peut être modifiée pour être apolaire, on parle dans ce cas d'une chromatographie d'adsorption en phase inverse.

c- Chromatographie par échange d'ions ou chromatographie ionique :

Dans ce cas, la phase stationnaire est une résine échangeuse d'ions (polymère porteur de groupements ionisés négativement pour séparer les cations et positivement pour séparer les anions).

d- Chromatographie d'exclusion :

Pour la Chromatographie d'exclusion, la phase stationnaire est un solide poreux. Les grosses particules sont exclues de la phase fixe, les petites particules diffusent dans les pores et sont donc retardées.

e- Chromatographie d'affinité :

La phase stationnaire est, dans ce cas, un substrat inerte sur lequel est greffé un « effecteur » qui présente une affinité pour un soluté de l'échantillon à analyser (affinité enzyme-substrat, ligand récepteur, antigène-anticorps).

I.7 Choix de la technique chromatographique:

Le choix de la technique chromatographique dépend principalement de deux facteurs :

- De la nature du soluté : gaz, liquide volatil ou peu volatil, espèce organique, polaire, ionique, ...etc.
- Du but d'analyse :

-Identification de composants d'un mélange.

-Nécessité ou non de coupler la chromatographie avec une méthode spectroscopique d'analyse.

L'existence de structures particulières dans la molécule exige l'utilisation de la chromatographie d'affinité. La chromatographie en phase gazeuse convient aux molécules gazeuses ou volatilisables.

Chapitre II

Types de techniques chromatographiques

Introduction :

Les différents principes des techniques chromatographiques résultent du fait que l'on a privilégié un des paramètres cités dans le tableau II.1 afin de séparer des composés constituant un mélange.

Tableau II.1 : Types de techniques chromatographiques

Technique chromatographique	Paramètre
Chromatographie d'adsorption	Polarité
Chromatographie de partage	Solubilité dans solvant liquide
Chromatographie d'échange d'ions	Charge électrique
Chromatographie d'exclusion	Taille et forme
Chromatographie d'affinité	Groupements d'atomes formant des sites particuliers
Chromatographie chirale	Greffage de molécules chirales sur la phase stationnaire

II.1 Chromatographie d'adsorption :

II.1.1 Définition :

La chromatographie d'adsorption est une technique de chromatographie qui permet de séparer les constituants d'un mélange par entraînement d'analytes au moyen d'une phase mobile qui peut être liquide ou gazeuse le long d'une phase stationnaire fixe, c'est-à-dire un solide ou un liquide fixé sur un support. Plus les analytes ont une forte affinité avec la phase mobile, plus il y aura d'entraînement. L'adsorption fait appel à des liaisons de faible énergie (liaisons hydrogène, Van-der-Waals, liaisons secondaires). L'adsorbant le plus utilisé est le gel de silice.

II.1.2 Principe :

La chromatographie d'adsorption est une chromatographie avec une phase stationnaire solide avec des propriétés adsorbantes et une phase mobile liquide (mélange de solvants possible). La séparation repose sur la répartition des solutés selon la force d'élution de la phase mobile et la force d'adsorption de la phase stationnaire. L'équilibre qui en résulte provoque une migration différentielle des solutés de composant l'échantillon à analyser.

II.1.3 Polarité des solutés :

La rétention des solutés sur la phase stationnaire dépend des polarités des solutés, de la phase stationnaire et de la phase mobile.

Soluté apolaire : soluté qui n'a aucune charge positive ou négative (exemple de l'hexane $H_3C-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$).

Soluté polaire : soluté chargé. Les molécules polaires s'attirent les unes les autres en présentant à leur voisine leurs pôles électriquement opposés. Exemples : L'eau est le solvant le plus polaire : l'atome d'oxygène attire à lui l'électron de chacun des deux atomes d'hydrogène qui lui sont liés. Le 2- propoxyéthanol (molécule moyennement polaire) : $H_3C-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-OH$. La chaîne carbonée à gauche de l'atome d'oxygène est apolaire, l'atome d'oxygène forme un pont polaire et la fonction alcool (OH) est polaire.

II.1.4 Phases stationnaires ou adsorbants :

Les propriétés communes de ces adsorbants sont :


- Insolubilité dans la phase mobile
- Les adsorbants sont inertes chimiquement vis-à-vis des solutés et de la phase mobile
- Grande surface d'échange pour favoriser la séparation de solutés qui migrent presque à la même vitesse
- Pouvoir adsorbant important.

II.1.5 Nature des adsorbants :

Il existe deux types d'adsorbants :

- a- Adsorbants minéraux (polaires): silice (SiO_2), alumine (Al_2O_3, nH_2O), carbonate de calcium ($CaCO_3$), carbonate de magnésium ($MgCO_3$), oxyde de magnésium (MgO),...
- b- Adsorbants organiques (peu polaires) : cellulose, amidon (et autres oses), Kieselguhr (tests (carapace) de diatomées broyés),...


Tableau II.2 : Adsorbants utilisés en chromatographie

Papier, cellulose Terre de diatomées, Kieselguhr Amidon Sucres Talc Carbonate de sodium Oxyde de magnésium Gel de silice Alumine Charbon activé	 <p>Forces d'interactions croissantes avec les composés polaires</p>
--	---

II.1.6 Nature de la phase mobile :

Les solvants ou éluants sont classés selon leur polarité dans l'ordre croissant (série éluotrope) suivant le tableau ci-dessous :

Tableau II.3 : Série éluotrope des solvants

Ether de pétrole	
Cyclohexane	
Tétrachlorométhane	
Trichlorométhane	
Toluène	
Benzène	
Dichlorométhane	
Ether diéthylique	
Ethanoate d'éthyle	
Pyridine	
Propanone	
Ethanol	
Méthanol	
Eau	
Acide ethanoïque	

Pouvoir éluant croissant

II.1.7 Interactions entre phase mobile, stationnaire et les solutés :

Puisque la chromatographie d'adsorption dépend des interactions avec la polarité des phases et des solutés, il est important de trouver des produits avec un compromis entre les trois sources d'interactions.

Exemple de produits pour une CCM (Chromatographie sur couche mince) :

PS : gel de silice

PM : cyclohexane + dichlorométhane

solutés (du plus au moins retenu) : alcool benzylique, acétophénone, benzophénone, benzaldéhyde, benzoate d'éthyle, acide benzoïque.

II.1.8 Applications :

Chromatographie sur couche mince CCM : Le gel adsorbant (cellulose, silice) coulé sur une plaque (verre, aluminium, plastique) mélangé à un liant ("plâtre").

Il y a différents révélateurs (afin de voir la hauteur de migration des substances sur la plaque) pour la CCM, parmi les quels :

- Bleu de molybdène (zinzidane) : taches bleues sur les phospholipides.
- Ninhydrine : taches violettes sur les amines et acides aminés.
- Rhodamine : taches fluorescentes sur les lipides.

Chromatographie sur colonne : Dans cette technique, on utilise un gel adsorbant sur une colonne ouverte ou fermée en Chromatographie en phase gazeuse ou en Chromatographie en phase liquide à haute performance.

II.2 Chromatographie de partage :

II.2.1 Introduction :

La chromatographie de partage est une méthode de séparation de molécules par chromatographie suivant leur migration/répartition différentielle dans deux phases liquides. La phase stationnaire est liquide et la phase mobile l'est aussi, les liquides doivent donc être non miscibles. En 1952, Martin et Synge reçurent le prix Nobel de chimie pour leur invention de la chromatographie de partage . Le support : c'est le solide poreux qui est imprégné de liquide. Son intervention en tant qu'absorbant est inévitable et parfois même, il peut être dominant sur l'effet de partage. Il est choisi en fonction de critères expérimentaux (épaisseur, texture). Les supports sont très variables : cellulose, gel de silice...

II.2.2 Principe

Actuellement, la chromatographie de partage est largement utilisée en laboratoire, une des phases liquides est remplacée par une phase stationnaire greffée. La phase stationnaire est greffée par des méthodes utilisant la chimie des silanes (liaisons Si-O-Si-C) avec des alkylsilanes. Les longues chaînes alkyl greffées sur la phase solide sont assimilables à une phase liquide, c'est pour cela qu'il s'agit d'une chromatographie de partage. Selon la polarité du greffon, deux méthodes chromatographiques existent (tableau II.4).

Le choix de la phase mobile est important, il se fait en fonction de l'affinité des molécules à séparer (forte ou faible) avec la phase stationnaire, qui rappelons-le est soit polaire ou apolaire. L'élution se fait suivant la séparation désirée par une élution isocratique ou par gradient.

Une élution isocratique est une élution au cours de laquelle la composition de la phase mobile n'est pas modifiée au cours du temps par contre une élution par gradient est une élution au cours de laquelle la composition est modifiée en continu ou par paliers au cours du processus

d'élution. Cela permet de séparer les constituants d'un mélange dont les temps de rétention sont très proches. En d'autres termes, cela permet une meilleure résolution des pics.

Tableau II.4 : Méthodes de chromatographie de partage

Méthode	Phase mobile	Phase stationnaire	Le premier composé élué
Chromatographie de partage à polarité de phase normale	Apolaire	Polaire : amines, nitriles	Le moins polaire
Chromatographie de partage à polarité de phase inverse	Polaire	Apolaire : des chaînes alkyles en général de 16 à 18 carbones	Le plus polaire

La chromatographie de partage est à présent la plus utilisée avec les techniques de chromatographie en phase liquide à haute performance.

Un soluté très soluble dans la phase fixe migrera lentement, ceci est dû à la force de rétention. À l'inverse, un soluté peu soluble dans la phase fixe migrera plus vite, ceci est dû à la force d'entraînement.

II.2.3 Configuration physique du système :

La chromatographie de partage liquide-liquide peut être réalisée :

A-Sur colonne:

La colonne est remplie d'un support imprégné d'un solvant fixe. Le tout constitue la phase stationnaire. Le support doit absorber suffisamment de solvant fixe pour obtenir une couche épaisse. Cette couche épaisse va exercer son rôle de solvant à l'égard des solutés entraînés par le solvant mobile.

Il est pratiquement impossible dans cette technique d'obtenir des supports totalement inertes,

B-Sur papier:

La chromatographie sur papier est une microtechnique analytique qui permet, à l'aide d'un système de solvant, de séparer, d'identifier et même de doser de petites quantités de substances de l'ordre du millième de milligramme, en les faisant apparaître sous forme de taches colorées. Le mode opératoire consiste à mettre un dépôt sur une feuille de papier (membrane de cellulose) qui est introduite, par la suite, dans une cuve (dite "sandwich")

contenant la phase fixe, celle-ci est le plus souvent aqueuse. La cellulose du papier très hydrophile se sature en eau, ce qui constitue la phase fixe. La phase mobile est introduite dans l'augette située sur la partie supérieure de la cuve. La phase mobile migre par capillarité, la séparation des solutés se fait par partage entre les deux solvants.

II.2.4 Applications

La chromatographie de partage possède une diversité d'applications principalement la séparation des éléments d'une solution liquide en fonction de son affinité avec une autre phase liquide (interactions polaires), séparation des alcools d'un parfum, séparation des hydrocarbures d'un pétrole, d'une huile...

On retrouve surtout ce type d'extraction au niveau des molécules de produits naturels pour cette technique. Cet aspect est aussi utilisé afin de séparer des molécules d'une matrice biologique. Actuellement, la chromatographie de partage ainsi que celle en phase liquide à haute performance font partie des techniques chromatographiques les plus utilisées.

II.3 Chromatographie par échange d'ions :

II.3.1 Introduction :

La chromatographie par échange d'ions (IC, Ion-exchange Chromatography), souvent appelée chromatographie ionique, désigne l'identification des ions à l'aide de résines échangeuses d'ions. Cette technique appartient aux méthodes chromatographiques qui sont largement utilisées dans tous les domaines de l'analyse chimique pour leur souplesse d'utilisation et la diversité de leurs applications. La chromatographie par échange d'ions sépare les molécules selon leurs groupes chargés respectifs. Les ions de l'analyte subissent des interactions ioniques avec des charges opposées fixées sur la phase stationnaire, ce qui entraîne leur rétention. La phase stationnaire en question est constituée d'une matrice immobile qui contient des groupes fonctionnels chargés. Le développement de la technique a commencé au milieu des années 1970, lorsque l'on a découvert que des mélanges d'anions et de cations pouvaient être séparés à l'aide de colonnes CLHP (Chromatographie en phase liquide à haute performance) constituées de résines échangeuses de cations ou d'anions. A cette époque, la détection des ions était en général effectuée par des dosages conductimétriques.

II.3.2 Historique

- Fin des années 1960 : Début du développement de la chromatographie ionique et application à la séparation des espèces ioniques retardée par manque d'une technique générale et sensible.

- 1975 : La chromatographie ionique a été introduite par Small, Stevens et Bauman comme nouvelle méthode analytique. Elle évoluait rapidement dans sa détection pour aller vers une détection plus sensible des ions par leur conductance électrique. Une colonne dite suppresseur réduit chimiquement la conductance de l'éluant.

- En 1979, Fritz et al. ont décrit une séparation et une détection alternative à celle de la cellule de conductivité classique. Le principe est d'utiliser des résines échangeuses d'ions de faible capacité et des éluants à faibles teneur en ions (permettant une conductance faible). Des techniques chromatographiques ioniques ont été utilisées, par la suite, pour analyser les ions organiques pour la première fois .

- En 1983 : Développement d'un détecteur ampérométrique pulsé permettant une détection très sensible des hydrates de carbone, des acides aminés et des composés soufrés divalents. Dans le début des années 1990, des colonnes avec des sélectivités spéciales ont été développées.

II.3.3 Principe :

Le principe de la chromatographie ionique est basé sur les propriétés des résines échangeuses d'ions qui permettent une fixation sélective des anions ou des cations présents dans une solution. Sur la résine échangeuse d'ions conditionnée sous forme d'une colonne chromatographie circule en permanence un éluant. La solution à analyser est injectée et les ions sont fixés sélectivement sur la colonne. Les ions sont ensuite progressivement décrochés en fonction de leur taille, leur charge et leur degré d'hydratation. Chaque espèce ionique est séparée et est détectée par conductimètre à la sortie de la colonne. La concentration de l'espèce dans la solution est directement proportionnelle à la conductivité. Des colonnes différentes sont utilisées pour analyser les anions et cations.

II.3.4 Matériel et montage :

Pour effectuer une séparation, l'éluant est tout d'abord pompé seul à travers le système jusqu'à ce que la ligne de base apparaisse stable à l'écran (quelques minutes à quelques heures selon le type de résine et d'éluant utilisé) . L'échantillon est ensuite introduit, soit manuellement soit avec un échantillonneur automatique, dans une boucle d'injection de volume connu . Une solution aqueuse tamponnée, appelée phase mobile, emmène l'échantillon de la boucle vers la colonne . Celle-ci est composée d'une phase stationnaire constituée d'une résine contenant des groupes fonctionnels chargés . Les analytes cibles (anions ou cations) sont retenus sur la phase stationnaire, mais peuvent être détachés de celle-

ci en ajoutant une espèce de charge similaire dans l'éluant. Par exemple, dans la chromatographie d'échange cationique, l'analyte chargé positivement peut être déplacé en ajoutant des cations sodium (éluant). Les analytes cibles doivent alors être détectés par différents moyens, typiquement par la conductivité ou par absorbance UV / visible.

La figure ci-dessous schématise le montage de la chromatographie ionique.

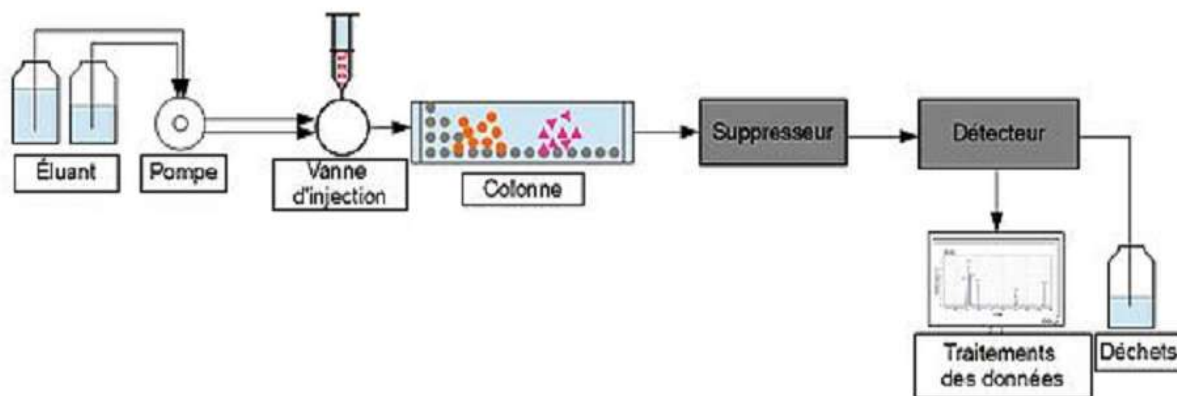


Figure II.1 : Schéma du montage de la chromatographie d'échange ionique

Tout appareil de chromatographie ionique comporte les éléments suivants :

a- Une pompe :

Le but de la pompe est de délivrer l'éluant dans la colonne à un débit fixe, qui est généralement de 1mL/min . Pour provoquer l'aspiration, le piston est retiré de la tête de pompe. Ensuite, ce même piston retourne dans celle-ci. L'augmentation de pression permettra alors d'ouvrir la soupape de sortie, forçant l'éluant à s'écouler vers la soupape d'injection puis à travers la colonne . Il est primordial de purger la pompe afin d'éviter que de l'air ne rentre dans celle-ci et ne cause sa défaillance .

b- Un injecteur :

L'injecteur permet d'introduire l'échantillon dans le chromatographe. Le système d'injection peut être manuel ou automatisé, mais tous deux reposent sur une soupape d'injection. Celle-ci est conçue pour introduire l'échantillon dans la boucle d'injection . La variation de volume est généralement inférieure à 0,5 % de précision d'une injection à une autre . La boucle peut être partiellement remplie (injection de boucle partielle) ou complètement remplie (injection de boucle complète). Si une injection en boucle partielle est utilisée, la boucle ne doit pas être remplie à plus de 50 % de son volume total sinon l'injection pourrait ne pas être précise. Dans l'injection de boucle complète, l'échantillon est poussé

complètement à travers la boucle . La taille de la boucle est comprise entre 5 et 200 μL . Normalement, on utilise au moins le double du volume d'échantillon voulu pour remplir la boucle afin de s'assurer que celle-ci soit bien pleine. L'excès d'échantillon part ensuite au déchet . L'injection de l'échantillon est réalisée en tournant la soupape ce qui entraîne le contenu de la boucle d'injection dans le courant d'éluant . Les vannes d'injection nécessitent un entretien périodique et doivent généralement être entretenues après environ 5 000 injections .

c- Une colonne :

Les anions sont séparés dans une colonne composée d'une résine échangeuse d'anions. De même, les cations sont séparés dans une colonne contenant une résine échangeuse de cations. Les principes de séparation des anions et des cations sont décrits dans le principe. La séparation est basée sur les différences dans l'équilibre d'échange des différents ions analytes avec la résine . Ainsi, si l'ion analyte A1- a une affinité inférieure pour la résine à celle de l'ion A2-, alors A1- se déplacera à un rythme plus rapide à travers la colonne .

d- Une résine :

Les échangeurs d'anions peuvent être constitués de polymères tels que du polystyrène, de l'éthylvinylbenzène ou du méthacrylate copolymérisés avec le divinylbenzène ou de silice fonctionnalisés avec des groupes échangeurs d'ions. Bien que de nombreux types d'échangeurs d'anions soient disponibles pour la chromatographie, le type "base forte" avec des groupes fonctionnels d'ammonium quaternaire est le plus courant. Les contre-ions sont principalement des groupes chlorure . Les groupes ammonium quaternaire sont chimiquement liés aux résines tandis que les groupes chlorure sont capables de subir un échange d'ions avec d'autres anions . Un échangeur de cations sera généralement fonctionnalisé avec des groupes chargés négativement tels que des groupes sulfonates, carboxylates ou phosphonates.

e- Un détecteur et un supprimeur :

Le détecteur le plus courant et le plus utilisé pour la chromatographie ionique est le détecteur de conductivité. Cependant, les détecteurs spectrophotométriques et autres (UV/vis, fluorescence, ampérométrie...) peuvent également être très utiles .

f- Un système DATA pour l'interprétation des résultats :

Les résultats de la séparation chromatographique sont généralement affichés sur un ordinateur. Le chromatogramme obtenu indique le signal en fonction du temps. Les temps de rétention sont utilisés pour confirmer l'identité du pic inconnu par rapport à un étalon. La

surface du pic inconnu est généralement comparée à une droite d'étalonnage préalablement réalisée avec des étalons de concentrations connues.

II.3.5 Applications :

La chromatographie ionique convient pour l'analyse des anions et des cations qu'ils soient inorganiques ou organiques. Le grand nombre d'applications citées ci-dessous illustre la polyvalence de cette méthode. La chromatographie ionique est devenue un outil indispensable pour le chimiste analytique, en particulier dans le domaine de l'analyse anionique. Dans de nombreux cas, cette méthode a remplacé les méthodes chimiques humides conventionnelles telles que la titration, la gravimétrie ou encore la colorimétrie, qui sont toutes laborieuses, fastidieuses et parfois sujettes à des interférences. Dans le domaine de l'analyse des cations, elle est attrayante en raison de sa détection et de sa sensibilité. Elle fournit un complément bienvenu aux méthodes de spectrométrie atomique telles que AAS (Spectroscopie d'absorption atomique) et ICP (spectrométrie à plasma à couplage inductif).

La chromatographie d'échange ionique est très utilisée dans plusieurs applications industrielles parmi les quelles:

- Analyse environnementale (air, sol et eau)
- Industrie des semi-conducteurs
- Galvanoplastie
- Produits pharmaceutiques
- Séparation et purification des composants du sang tels que l'albumine, des facteurs de croissance recombinés et des enzymes.
- Biotechnologie - applications analytiques telles que le contrôle qualité et la surveillance de processus
- Nourriture et recherche clinique - pour étudier des variétés de blé et la corrélation de la protéinurie avec différentes maladies rénales.

II.4 Chromatographie d'exclusion :

II.4.1 Introduction :

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC pour size exclusion chromatography en anglais) est une méthode de chromatographie en phase liquide permettant de séparer des macromolécules en fonction de leur volume hydrodynamique. Elle est notamment utilisée pour faire l'étude de polymères. Suivant la nature des deux phases en présence, elle est encore désignée par chromatographie sur gel perméable (GPC : gel permeation chromatography) ou par filtration sur gel (GFC : gel filtration chromatography).

II.4.2 Principe :

Contrairement aux méthodes de chromatographie d'affinité, le principal phénomène physique permettant la séparation des différentes macromolécules constituant le polymère n'est pas basé sur l'affinité chimique avec le support, mais idéalement sur la taille des macromolécules en solution (leur volume hydrodynamique). En réalité, ces deux mécanismes de séparation sont continuellement en compétition au sein de la colonne; les conditions expérimentales sont alors établies pour minimiser les mécanismes enthalpiques d'affinité au profit de ceux entropiques d'exclusion stérique.

La chromatographie d'exclusion permet alors la séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme. On utilise pour cela des granules de gel poreux. Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclus et sont donc éluées les premières, les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement car incluses dans le gel, leur migration est freinée (Figure II.2).

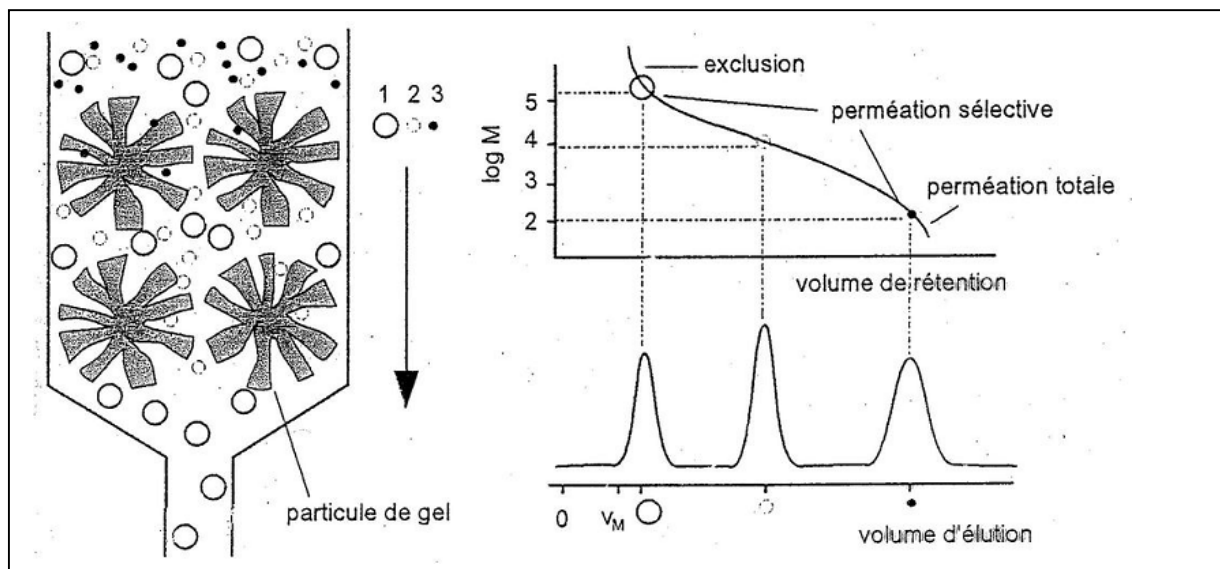


Figure II.2 : Schéma simplifié du principe de la chromatographie d'exclusion

Le chromatogramme, présenté dans la figure II.2, représente la séparation de trois polymères de tailles différentes en solution. Les molécules ayant le plus grand volume hydrodynamique (1) arrivent en tête, suivies des plus petites (2) puis (3).

II.4.3 Appareillage :

L'appareillage de ce type de chromatographie SEC est un appareillage semblable à celui utilisé en HPLC classique et est très largement disponible auprès de nombreux fournisseurs. La SEC est constitué d'un réservoir de solvant, d'un système de pompage, d'un injecteur, d'un jeu de colonnes et de détecteurs disposés en sortie de colonne.

a- Colonne :

Tous les composants de l'appareil de SEC sont reliés par des connexions à faible volume mort et des tubes capillaires (en acier inoxydable ou en plastique) pour minimiser l'élargissement des pics dû à l'appareillage. L'efficacité des colonnes (évaluée en nombre de plateaux théoriques) peut être améliorée en augmentant la température, ce qui réduit aussi la pression dans la colonne.

b- Injecteur :

Le système de pompage est suivi d'un injecteur pour permettre l'introduction des échantillons. Le système le plus utilisé est l'injecteur à boucle qui permet d'injecter, sous haute pression, des quantités très reproductibles. Pour des colonnes classiques (30 cm de long et 7,2 mm de diamètre interne), le volume injecté ne doit pas dépasser 100 μL par colonne pour ne pas détruire les performances de la colonne (évaluée par son nombre de plateaux théoriques).

c- Détecteurs :

Les détecteurs utilisés en CES peuvent être classés en deux groupes :

- les détecteurs qui donnent des résultats proportionnels à la concentration du polymère dans la solution : réfractomètre différentiel, détecteurs par spectroscopie d'absorption et détecteurs de masse volumique.
- les détecteurs qui donnent des résultats proportionnels à la masse molaire moyenne en masse des polymères : viscosimètre, osmomètre continu, détecteurs à diffusion de la lumière.

II.5 Chromatographie d'affinité :

II.5.1 Introduction :

La chromatographie d'affinité est une technique de chromatographie qui permet de séparer un composé en utilisant des interactions biologiques entre un ligand spécifique (greffé sur une matrice macromoléculaire) et son substrat, en l'occurrence la molécule à isoler. Sa principale application industrielle est la purification des anticorps monoclonaux.

11.5.2 Principe :

Comme toutes les chromatographies, la chromatographie d'affinité permet de séparer les composants d'un mélange, donc de purifier les substances. Pour cela, elle utilise les propriétés d'interactions biologiques, donc elle peut purifier un composant en une seule étape. Une matrice insoluble à laquelle est attaché un ligand spécifique de la molécule à purifier et

se liant de manière réversible avec celle-ci est utilisée. Molécule à purifier + ligand spécifique-matrice insoluble \leftrightarrow Molécule-ligand-matrice insoluble

II.5.3 Méthodologie générale :

La méthode consiste à coupler le ligand sur une résine à chromatographie qui, en tant que telle, n'a pas d'affinité pour la molécule d'intérêt. Ce couplage doit évidemment se faire sans dénaturer le ligand pour que ce dernier conserve son affinité avec la molécule d'intérêt. Il existe sur le marché des gels de couplage qui sont des résines préparées à l'avance sur lesquelles est couplé le ligand choisi. Ce sont des résines spécialisées destinées uniquement à cet usage. Elles possèdent en général un groupement chimique facilement activable posé au bout d'un bras écarteur. Diverses résines existent avec divers groupements activables selon la nature chimique du ligand qu'on veut utiliser. Ce couplage consiste donc à "activer" la résine pour qu'elle puisse former un lien covalent avec le ligand, puis à mettre le ligand en présence de la résine. Il y a ensuite déclenchement de la réaction de formation d'une liaison covalente entre le ligand et la résine afin d'éviter que celui-ci ne se détache et empêche la fixation de la molécule d'intérêt. Enfin, les réactifs résiduels sont éliminés en percolant le gel avec un tampon approprié.

II.5.4 Méthode sur colonne :

C'est la méthode la plus commune pour adsorber les molécules d'intérêt. Le mélange ainsi que le solvant servant de phase mobile sont introduits dans la colonne de résine à laquelle le ligand spécifique de la molécule a été préalablement fixé. Donc la molécule d'intérêt reste dans la colonne alors que le reste sort par gravité et flux de solvant. Ensuite, la molécule liée à la résine est éluée en percolant un solvant déstabilisant l'interaction ligand-molécule spécifique pour recueillir celle-ci.

La méthode consiste à exposer la résine et le mélange à séparer simplement en les brassant ensemble, par exemple dans un bécher avec un agitateur magnétique, durant une période de temps suffisante pour que l'adsorption complète se fasse. La résine est récupérée, sur laquelle les molécules d'intérêt sont toujours attachées, par simple sédimentation ou, quelquefois, par centrifugation ou filtration pour accélérer le processus. Le "surnageant" ou le "filtrat" contenant le matériel non adsorbé est éliminé, puis la résine est lavée avec le solvant d'adsorption pour enlever les traces résiduelles de contaminants. La molécule d'intérêt peut alors être désorbée, avec un solvant déstabilisant d'interaction ligand-molécule spécifique. Cette méthode n'est quasiment plus utilisée à l'échelle industrielle, car elle est moins efficace

que la colonne et nécessite de manipuler la phase solide. On utilise maintenant la méthode en colonne, désignée par chromatographie préparative.

II.5.5 Types de chromatographie par affinité :

A-Chromatographie d'affinité avec protéine comme ligand :

La chromatographie d'affinité avec la protéine A (et aussi G et L) comme ligand est une application industrielle pour la purification des anticorps monoclonaux. Les anticorps ont des affinités pour les parois cellulaires des bactéries, ce qui est la raison de leur efficacité. On utilise ainsi les protéines A, G et L qui sont des parties de la paroi cellulaire de bactéries *Staphylococcus aureus* et streptocoque. Leur masse molaire est d'environ 50 000 g/mol. Elles ont une forte affinité pour le fragment Fc des anticorps polyclonaux ou monoclonaux type IgG. C'est la base de la purification des IgG: on greffe ces protéines (recombinantes d'E.Coli) sur un support poreux en billes (gel d'agarose ou résine de polystyrène-divinylbenzène), ce qui permet d'obtenir un grand nombre de sites de fixation par unité de volume (et par conséquent de diminuer la taille des installations). La protéine A se lie fortement aux IgG1, 2 et 4. Elle ne se lie pas ou peu aux autres Ig (IgG3, IgA, IgD, IgE, IgM). La protéine G fixe plus de types d'Ig que la protéine A et exclut l'albumine. La protéine L se lie à la partie kappa variable des chaînes légères (L, d'où son nom) des Ig ou de leurs fragments.

B-Chromatographie sur colorant :

Cette technique est aussi appelée chromatographie de pseudo-affinité. Un des colorants utilisés est le bleu de Cibacron. Il a été démontré que des enzymes se fixent sur le bleu de Cibacron, notamment les déshydrogénases à coenzyme NAD⁺ de par la ressemblance structurale avec le NAD⁺. Donc ce colorant se comporte comme un analogue structurel de l'ADP, l'AMP, l'ATP et le GTP, ce qui lui permet de retenir des protéines liant des nucléotides. Mais il n'est pas spécifique d'une protéine ce qui ne fait pas un bon ligand pour séparer des protéines liant les nucléotides.

Donc la chromatographie sur colorant ne permet pas de retenir la molécule d'intérêt, mais les composants que le colorant reconnaît, c'est pourquoi cette technique est qualifiée de pseudo affinité. Cette technique est néanmoins beaucoup utilisée car, même si la molécule d'intérêt n'est pas liée spécifiquement, celle-ci est colorée donc plus pratique à manipuler. Pour séparer la molécule d'intérêt aux autres composants que le colorant reconnaît s'ils sont présents dans le mélange, il faut effectuer une autre chromatographie d'affinité avec un ligand spécifique.

C-Chromatographie covalente :

Cette chromatographie permet de retenir des analytes contenant des groupes thiols en formant des ponts disulfure.

D-Chélation de métaux immobilisés :

La chélation de métaux immobilisés permet de séparer et d'étudier la structure de protéines ayant une affinité pour les ions de métaux lourds.

II.5.6 Les effecteurs :

Les effecteurs sont des ligands qui fixent toutes substances capables de former des complexes stables avec des molécules à isoler. Ces substances doivent posséder un groupement réactif assez éloigné du site actif pour que celui-ci reste librement accessible après la fixation.

En immunologie, les haptènes, les anticorps et les antigènes sont les mieux adaptés. Et, enfin, pour les protéines réceptrices, des hormones, des peptides et des analogues de peptides sont utilisés.

II.5.7 Supports :

Les propriétés d'un support sont les suivantes:

- d-** être insoluble dans l'eau mais mouillable ;
- e-** être poreux ;
- f-** être stable chimiquement et mécaniquement ;
- g-** porter un groupement fonctionnel réactif permettant la fixation des « spacer » (bras fixateur) ;

Il y a différentes sortes de supports à partir de dérivés de polymères osidiques :

la carboxyméthylcellulose : dans ce dérivé plusieurs sortes de carboxyméthylcelluloses comme la CM-cellulose aminohexylique possèdent un « spacer » (bras espaceur) long permettant d'avoir une certaine distance entre le ligand et le support ce qui réduit la contrainte stérique et facilite la réaction de complexation. Puis, à l'inverse, la CM-cellulose hydrazide qui possède un « spacer » court permettant la fixation d'effecteur ayant une masse molaire élevée. Ces deux dérivés permettent la fixation d'effecteurs portant une fonction carboxyle.

La CM-aminohexylique succinylée et la CM-cellulose aminododécylrique sont des supports permettant la fixation des effecteurs portant une fonction $-NH_2$ réactive.

- les sépharoses activées
- le gel de polyacrylamides.

II.5.8 Facteurs influençant la complexation ligand/molécule d'intérêt :

Le tampon additionné de substance où le gel est mis en suspension permet de protéger la liaison entre le ligand et le support. La dimension de la colonne et le volume du lit de gel sont adaptés à la quantité d'échantillon à traiter et à la capacité de rétention du gel. Le tampon a un pH, une force ionique et une composition définis pour pouvoir réaliser la réaction de complexation.

En effet le pH est choisi de façon qu'il n'y ait pas de dénaturation de la protéine et que la stabilité du complexe entre effecteur et partenaire soit au maximum. De plus, le pH et la force ionique sont aussi prédéfinis pour éviter une interaction entre le support et les partenaires d'affinités. La température quant à elle, joue un rôle dans la durée de la complexation ; plus la température est basse, plus le temps de complexation sera long.

II.5.9 Applications :

La chromatographie d'affinité est très puissante par sa sélectivité importante, mais souvent plus onéreuse à mettre en œuvre que d'autres types de chromatographie. Par ailleurs, elle n'est pas adaptée à la purification de grandes quantités de molécules. En effet, la capacité est fonction du nombre de sites disponibles sur la résine : lorsque ceux-ci sont saturés, les molécules en surnombre ne seront pas purifiées.

La technique chromatographique d'affinité est utilisée principalement dans les domaines suivants :

- h- en enzymologie, pour l'extraction d'enzymes et la purification d'extraits enzymatiques
- i- en immunologie, pour la purification d'anticorps ;
- j- en biochimie, pour l'isolement des protéines et des acides nucléiques.

II.6 Chromatographie chirale :

II.6.1 Introduction

La chromatographie chirale ou chromatographie énantiosélective est une technique de chromatographie qui consiste en la formation de liaisons non covalentes entre les énantiomères du substrat et l'absorbant chromatographique chiral donnant des complexes diastéréoisomères ayant des affinités de liaisons différentes.

On ne peut parler d'énantiomères sans évoquer la chiralité qui caractérise le monde vivant. Deux molécules sont dites chirales si, tout comme deux mains, elles sont images l'une de l'autre dans un miroir, tout en n'étant pas superposables. Elles ont la même structure chimique mais des activités optiques différentes. Les deux formes, notées R et S, sont dites

isomères optiques ou énantiomères. La séparation de celles-ci est possible notamment grâce à la chromatographie chirale.

II.6.2 Principe

Dans le cas d'une chromatographie chirale, la phase stationnaire est généralement composée de gel de silice, comme la plupart des phases stationnaires, sur lequel sont greffées des molécules chirales, qui peuvent souvent former des complexes d'inclusion, telles que les cyclodextrines, dû au caractère hydrophobe de leurs cavités. La théorie thermodynamique est une des théories élaborée pour expliquer le mécanisme de la chromatographie. Pour une bonne séparation, il faut une colonne efficace (dépendant du nombre de plateaux théoriques), c'est-à-dire capable de donner des pics étroits, et une bonne résolution, c'est-à-dire une bonne séparation des deux pics sur le chromatogramme, correspondant aux solutés que l'on veut séparer.

Dans cette technique, le mélange racémique à séparer est introduit et va interagir avec la phase stationnaire chirale (PSC). L'obtention de la séparation des énantiomères passe par la formation réversible de complexes diastéréoisomères dans la colonne de chromatographie. La formation réversible des complexes diastéréoisomères dans la colonne de chromatographie peut se faire de cinq façons principales.

Les forces dans les interactions chirales ne sont pas nécessairement des forces d'attraction; elles peuvent être répulsives aussi. La première façon de former ces complexes est par les interactions dipôles-dipôles présents au sein de la phase stationnaire et de la phase mobile, aussi appelée liaison de Van der Waals. Ces complexes peuvent également se former par pont hydrogène ou par interaction π - π entre les deux phases de la colonne. Ensuite, les complexes peuvent se former par un composé d'inclusion. C'est-à-dire un complexe dont l'un des composants, appelé l'hôte, forme une cavité dans laquelle un second composé, appelé l'invité, va s'y loger.

Finalement, les complexes diastéréoisomère peuvent se faire par encombrement stérique ou ionique . Si deux énantiomères possèdent les mêmes propriétés physiques et si la phase stationnaire est achirale, les deux énantiomères du mélange racémique vont migrer à la même vitesse, donc aucune séparation. C'est pourquoi il est intéressant de former ces complexes diastéréoisomères avec des propriétés physiques différentes; ainsi l'un des isomères sera plus accroché que l'autre et migrera donc plus lentement, permettant leur séparation physique.

D'après la règle des trois points d'interactions, que l'on peut nommer règle de Dalglish et qui se base purement sur la géométrie, pour une bonne séparation, il doit exister trois points d'attache de façon simultanée entre la PSC et un des isomères, avec au moins un des trois dépendant de la stéréochimie. Par contre, il faudrait spécifier que cette règle n'est applicable qu'aux processus bimoléculaires .

II.6.3 Principales techniques de chromatographie chirale

La séparation de deux molécules chirales peut s'effectuer grâce à deux techniques principales :

- A- Si l'échantillon à analyser est gazeux ou susceptible d'être vaporisé, on utilise la chromatographie en phase gazeuse (GC). La *phase stationnaire* est alors un liquide fixé sur un support. L'appareil utilisé est composé de :
 - k- un injecteur qui permet d'introduire l'échantillon qui sera entraîné par un gaz appelé gaz vecteur, le plus souvent de l'hélium ou de l'azote
 - l- un four à température programmable et abritant la colonne capillaire. Celle-ci est un tube enroulé sur lui-même et qui contient la phase stationnaire.
 - m- un détecteur qui permet l'émission d'un signal au passage de chaque composant.

La GC chirale comporte plusieurs avantages. C'est une technique qui offre une haute efficacité avec une grande vitesse de séparation. Plusieurs formats de détecteur sensible, simple et direct sont disponibles. Il existe aussi plusieurs outils de programmation de la température pour y exercer un bon contrôle. Les dispositifs de spectrométrie et spectroscopie peuvent diviser les molécules. Et, finalement, il y a possibilité de faire des opérations multicolonne. À l'inverse, les inconvénients de la GC chirale sont les suivants : l'utilisation de la GC est restreinte par la volatilité des composés et la stabilité thermique de ceux-ci. L'intégrité stéréochimique de ces derniers et la résolubilité du sélecteur chiral à des températures ambiantes et élevées entre également en ligne de compte .

- B- Si l'échantillon est soluble, la méthode appropriée est alors la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). La phase mobile liquide est appelée le solvant d'élution. L'appareil comporte lui aussi un injecteur et un détecteur de mêmes fonctions que pour la GC, mais également :
 - n- des pompes ayant pour rôle d'assurer le débit du solvant d'élution qui doit être constant.
 - o- une colonne le plus souvent en acier mesurant entre 15 et 30 cm de long et de diamètre interne compris entre 5 et 10 mm.

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) possède plusieurs avantages et inconvénients, comme toutes autres techniques. L'HPLC permet d'avoir des résultats rapides, c'est-à-dire avoir une séparation complète en quelques minutes seulement.. Toutefois, c'est une technologie qui coûte cher par rapport à d'autres méthodes, elle demande une bonne formation due à la complexité d'exploitation de l'appareil. Finalement, pour certains composés la sensibilité est trop faible en raison de la rapidité du processus . Le fonctionnement de ces appareils ainsi que la collecte des données sont gérés par système informatique. L'évolution du signal produit par le détecteur est liée à la concentration instantanée du soluté en fonction du temps et est représenté par des pics sur un graphique appelé le chromatogramme. L'analyse de celui-ci permet l'interprétation des séparations réalisées.

II.6.4 Applications

Le domaine médical utilise la chromatographie chirale pour séparer deux énantiomères dont les propriétés peuvent être radicalement différentes, notamment lorsque l'une est curative et l'autre dangereuse. En effet, il est possible de constater cet effet avec la sibutramine. Ce médicament, utilisé dans le traitement de l'obésité, agit en inhibant la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline, ce qui provoque le sentiment de satiété. Or, ce médicament n'a des effets sur ces hormones que lorsqu'il n'y a qu'un des deux énantiomères du produit chimique, ce qui veut dire qu'un mélange racémique, qui contient les deux énantiomères à proportions égales, n'a donc pas les effets escomptés. Il faut donc séparer les deux énantiomères par chromatographie liquide chirale.

Les chercheurs ont donc eu recours à une colonne de type Chiralcel OD comportant un mélange de gel de silice et de 3,5-diméthylphénylcarbamate comme phase stationnaire chirale. Ils utilisèrent aussi un mélange d'hexane, à 93 % v/v, d'éthanol, à 3 % v/v, et d'acide trifluoroacétique à 0.05 % v/v comme phase mobile, en vue de faire une chromatographie liquide en phase inverse, ce qui indique que la phase stationnaire est apolaire et que la phase mobile est polaire. Certaines agro-industries l'utilisent pour sélectionner un composé naturel associé à une odeur d'un arôme, puis le complexent à des cyclodextrines pour améliorer sa tenue.

La chromatographie chirale peut être aussi utilisée pour détecter des pollutions, comme pour l'extraction et l'analyse des matières organiques des fiouls et pétroles issus de dégazages ; les composés cancérigènes (les aromatiques), et les résines pouvant être analysées et séparées par CPG et HPLC; la date de la pollution et la provenance des fiouls sont

déterminables . En écologie, cette technique de chromatographie peut servir à discriminer deux espèces par simple détection de molécules présentes ou non dans l'organisme étudié (ex : la différenciation des poissons sauvages et des poissons d'élevage, grâce, entre autres, à l'étude de l'astaxanthine, détectée par HPLC chirale, pigment caroténoïde issu des crustacés et algues ingérés par l'animal in natura).

Chapitre III

Analyse qualitative en chromatographie

Introduction :

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants présents dans un mélange, elle sert en analyse pour identifier et quantifier des composés au sein d'échantillons divers. Le principe de base de l'aspect analyse qualitative de la chromatographie repose sur la mesure des temps de migration des composés dans la colonne ou le support fixe pour les identifier.

Le principe repose sur les équilibres de concentration qui apparaissent lorsqu'un composé est mis en présence de deux phases (mobile et stationnaire). Si plusieurs composés sont présents, ils se trouvent entraînés à des vitesses différentes provoquant leur séparation et donc par la suite leur identification.

Pour pouvoir comprendre et assimiler la chromatographie comme étant une méthode analytique instrumentale qualitative, il est nécessaire de maîtriser certains paramètres et grandeurs fondamentales qui sont décrits dans ce chapitre.

III.1 Paramètres et grandeurs fondamentales :

III.1.1 Coefficient de distribution :

On caractérise la distribution de chaque soluté entre la phase stationnaire et la phase mobile par un coefficient dit coefficient de partage ou de distribution.

A un instant donné, le soluté est à la concentration C_m dans la phase mobile et C_s dans la phase stationnaire. Leur rapport à l'équilibre est appelé coefficient de partage K

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad \text{(III.1)}$$

III.1.2 Chromatogramme:

Le chromatogramme est un diagramme à deux dimensions présenté, il montre l'évolution d'un paramètre qui dépend de la concentration du soluté en sortie de la colonne en fonction du temps. Le signal du détecteur est en ordonnée et le temps d'élution est en abscisse. La courbe est formée d'autant de pics distincts qu'il ya de composés séparés et détectés en sortie de la colonne. La séparation des composés, du mélange à analyser, est totale quand le chromatogramme présente des pics revenant à la ligne de base (Figure III.1).

Pour définir les grandeurs fondamentales de rétention ainsi que les relations possibles entre elles, on va supposer le cas d'une chromatographie sur colonne en admettant les paramètres suivants :

L , s et r sont respectivement la longueur, la section (surface) et le rayon de la colonne.

D : Débit et v : vitesse linéaire de la phase mobile

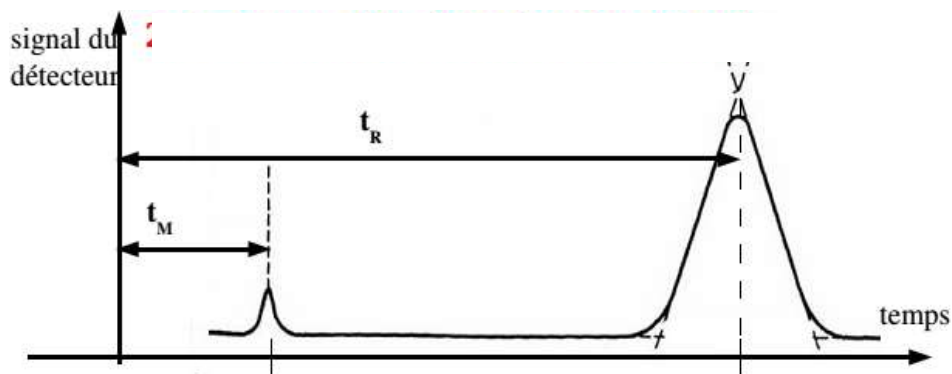


Figure III.1 : Courbe d'élution ou Chromatogramme d'un mélange à deux constituants
 t_r et t_m sont respectivement le temps de rétention et le temps mort.

III.1.3 Grandeurs de rétention :

Les grandeurs fondamentales de rétentions sont les suivantes :

a- Temps de rétention :

Un constituant est caractérisé par son temps de rétention t_r qui représente le temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui qui correspond sur le chromatogramme au maximum du pic qui lui est lié.

b- Temps mort :

C'est le temps de passage de la phase mobile (composé non retenu par la phase stationnaire) dans la colonne. La valeur du temps mort peut être trouvée à partir de la relation suivante :

$$t_m = \frac{L}{v} \quad (\text{III.2})$$

c- Temps de rétention réduit :

La différence entre le temps de rétention et le temps mort est désignée par le temps de rétention réduit du soluté t_r' . En d'autres termes c'est le temps passé par un soluté dans la phase stationnaire.

$$t_r' = t_r - t_m \quad (\text{III.3})$$

d- Volume de rétention :

Le volume de rétention ou d'élution noté V_r de chaque soluté représente le volume de phase mobile nécessaire à son élution d'une extrémité à l'autre de la colonne.

$$V_r = t_r \cdot D \quad (\text{III.4})$$

e- Volume mort :

Le volume mort V_m est le volume disponible pour la phase mobile, Il peut être calculé d'après le chromatogramme, à condition d'introduire un soluté non retenu par la phase stationnaire. On peut l'exprimer en fonction de temps mort t_m et du débit D :

$$V_m = t_m \cdot D \quad \text{(III.5)}$$

f- Volume de la phase stationnaire :

Le volume de la phase stationnaire V_s n'apparaît pas sur le chromatogramme. On le calcule en retranchant du volume total interne de la colonne vide le volume de la phase mobile.

$$V_s = V_t - V_m \quad \text{(III.6)} \quad \text{avec : } V_t = L \cdot s = L \cdot \pi \cdot r^2 \quad \text{(III.7)}$$

III.2 Performances des colonnes chromatographiques :

III.2.1 Facteur de capacité :

Le facteur de capacité k est un paramètre très important en chromatographie, il dépend des conditions opératoires. Le facteur k rend compte de la capacité plus ou moins grande de la colonne à retenir chaque composé. En général, la séparation par chromatographie se fait de telle sorte que la valeur du facteur de capacité k ne dépasse pas 10 afin de ne pas trop allonger le temps de passage des composés.

Le facteur de capacité k est le rapport de la quantité d'un même soluté dans la phase stationnaire (m_s) et dans la phase mobile (m_M).

$$k = m_s / m_M = C_s \cdot V_s / C_M \cdot V_M \quad \text{(III.8)}$$

$$\text{d'où } k = K \cdot V_s / V_M \quad \text{(III.9)}$$

avec :

V_s : volume de la phase stationnaire

V_m : volume de la phase mobile ou volume mort

C_M : Concentration du soluté dans la phase mobile

C_s : Concentration du soluté dans la phase stationnaire

K : Coefficient de distribution

Le facteur de capacité k peut être aussi défini comme le rapport du temps passé par un soluté dans la phase stationnaire sur le temps passé par ce même soluté dans la phase mobile.

Il peut être déterminé expérimentalement en utilisant la relation suivante :

$$k = (t_r - t_m) / t_m \quad \text{(III.10)}$$

Pour un débit D constant, on peut déduire la relation suivante : $k = (V_r - V_m) / V_m$ (III.11)

Le temps de rétention est ainsi lié au facteur de capacité par la relation suivante :

$$t_r = t_m (1 + k) \quad \text{(III.12)}$$

$$\text{d'où : } V_r = V_m (1+k) \quad \text{(III.13)}$$

Déduction de la relation entre le volume de rétention et le coefficient de distribution :

$$k = K \cdot V_s / V_M \quad \text{(III.14)}$$

Des deux relations (III.13) et (III.14), on déduit que : $V_r = V_m + K V_s$ (III.15)

III.2.2 Sélectivité d'une colonne :

Pour caractériser la distance séparant les sommets de deux pics chromatographiques consécutifs 1 et 2, on utilise le facteur de sélectivité (ou rétention relative) défini par la relation suivante:

$$\alpha = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0} = \frac{K_2}{K_1} \quad \text{(III.16)}$$

où K_1 et K_2 sont les coefficients de partage des solutés 1 et 2 entre les phases stationnaire et mobile.

Le facteur de sélectivité mesure la différence de distribution thermodynamique des deux composés.

On démontre que si $\Delta(\Delta G^\circ) = \Delta G^\circ_2 - \Delta G^\circ_1$ (différence des énergies libres de distribution des deux composés) on a : $\Delta(\Delta G^\circ) = -RT \ln \alpha$ (III.17)

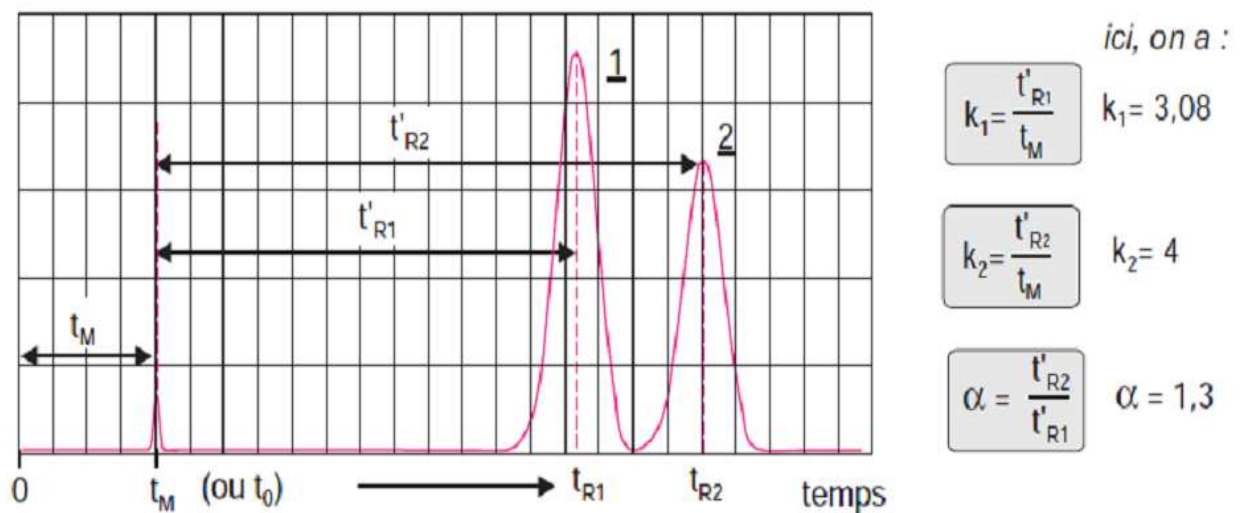


Figure III.2 : Pics chromatographiques consécutifs de deux composés

III.2.3 Efficacité d'une colonne chromatographique

L'efficacité d'une colonne chromatographique, dont dépend l'étalement des pics, est exprimée pour chaque composé par le nombre de plateaux théoriques N de la colonne. Ce modèle permet de décrire le fonctionnement d'une colonne chromatographique comme celui d'une colonne à distiller.

L'efficacité de la colonne est utilisée pour comparer la performance de différentes colonnes. Les colonnes chromatographiques ayant un nombre élevé de plateaux théoriques sont plus efficaces. La largeur d'un pic chromatographique est caractéristique de l'efficacité de la séparation, plus le pic est fin plus la chromatographie est efficace.

Le modèle des plateaux théoriques suppose qu'une colonne est divisée en N petits disques cylindriques successifs. On admet que la phase mobile progresse non pas de façon continue, mais par sauts successifs d'un plateau théorique à l'autre. Dans chaque plateau théorique, on observe une rétention du soluté S , du fait de l'équilibre de ce produit entre la phase mobile et la phase stationnaire. Le modèle des plateaux théorique permet de décrire le fonctionnement d'une colonne chromatographique comme celui d'une colonne à distiller.

III.2.3.1 Caractéristiques d'un pic chromatographique et calcul de l'efficacité :

Le pic chromatographique est caractérisé par les dimensions suivantes (Figure III.3):

δ : la largeur à mi hauteur (mesurée à 50% de la hauteur totale)

σ : l'écart type du pic (égal à la demi-largeur du pic à 60.6% de sa hauteur totale)

ω : la largeur de la base du pic mesurée à 13.5% de sa hauteur totale.

Le pic chromatographique est gaussien lorsque $\omega = 4 \sigma$

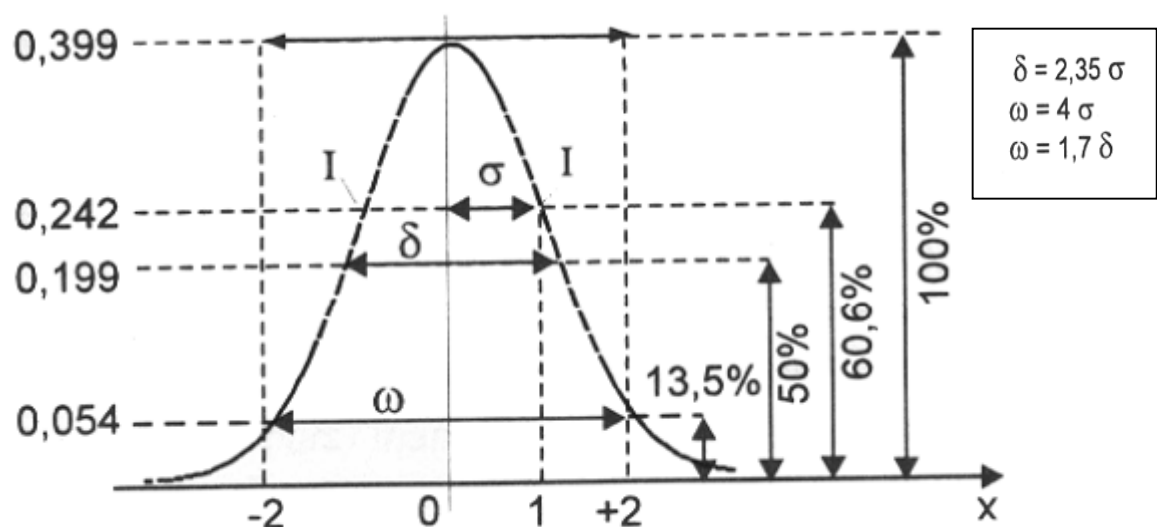


Figure III.3 : Caractéristiques d'un pic idéal chromatographique

Les pics réels sont souvent loin de présenter des pics d'aspect gaussien qui correspondent à des pics chromatographiques idéaux, les principales raisons sont les suivantes :

- Le coefficient de distribution K est rarement constant avec la concentration. Il se produit une irrégularité de concentration dans la zone de dépôt de la substance en tête de la colonne.
- La vitesse d'écoulement de la phase mobile n'est pas constante sur la section, elle est nulle au niveau de la paroi et maximale au centre de la colonne.

Dans cette théorie, les pics d'élution peuvent être assimilés à des courbes de forme Gaussienne dont l'écart type (exprimé en unité de temps) est lié au nombre de plateaux théorique.

$$N = (tr/\sigma)^2 \quad \text{(III.18)}$$

N augmente donc avec le temps de rétention et diminue si la largeur des pics augmente. D'après la relation précédente, une « bonne » colonne de chromatographie est celle qui correspond à des pics fins pour des temps de rétention élevés, elle est donc caractérisée par un nombre de plateaux théoriques N élevé.

Par suite des propriétés de la courbe de Gauss, il en résulte la relation suivante :

$$N = 16 \frac{tr^2}{\omega^2} \quad \text{(III.19)}$$

où ω est la largeur du pic à la base exprimée en unité de temps, déterminée par l'intersection des tangentes au points d'inflexion à la courbe gaussienne et de la ligne de base, Puisque les pics chromatographiques sont assez souvent déformés à la base, on utilise de préférence la formule équivalente

$$N = 5,54 \frac{tr^2}{\delta^2} \quad \text{(III.20)}$$

où δ est la largeur du pic à mi - hauteur, exprimée en unité de temps.

III.2.3.2 Hauteur équivalente d'un plateau théorique HEPT :

La HEPT permet de comparer entre elles des colonnes de différentes longueurs. Elle est fonction de différents paramètres qui eux-mêmes sont susceptibles de varier avec la vitesse de la phase mobile.

Connaissant la longueur L de la colonne et le nombre de plateaux théoriques N, la Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique (HEPT ou H) est définie par la relation suivante :

$$\mathbf{HEPT = L / N} \quad \mathbf{(III.21)}$$

En HPLC les HEPT sont comprises entre 0,001 et 1 mm.

III.2.3.3 Efficacité réelle ou nombre de plateaux théoriques effectifs :

Afin de comparer les performances des colonnes chromatographiques de conceptions différentes vis à vis d'un même composé, on définit l'efficacité réelle selon les relations suivantes :

$$\mathbf{N_{eff} = 16 \frac{tr'^2}{\omega^2} = 5,54 \frac{tr'^2}{\delta^2}} \quad \mathbf{(III.22)}$$

Le calcul de la hauteur du plateau effectif H_{eff} se fait à partir de l'efficacité réelle :

$$\mathbf{H_{eff} = L / N_{eff}} \quad \mathbf{(III.23)}$$

III.2.4 Facteur de résolution :

Il est important dans une analyse chromatographique d'obtenir une bonne séparation des produits. C'est à dire des pics étroits et séparés, caractéristiques d'une bonne résolution. Le facteur de résolution noté R entre deux pics chromatographiques permet de traduire numériquement la plus ou moins bonne séparation entre deux composés ; La valeur du facteur R peut être calculé à partir du chromatogramme selon la relation suivante :

$$\mathbf{R = 2 \frac{(t_2 - t_1)}{(\omega_2 + \omega_1)}} \quad \mathbf{(III.23)}$$

Il découle de cette définition que la séparation est d'autant meilleure que R est plus grand. Ainsi pour deux pics d'aires voisines, lorsque R est supérieur à 1.5, la séparation est complète, puisqu'il n'y a alors que 2% de recouvrement. Pour R inférieur à 0,8 la séparation est généralement insuffisante (Figure III.4).

En supposant les largeurs des pics à la base du même ordre, on démontre que la résolution R peut être exprimée par la relation:

$$\mathbf{R = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{1 + k'_2} \right) \sqrt{N}} \quad \text{ou} \quad \mathbf{R = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{t_R - t_0}{t_R} \right)} \quad \mathbf{(III.24)}$$

où α est la sélectivité de la colonne, k'_2 le facteur de capacité du second pic et N le nombre de plateaux théoriques relatif au second soluté.

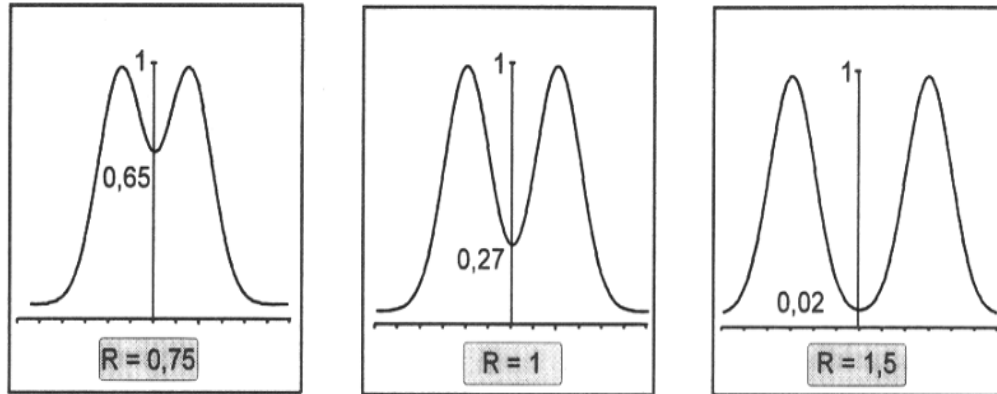


Figure III.4 : Représentation schématique de la relation du facteur R et la résolution des pics

III.2.5 Perte de charge :

La perte de charge est une caractéristique de la colonne, elle exprime sa résistance à l'écoulement de la phase mobile. Elle est appelé aussi pression de la colonne.

A l'intérieur d'une colonne la phase mobile frotte sur les parois de la colonne mais aussi sur les particules de phase stationnaire. Ces frottements définissent la résistance à l'écoulement.

La perte de charge qui est la différence de pression entre l'entrée et la sortie de la colonne est donnée par la loi de Darcy :

$$\Delta P = \frac{\eta L v}{K} \quad \text{(III.25)}$$

Avec : ΔP ; perte de charge (barye)

η : Viscosité(poise)

L : Longueur de la colonne (cm)

v : Vitesse de la phase mobile (cm/s)

K : Constante de perméabilité

Le paramètre K est défini par la relation suivante : $K = \frac{dp^2 \cdot \epsilon^3}{180 (1-\epsilon)^2}$ (III.26)

Avec : dp : diamètre moyen des particules (cm).

ϵ : porosité interstitiel

III.2.6 Influence de la vitesse de la phase mobile :

La vitesse de la phase mobile a une influence sur la progression des analytes dans la colonne. Cette influence a été mise en évidence par Van Deemter (1956) qui a proposé une équation qui relie la hauteur H (HEPT) à la vitesse linéaire moyenne de la phase mobile u :

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad \text{(III.27)}$$

Les trois coefficients numériques expérimentaux A, B et C sont reliés à divers paramètres physico-chimiques, à la colonne et aux conditions opératoires :

A : terme de remplissage

B : terme de diffusion longitudinale

C : terme de transfert de masse.

La courbe représentative de cette fonction est une branche d'hyperbole qui passe par un minimum (H_{\min}) correspondant à une vitesse optimale de la phase mobile (Figure III.5).

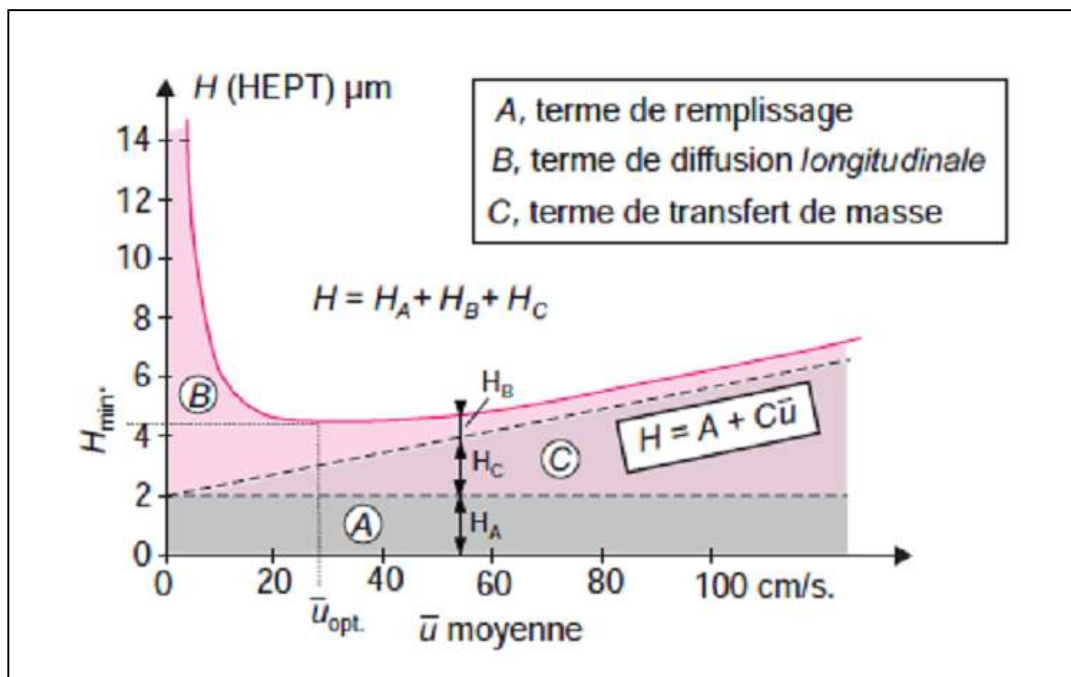


Figure III.5 : Courbe de Van Deemter en chromatographie gazeuse

a- Premier terme « A » de l'équation de VanDeemter

Le premier terme A de l'équation (III.27) exprime la diffusion turbulente due à l'écoulement irrégulier de la phase mobile à travers la phase stationnaire. Celle-ci est constituée de petites particules solides imprégnées ou non dans un liquide.

Leurs tailles et leurs formes ne sont pas identiques et les trajets effectués autour de chacune sont différents. La progression est le résultat moyen de tous les déplacements.

Plus que la colonne est régulièrement remplie de particules avec des tailles et de formes voisines plus que les vitesses d'écoulement sont proches de la théorie.

Le terme A est indépendant du débit de la phase mobile, il dépend des dimensions des particules, il croît avec leur diamètre.

b- Second terme « B/u » de l'équation :

Le terme « B/u » rend compte de l'influence de la diffusion longitudinale, c'est à dire la diffusion des molécules dans la direction de l'écoulement de la phase mobile.

Ce phénomène est d'autant plus important que la vitesse est faible :

On a :
$$B = 2 \gamma D_m \tag{III.28}$$

Avec :

- D_m : représente le coefficient du composé considéré dans la phase mobile. Ce facteur augmente avec l'élévation de la température mais diminue lorsque la pression croit.
- γ : Facteur de tortuosité, il représente l'influence de la colonne (en matière de granulométrie des particules, régularité du remplissage....ect). Plus le cheminement des molécules est uniforme, plus le facteur γ est faible.

c- Troisième terme « C » de l'équation de VanDeemter

Le facteur C représente les inégalités de passage des molécules d'une phase à l'autre, il est aussi appelé facteur de résistance aux transferts de masse.

Dans la phase mobile, toutes les molécules ne sont pas entraînées à la même vitesse, les conditions de partage sont différentes.

Les molécules du soluté fixées dans la phase stationnaire sont situées à des distances variables de la phase mobile et l'élution ne se fait pas partout à la même vitesse.

Ces phénomènes entraînent des retards aux établissements d'équilibre autant que le débit de la phase mobile est plus rapide.

La courbe représentant l'équation de Van Deemter est une hyperbole.

La courbe de Van Deemter montre que la variation de la HEPT en fonction de la vitesse d'écoulement passe par une valeur minimale calculée en cherchant la valeur de la vitesse u correspondant à l'annulation de la dérivée première de cette fonction :

$$f'(u) = -\frac{B}{u^2} + C \tag{III.29}$$

La vitesse u_o est donnée par la relation suivante :

$$u_o = \sqrt{\frac{B}{C}} \tag{III.30}$$

Pour que $f'(u) = 0$, il faut que :
$$H = A + 2\sqrt{BC} \tag{III.31}$$

- Pour $u > u_0$ l'augmentation du débit provoque une augmentation de la HEPT. Les temps de contact entre les deux phases sont courts et les équilibres n'ont pas le temps de s'établir complètement.
- Pour $u < u_0$ Les phénomènes de diffusion longitudinale deviennent prépondérants et entraînent également une augmentation de la HEPT.

Ces constatations faites pour le débit ont également été observées pour la température en chromatographie en phase gazeuse avec une équation équivalente :

$$HEPT = H = A + \frac{B}{T} + CT \quad (\text{III.32})$$

De manière pratique, il convient donc de rechercher les conditions opératoires qui, pour une colonne donnée, permettent d'obtenir la plus grande efficacité c'est à dire la plus faible valeur de la HEPT.

L'équation de Van Deemter initialement appliquée à la CPG peut être également appliquée aux autres types de chromatographie dans lesquelles les vitesses d'écoulement de la phase mobile occupent une place prépondérante. Cependant la HEPT croît régulièrement avec le débit ce qui est dû au fait que dans les liquides le terme B est très faible et que ce facteur n'interviendrait que pour des valeurs de u très petites, pratiquement jamais utilisées.

III.3 Optimisation d'analyse chromatographique :

La résolution et le temps d'élution sont les deux variables dépendantes les plus importantes à considérer. Dans toute optimisation, le but est de réussir une séparation suffisante du ou des composés intéressants en un minimum de temps. Les paramètres qui conditionnent R et t_R sont le nombre de plateaux théoriques N , le facteur de capacité α et le facteur de sélectivité k'_B :

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{1 + k'_2} \right) \quad (\text{III.33})$$

III.3.1 Modification du facteur de capacité

La séparation peut souvent être améliorée de manière significative en modifiant le facteur de capacité k'_2 . L'augmentation de k'_2 améliore le facteur de résolution au détriment de la durée de l'élution. Pour déterminer le domaine optimale de k'_2 , on trace le graphique RS/Q en fonction de k'_2 , où Q représente les deux premiers termes de l'équation $RS=f(k'_2)$.

Le graphique présenté dans la figure II.6 montre que pour :

- $k' > 10$ une faible augmentation de la résolution est observée au détriment de la durée de l'analyse
- $k' < 2$ correspond au minimum de temps pour avoir une élution.

Les valeurs optimales de k' sont généralement comprises entre 2 et 5. Le moyen le plus usuel pour améliorer la résolution est d'optimiser k' :

- pour les phases mobiles gazeuses, k' peut être contrôlé en modifiant la température.
- pour les phases liquides des changements de composition du solvant permettent souvent d'agir sur k' de manière à obtenir de meilleures séparations

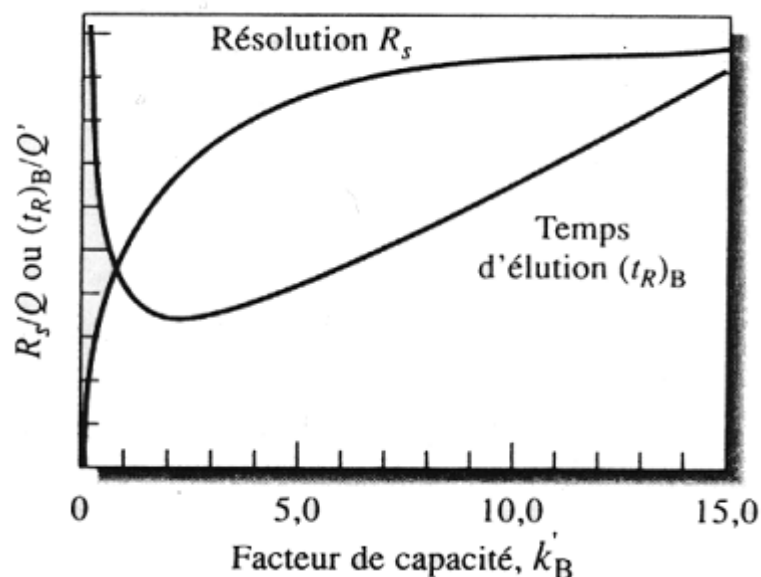


Figure III.6 : Optimisation d'une analyse chromatographique

III.3.2 Modification de la hauteur équivalente a un plateau théorique

La résolution d'une colonne est par définition proportionnelle à la racine carrée du nombre de plateaux théoriques qu'elle contient. L'augmentation du nombre de plateaux entraîne un allongement de la durée de la séparation, sauf si cette augmentation est obtenue en réduisant H .

Les méthodes permettant de minimiser H sont la diminution

- du diamètre des particules du support
- du diamètre de la colonne
- de la température (CPG)
- de l'épaisseur du film liquide (HPLC).

III.3.3 Modification du facteur de sélectivité

L'optimisation de k' et de N ne suffisent pas pour donner une bonne séparation de deux solutés en un temps raisonnable si α est proche de 1. Dans ce cas on doit chercher à augmenter α tout en maintenant k' entre 1 et 10. Plusieurs options sont possibles, on peut :

- d- modifier la phase mobile
- e- modifier la température de la colonne
- f- modifier la composition de la phase stationnaire
- g- utiliser des effets chimiques spéciaux.

Une augmentation de température entraîne également une augmentation de k' mais elle a peu d'effet sur la valeur de α en chromatographie liquide-liquide ou liquide-solide. Par contre la température a une influence sur l'échange d'ions et sera un paramètre à optimiser.

Chapitre IV

Analyse quantitative en chromatographie

Introduction

La chromatographie préparative est utilisée pour purifier un produit pour d'autres utilisations. Son but est d'obtenir de la substance ; c'est pourquoi, à toute échelle, elle implique de collecter des fractions.

La chromatographie analytique est utilisée pour identifier ou doser (analyse quantitative) les composés chimiques d'un mélange et apprécier leur concentration. Elle est utilisée, par exemple, dans les laboratoires d'analyses médicales pour évaluer la quantité de vitamines dans le sang. Elle est aussi très utilisée dans le domaine sportif pour savoir si un athlète s'est dopé.

IV.1 Principe et relation de base :

Pour un réglage donné de l'appareil, on admet qu'il existe pour chaque pic du chromatogramme une relation linéaire entre son aire (ou sa hauteur) et la quantité du composé responsable de ce pic dans l'échantillon injecté. Cette relation est valable pour une plage de concentrations qui dépend du détecteur employé.

$$m_i = K_i \cdot A_i = C_i \cdot V \quad (\text{IV.1})$$

avec : m_i : masse du composé i injecté

A_i : Aire du pic du composé i

K_i : Coefficient de réponse absolu du composé i

C_i : Concentration massique du composé i

V : Volume injecté.

Le coefficient absolu K_i (à ne pas confondre avec le coefficient de partition), dépend du réglage du chromatographe. Ce n'est pas un paramètre intrinsèque du composé. Pour calculer le coefficient K_i d'un composé i , il faut, d'après cette relation, connaître l'aire A_i et la masse m_i traversant la colonne. Or cette masse est difficile à déterminer avec précision, car elle dépend à la fois de la seringue et de l'injecteur (en CPG) ou de la boucle d'injection (en CPL). C'est pourquoi les méthodes utilisées en analyse quantitative, préprogrammées dans les enregistreurs-intégrateurs ou logiciels divers, évitent de faire intervenir les coefficients de réponse absolus K_i .

Pour déterminer les aires des pics, on utilise les fonctions spécialement prévues des logiciels de chromatographie, qui assurent non seulement le pilotage du chromatographe, mais qui peuvent, en plus de l'acquisition des chromatogrammes, analyser les données, quantifier et fournir le rapport d'analyse correspondant à l'une des méthodes d'analyse quantitative préprogrammées.

IV.2 Méthode d'étalonnage externe :

Le principe de cette méthode repose sur la comparaison de deux chromatogrammes obtenus successivement pour un même composé sans modification des conditions de réglage du détecteur. Le premier correspond à un chromatogramme étalon où on connaît la concentration du composé i , le second chromatogramme correspond à une concentration inconnue du même composé.

Soit $A_{éch}$ l'aire du pic correspondant. Puisque les volumes injectés sont égaux, il y a proportionnalité entre les aires, qui dépendent des masses injectées, et les concentrations correspondantes ($m_i = C_i \cdot V$).

On a alors :

$$\left. \begin{array}{l} m_{ref} = K \cdot A_{ref} = C_{ref} \cdot V \\ m_{éch} = K \cdot A_{éch} = C_{éch} \cdot V \end{array} \right\} \Longrightarrow C_{éch} = C_{ref} \cdot \frac{A_{éch}}{A_{ref}} \quad (IV.2)$$

Avec :

m_{ref} : masse référence du composé i

A_{ref} : Aire du pic du composé référent i

C_{ref} : Concentration référence (connue) du composé i

$A_{éch}$: Aire du pic du composé i échantillon.

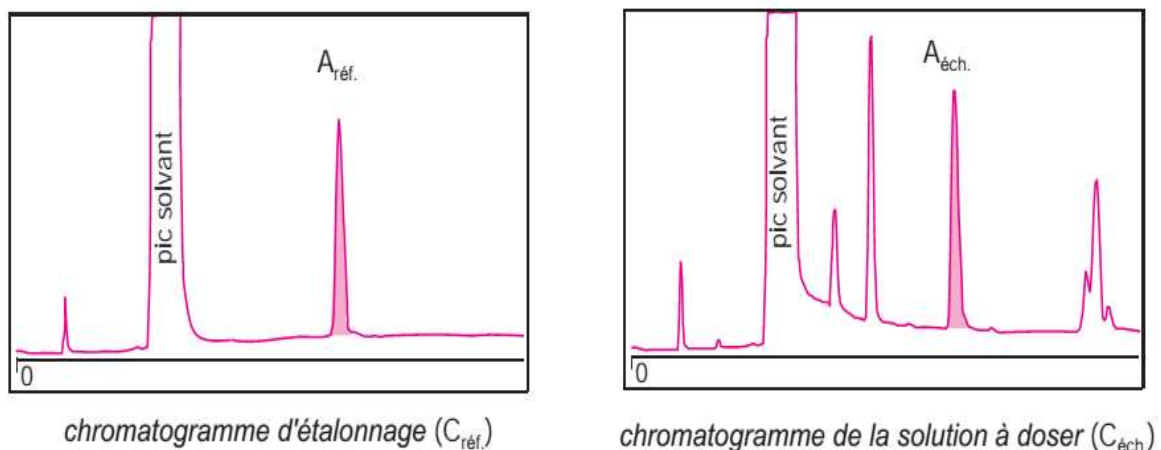


Figure IV.1 : Schéma de principe de la méthode de dosage par étalonnage externe.

Cette méthode, faisant appel aux coefficients de réponse absolus, donne des résultats très fiables avec les chromatographes performants actuels qui sont équipés d'un auto-échantillonneur : ce dernier constitué de la réunion d'un carrousel porte-échantillons et d'un injecteur automatique permet d'enchaîner plusieurs dosages sans intervention

humaine. Une seule solution de référence permet de compenser une éventuelle dérive de l'instrument par des ré-injections programmées de contrôle.

La précision du dosage est évidemment améliorée en calculant la moyenne des aires obtenues à partir de plusieurs injections identiques, mais, quitte à faire plusieurs mesures, il est alors préférable de procéder à un étalonnage multipoints (multilevel calibration).

Les résultats d'analyse sont directement obtenus à partir de la courbe d'étalonnage $A = f(C)$. Cette méthode a également pour avantage qu'on n'ajoute aucun composé à la solution échantillon, à la différence des autres méthodes.

IV.3 Méthode d'étalonnage interne :

Cette deuxième méthode repose sur l'utilisation du coefficient de réponse relatif de chaque composé à doser vis-à-vis d'un marqueur introduit comme référence. Cela permet de s'affranchir de l'imprécision concernant les volumes injectés, un handicap de la précédente méthode.

La méthode nécessite, ici encore, deux chromatogrammes, l'un pour calculer les coefficients de réponse relatifs et l'autre pour l'analyse de l'échantillon. Les aires des pics des produits à quantifier sont donc comparées avec celle d'un composé de référence, appelé étalon interne noté E, introduit à une concentration connue dans l'échantillon.

IV.3.1 Calcul des coefficients de réponse relatifs :

Supposons que l'échantillon contienne deux composés à doser 1 et 2, et que le composé E désigne un composé supplémentaire à usage d'étalon interne.

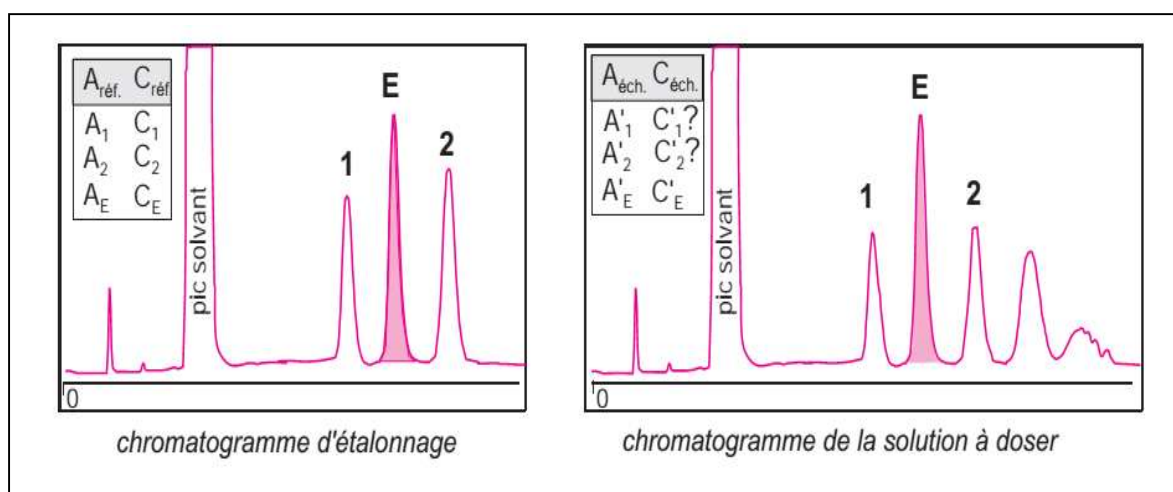


Figure IV.2 : Schéma de principe de la méthode d'analyse par étalonnage interne

Dans une première étape, on commence par préparer une solution de concentration C_1 en 1, C_2 en 2 et C_E en E.

Appelons A_1 , A_2 et A_E les aires des pics d'élution repérés sur le chromatogramme obtenu à partir d'une prise d'essai de cette solution.

Si m_1 , m_2 et m_E sont les quantités réellement introduites dans la colonne, on peut écrire les trois relations du type suivantes :

$$\begin{aligned} m_1 &= K_1 \cdot A_1 \\ m_2 &= K_2 \cdot A_2 \\ m_E &= K_E \cdot A_E \end{aligned} \quad (\text{IV.3})$$

$$\frac{m_1}{m_E} = \frac{K_1 \cdot A_1}{K_E \cdot A_E} \quad (\text{IV.4}) \quad \text{et} \quad \frac{m_2}{m_E} = \frac{K_2 \cdot A_2}{K_E \cdot A_E} \quad (\text{IV.5})$$

Ces rapports permettent de calculer les coefficients de réponse relatifs de 1 et de 2 vis-à-vis de E choisi comme étalon, et désignés par $K_{1/E}$ et $K_{2/E}$:

$$K_{1/E} = \frac{K_1}{K_2} = \frac{m_1 \cdot A_E}{m_E \cdot A_1} \quad \text{et} \quad K_{2/E} = \frac{K_2}{K_E} = \frac{m_2 \cdot A_E}{m_E \cdot A_2} \quad (\text{IV.6})$$

Comme les masses m_i réellement injectées sont proportionnelles aux concentrations massiques correspondantes C_i , ($m_i = C_i \cdot V$), on en déduit les deux expressions suivantes :

$$K_{1/E} = \frac{C_1 \cdot A_E}{C_E \cdot A_1} \quad \text{et} \quad K_{2/E} = \frac{C_2 \cdot A_E}{C_E \cdot A_2} \quad (\text{IV.7})$$

IV.3.2 Calcul des concentrations :

La seconde étape consiste à analyser par chromatographie un volume quelconque d'une solution faite avec l'échantillon à étudier et dans laquelle a été ajoutée une quantité connue du composé E.

Soient A_1 , A_2 et A_E , les aires du nouveau chromatogramme obtenu dans les mêmes conditions opératoires. Si m_1 , m_2 et m_E désignent les masses de 1, 2 et E réellement introduites dans la colonne, on aura :

$$\frac{m'_1}{m'_E} = K_{1/E} \frac{A'_1}{A'_E} \quad \text{et} \quad \frac{m'_2}{m'_E} = K_{2/E} \frac{A'_2}{A'_E} \quad (\text{IV.8})$$

À partir des coefficients relatifs calculés dans la première expérience ainsi que de la concentration de l'étalon interne dans l'échantillon, C_E , connue, on peut accéder aux relations suivantes :

$$C'_1 = C'_E K_{1/E} \frac{A'_1}{A'_E} \quad \text{et} \quad C'_2 = C'_E K_{2/E} \frac{A'_2}{A'_E} \quad (\text{IV.9})$$

En généralisant à n constituants, on peut calculer la concentration massique du soluté i :

$$C'_i = C'_E K_{i/E} \frac{A'_i}{A'_E} \quad (\text{IV.10})$$

On peut alors déduire sa teneur dans l'échantillon, exprimée en %

$$x_i \% = \frac{C'_i}{\text{Masse d'échantillon prélevée}} \times 100 \quad (\text{IV.11})$$

Cette méthode est encore plus précise si on fait plusieurs injections de l'étalon ou de l'échantillon à doser.

En conclusion cette méthode générale et reproductible exige néanmoins un bon choix de l'étalon interne dont les caractéristiques peuvent se résumer ainsi :

- Il doit être pur et ne pas se trouver initialement dans l'échantillon ;
- Son pic d'élution doit être bien résolu par rapport à tous ceux qui forment le chromatogramme de l'échantillon ;
- Son temps de rétention doit être proche de celui (ou de ceux) du (ou des) soluté(s) à doser ;
- Sa concentration doit être proche ou supérieure à celle des autres solutés pour être dans les conditions d'une réponse linéaire du détecteur ;
- Il doit être inerte vis-à-vis des composés de l'échantillon.

IV.4 Méthode par normalisation interne

Cette méthode, également appelée « 100 % normalisée », est réservée aux mélanges dont on a identifié tous les constituants par autant de pics d'élution séparés sur le chromatogramme, afin de pouvoir faire le bilan complet de l'échantillon concerné. Supposons qu'il s'agisse de trouver les concentrations massiques d'un mélange de trois composés 1, 2, 3. On va procéder ici encore en deux étapes :

- Calcul des coefficients de réponse relatifs
- Calcul des concentrations.

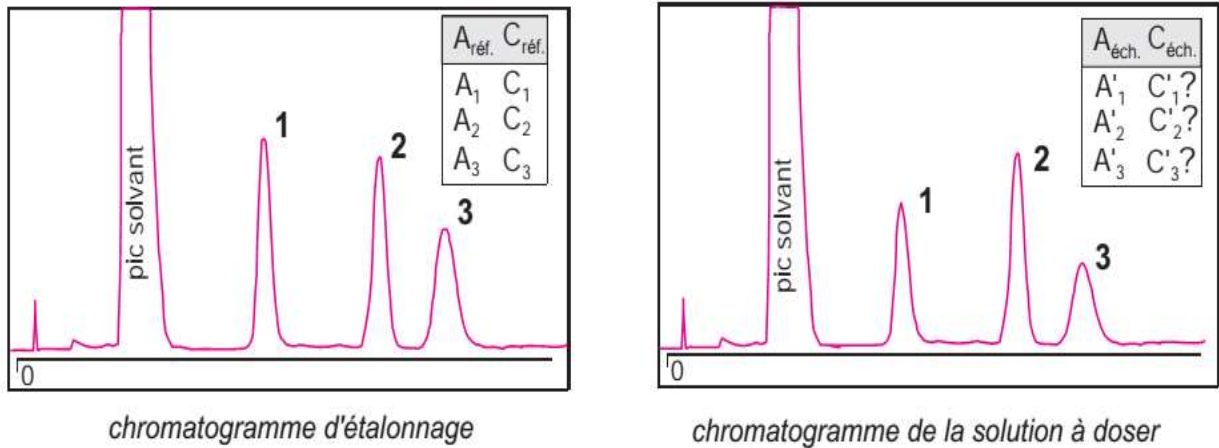


Figure IV.3 : Schéma de principe de la méthode d'analyse par normalisation interne.

a- Calcul des coefficients de réponse relatifs

On prépare une solution d'étalonnage contenant les trois composés 1, 2, et 3 dont les concentrations massiques sont respectivement C_1 , C_2 , C_3 . Le chromatogramme correspondant à l'injection d'un volume V , présente trois pics d'aires A_1 , A_2 et A_3 . Ces aires seront reliées aux masses injectées m_1 , m_2 et m_3 par les trois expressions cidessous. On choisit l'un des composés comme substance de normalisation interne, le composé 3 par exemple, afin de déterminer les coefficients de réponse relatifs $K_{1/3}$ et $K_{2/3}$ des composés 1 et 2 par rapport à 3. On trouve:

$$K_{1/3} = \frac{K_1}{K_3} = \frac{m_1 \cdot A_3}{m_3 \cdot A_1} \quad \text{et} \quad K_{2/3} = \frac{K_2}{K_3} = \frac{m_2 \cdot A_3}{m_3 \cdot A_2} \quad (\text{IV.12})$$

Étant donné que $m_i = C_i \cdot V$, on aboutit, pour $K_{1/3}$ et $K_{2/3}$, aux expressions suivantes :

$$K_{1/3} = \frac{C_1 \cdot A_3}{C_3 \cdot A_1} \quad \text{et} \quad K_{2/3} = \frac{C_2 \cdot A_3}{C_3 \cdot A_2} \quad (\text{IV.13})$$

b- Calcul des concentrations

On procède ensuite à l'injection d'une prise d'essai du mélange à doser contenant les constituants 1, 2 et 3. En désignant les surfaces des pics d'éluion par A_1 , A_2 et A_3 , on aura accès directement à la composition centésimale massique du mélange représentée par x_1 , x_2 et x_3 en utilisant la relation suivante :

$$x_i \% = \frac{K_{i/3} \cdot A'_i}{K_{1/3} \cdot A'_1 + K_{2/3} \cdot A'_2 + A'_3} \times 100 \quad (\text{avec } i = 1, 2, 3) \quad (\text{IV.14})$$

La condition de normalisation étant que : $x_1 + x_2 + x_3 = 100 \%$ (IV.15)

En extrapolant à n solutés normalisés par rapport à un soluté j, l'expression générale des facteurs de réponse est la suivante (pour un composé choisi i) :

$$K_{i/j} = \frac{C_i \cdot A_j}{C_j \cdot A_i} \quad (\text{IV.16})$$

Pour l'échantillon contenant n solutés, si A_i désigne l'aire du pic d'élution du composé i, le composé servant de référence interne étant j, la teneur en composé i obéira à la relation suivante :

$$x_i \% = \frac{K_{i/j} \cdot A_i}{\sum_{i=1}^n K_{i/j} \cdot A_i} \times 100 \quad (\text{IV.17})$$

Exercices d'applications

(Exploitation des résultats de la chromatographie analytique)

Exercice N°1

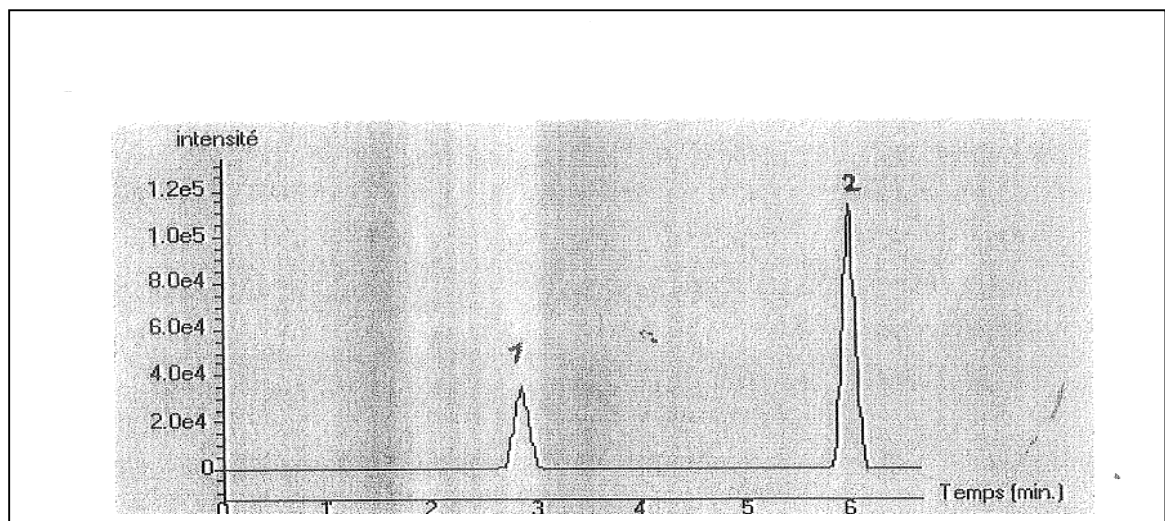
On mélange dans un erlenmeyer 6 mL de gel de silice et 40 mL d'un solvant contenant en solution 100 mg d'un composé considéré comme non volatil. Après avoir bien agité ce mélange, on laisse décanter et on recueille 10 mL du solvant que l'on évapore. Le résidu pèse 12 mg. Calculer le coefficient d'adsorption (de partage) K de ce composé dans cette expérience.

Exercice N°2

Calculer le facteur de séparation entre deux composés 1 et 2 dont les volumes de rétention sont respectivement égaux à 6 et 7 mL. Le volume mort de la colonne utilisée est de 1 mL. Montrer que ce facteur est égal au rapport des coefficients de distribution K_2/K_1 de ces composés ($t_{R1} < t_{R2}$).

Exercice N°3

Soit le chromatogramme ci-dessous où le pic1 correspond à un composé non retenu par la phase stationnaire et le pic 2 correspond à un composé retenu par 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 :
 - Comment peut-on déterminer, d'après le chromatogramme, le volume de la phase mobile dans la colonne ?
 - Le volume de la phase stationnaire apparait-il sur le chromatogramme ? Si non, comment peut le calculer ?
 - Calculer le facteur de rétention k du composé 2.
 - En règle générale, préfère-t'on avoir une valeur du facteur de rétention k élevée ou faible ? Pourquoi ?

Exercice N°4 :

Des colonnes chromatographiques de 0.1 cm de diamètre interne et 10 cm de longueur sont actuellement proposées garnies de particules sphériques de 1 μm de diamètre et de porosité interstitielle égale à 0,5.

Ces particules sont constituées de butyl silice et la phase mobile contenant du 1-hexane sulfonate a une viscosité égale à 0,5 centipoise.

- 1- Quel débit de la phase mobile doit-on fixer pour que la perte de charge soit égale à 200 bars ?
- 2- Avec cette valeur de perte de charge, quel sera la valeur du temps mort t_0 ?
- 3- Quel est le facteur de capacité d'un composé élué à 7 minutes ?
- 4- Quel est le nombre de plateaux théoriques ?

On donne :

$$K_o = \frac{d_p^2}{180} \cdot \frac{\varepsilon^3}{(1 - \varepsilon)^2}$$

$$\text{HEPT} = B \cdot d_p^\beta \quad \text{avec } \beta = 1,6 \text{ et } B = 1$$

Exercice N°5

On veut déterminer par la méthode de normalisation interne la composition massique d'un échantillon constitué de 4 esters de l'acide butanoïque. Une solution de référence de ces quatre esters (concentrations massiques connues) conduit aux valeurs suivantes des coefficients de réponse relatifs des butanoates de méthyle (ME), d'éthyle (EE) et de propyle (PE) par rapport au butanoate de butyle (BE) ; $k_{\text{ME/BE}} = 0,919$; $k_{\text{EE/BE}} = 0,913$; $k_{\text{PE/BE}} = 1,06$.

À partir des indications données ci-dessous, fournies par le chromatogramme de l'échantillon à doser, trouver la composition massique de ce mélange.

N° pic	t_R	Composé	Aire (unités arbitraires)
1	2,54	méthyl ester (ME)	2340,1
2	3,47	éthyl ester (EE)	2359,0
3	5,57	propyl ester (PE)	4077,3
4	7,34	butyl ester (BE)	4320,7

Corrigés des exercices d'application

Exercice N°1 :

Après équilibre, les 40 ml d'éluant contiennent une quantité du composé qui correspond à :
 $12 \times 40 / 10 = 48 \text{ mg}$.

Dans la phase stationnaire il y a donc : $100 - 48 = 52 \text{ mg}$

Le coefficient de partage K est le rapport des masses présentes dans 1 ml de chaque phase en équilibre :

On alors :
$$K = \frac{\frac{52}{40}}{\frac{48}{10}} = 7.2$$

Exercice N°2 :

Données : V_M (Volume mort) = 1 ml α : Facteur de séparation

V_{R1} (Volume de rétention du composé 1) = 6 mL

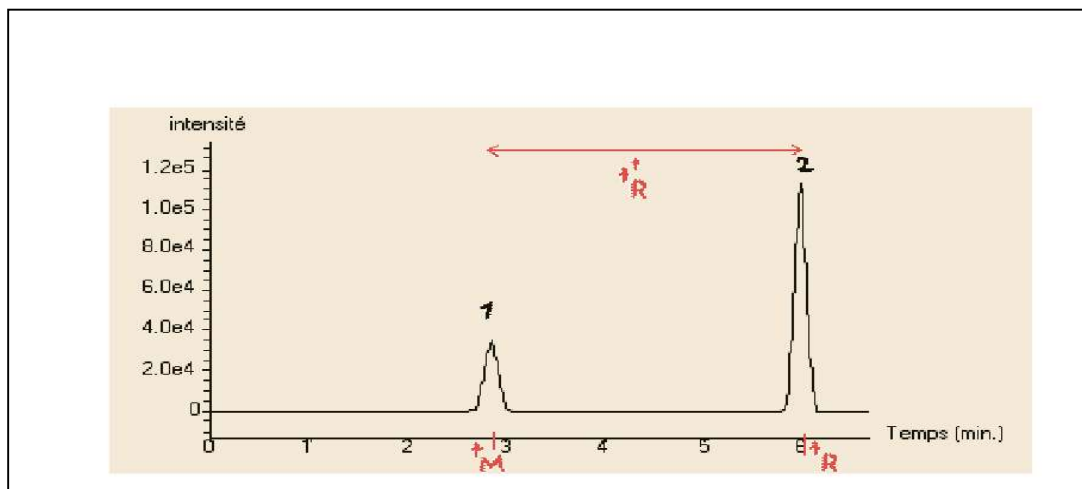
V_{R2} (Volume de rétention du composé 2) = 7 mL

Sachant que $V_R = t_R \cdot D$, on a : $\alpha = (V_{R2} - V_M) / (V_{R1} - V_M)$

D'où : la valeur du facteur de séparation : $\alpha = 1.2$

Exercice N°3 :

- 1- Le temps mort correspond au temps de rétention du composé non retenu par la phase stationnaire.
- Le temps de rétention du composé 2 correspond à l'abscisse du pic 2.
- Le temps de rétention réduit t'_R du composé 2 est la différence entre son temps de rétention et le temps mort.



2- Le composé 1 n'étant pas retenu par la phase stationnaire, son temps de rétention correspond alors au temps que met la phase mobile pour traverser la colonne (en négligeant les temps morts dus aux volumes morts de l'injecteur et du détecteur).

- Le volume de la phase mobile (Volume mort : V_M) est donc :

$$V_M = t_M \cdot D \quad (D \text{ étant le débit})$$

- Le volume de la phase stationnaire (V_S) n'apparaît pas sur le chromatogramme mais on peut le calculer en retranchant le volume de la phase mobile V_M calculé au volume totale de la colonne V_T (connu d'après ses dimensions) :

$$V_S = V_T - V_M$$

- Le facteur de rétention k est donné par la relation suivante :

$$k = t'_R / t_M$$

- En règle générale, on préfère avoir une faible valeur du facteur de rétention k pour ne pas prolonger la durée des analyses.

Exercice N°4 :

Données : Dimensions de la colonne : $d = 0.1 \text{ cm}$ et $L = 10 \text{ cm}$

Diamètre des particules $dp = 1 \text{ }\mu\text{m} = 10^{-6} \text{ m}$; porosité interstitielle : $\varepsilon = 0.5$

1- Pour calculer le débit de la phase mobile correspondant à une perte de charge égale à 200 bars, il faut calculer la vitesse v de la phase mobile en utilisant la loi de DARCY

$$\Delta P = \frac{\eta L v}{K} \quad \text{d'où} \quad v = \frac{\Delta P \cdot K}{\eta \cdot L}$$

Avec : ΔP ; perte de charge (barye)

η : Viscosité(poise)

L : Longueur de la colonne (cm)

v : Vitesse de la phase mobile (cm/s)

K : Constante de perméabilité

Le paramètre K est défini par la relation suivante : $K = \frac{dp^2 \cdot \varepsilon^3}{180 (1-\varepsilon)^2}$

Avec : dp : diamètre moyen des particules (cm).

ε : porosité interstitiel $2.10^8 \cdot 2.78 \cdot 10^{-11} \quad 10^{-2}$

A.N :
$$v = \frac{2.10^8 \cdot 2,7 \cdot 810^{-11}}{0,5 \cdot 10^{-2}} \quad \text{d'où} \quad v = 0.111 \text{ cm/s}$$

$D = v \cdot s$ avec $s = (0,785 \cdot 10^{-3}) \cdot 0,5 \text{ cm}^2$

Débit : $D = 4,36 \cdot 10^{-4} \text{ cm/s}$

- 2- Calcul du temps perte t_M correspondant à cette perte de charge $\Delta P = 200$ bars
 Pour cela, on utilise tout simplement la relation qui lie le temps mort avec la vitesse de la phase mobile :

$$t_M = L / v$$

d'où : $t_M = 10/0,111 = 90$ secondes

- 3- Calcul du facteur de capacité k :

On a : $t_R = t_M (1 + k)$ AN: $420 = 90 (1 + k) \implies k = 3,67$

- 4- Calcul du nombre de plateaux théorique :

Pour cela, il faut tout d'abord calculer HEPT

HEPT = $1 (10^{-4})^{1.6} = 4.10^{-7}$ cm d'où: $N = L / \text{HEPT}$

$$N = 10 / 4.10^{-7} = 2,5.10^7$$

Exercice N°5 :

Les valeurs des coefficients de réponse relatifs des butanoates de méthyle (ME), d'éthyle (EE) et de propyle (PE) par rapport au butanoate de butyle (BE) sont respectivement les suivantes :

$k_{ME/BE} = 0,919$; $k_{EE/BE} = 0,913$; $k_{PE/BE} = 1,06$.

N° pic	t_R	Composé	Aire (unités arbitraires)
1	2,54	méthyl ester (ME)	2340,1
2	3,47	éthyl ester (EE)	2359,0
3	5,57	propyl ester (PE)	4077,3
4	7,34	butyl ester (BE)	4320,7

En désignant les surfaces des pics d'élution par A_1 , A_2 , A_3 et A_4 on aura accès directement à la composition centésimale massique du mélange représentée par x_1 , x_2 , x_3 et x_4 ceci en appliquant la relation suivante :

$$x_i = \frac{K_{i/3} \cdot A_i}{K_{1/4} \cdot A_1 + K_{2/4} \cdot A_2 + K_{3/4} \cdot A_3 + A_4} \times 100 \text{ (}\% \text{)} \text{ (avec } i = 1, 2, 3, 4 \text{)}$$

La condition de normalisation étant que : $x_1 + x_2 + x_3 + x_4 = 100 \%$

On choisit l'un des composés comme substance de normalisation interne, dans le cas de cet exercice c'est le **butanoate de butyle (BE)**.

Résultats de l'application numérique :

$x_{ME} = 16.6 \%$

$x_{EE} = 16.6 \%$

$x_{PE} = 33.4 \%$

$x_{BE} = 33.4 \%$

Bibliographie partie « Méthodes séparatives – Chromatographie »

- G. Burgot et J.L. Burgot, Méthodes Instrumentales d'Analyse Chimique, Tec et Doc 2002.
- Colin F. Poole, The Essence of Chromatography, Elsevier 2003.
- Douglas A. SKOOG, F. James HOLLER, Timothy A. NIEMAN, Principes d'Analyse Instrumentales, De Boeck 2003.
- Francis ROUESSAC et Annick ROUESSAC, Analyse chimique, Dunod 2004.
- A.L. Cinquin, P.Roberti, L.Giannthi, F.Longo, Chromatography, (2003), p221-987
- Professeur Jean-Louis Cuq. Cours chromatographie liquide Université Montpellier (2001), P3
- J.Dgraeve, F.Berthou, Méthodes chromatographiques, 2ème édition, (1986), p392
- C.et A. Jardy, Chromatographie en phase liquide, théorie des méthodes de séparation, 4ème édition, (2004), p12
- B. Herman, J. Dauchot et F. Dumont, Chimie analytique, Degraeve, F. Berthou, 7ème édition, (2007), p703
- J-J. Minet, V. Eudes, C. Costanza, X. Archer, M-B. Le Borgne, G. Baron, (2010), L'utilisation des méthodes chromatographiques en police scientifique, L'actualité chimique n 342-343, p. 62-69.
- Jungbauer, Alois,, Hahn, Rainer (2009), "Chapter 22 Ion exchange chromatography" Guide to protein purification, 2nd edition. Methode in enzymology. 463. pp 349-371
- Joachim Weiss (2004) Handbook of Ion Chromatography Volume 1, Weinheim : WILEY-VCH, 547p
- James S. Fritz, Douglas T. Gjerde, (2000) Ion Chromatography, Weinheim : WILEY-VCH, 247p
- Skoog, West, Holler, Crouch, (2015) Chimie analytique. Bruxelles : De Boeck, 1049p
- Joachim Weiss (2004) Handbook of Ion Chromatography Volume 2, Weinheim : WILEY-VCH, p. 549-839

Partie II
Méthodes spectroscopiques

Chapitre V

Spectrométrie UV-Visible

V.1 Généralités sur les méthodes spectrales :

La spectroscopie, ou spectrométrie, est l'étude expérimentale du spectre d'un phénomène physique, c'est-à-dire de sa décomposition sur une échelle d'énergie, ou toute autre grandeur se ramenant à une énergie (fréquence, longueur d'onde, etc.).

Historiquement, ce terme s'appliquait à la décomposition, par exemple par un prisme, de la lumière visible émise (spectrométrie d'émission) ou absorbée (spectrométrie d'absorption) par l'objet à étudier.

Aujourd'hui, ce principe est décliné en une multitude de techniques expérimentales spécialisées qui trouvent des applications dans quasiment tous les domaines de la physique au sens large : astronomie, astrophysique, biophysique, chimie, physique atomique, physique des plasmas, physique nucléaire, physique du solide, mécanique, acoustique, etc. On analyse par spectroscopie non seulement la lumière visible, mais aussi le rayonnement électromagnétique dans toutes les gammes de fréquence, les ondes élastiques comme le son ou les ondes sismiques, ou encore des particules (l'usage du terme « spectroscopie » est toutefois inapproprié, car on ne mesure pas à proprement parler l'énergie mais plutôt la masse des particules).

De manière générale, l'instrument de mesure permettant d'obtenir un spectre est appelé spectromètre ou spectroscopie. Le suffixe « -scopie » fait référence à l'observation visuelle, par exemple l'impression sur un film photographique, la projection sur un écran ou bien l'utilisation d'une lunette d'observation. Le suffixe « -métrie » fait référence à l'enregistrement d'un signal par un appareil (table traçante, enregistrement électronique, etc.).

Les techniques spectroscopiques permettent de sonder la matière par différentes méthodes pour en déduire des informations sur la structure des molécules qui composent cette matière.

Une technique spectroscopique a pour principe d'irradier (radiations électromagnétiques) un corps et de voir quelles sont les conséquences de cette radiation sur ce corps. Selon la technique mise en jeu, on pourra déduire des spectres obtenus des informations à caractère structural. Découverte par Bunsen et Kirchhoff, la spectroscopie est aujourd'hui la technique la plus utilisée en chimie, physique et biologie pour extraire des informations du monde microscopiques.

Il existe plusieurs techniques spectroscopiques :

- a- Spectroscopie UV-visible, spectrophotométrie ou spectroscopie d'absorption moléculaire.

- b- Spectroscopie d'absorption atomique (SAA) : La spectrométrie atomique étudie les émissions ou absorptions de lumière par l'atome libre, c'est à dire lorsque celui-ci voit son énergie varier au cours d'un passage d'un de ses électrons d'une orbite électronique à une autre. Généralement seuls les électrons externes de l'atome sont concernés. Ce sera le cas si les énergies mises en jeu sont modérées.
- c- Spectroscopie Infrarouge (IR) : dans cette technique on peut exciter les modes de vibration (élongation et déformation des liaisons).
- d- Spectroscopie de masse (SM) : généralement couplé avec la chromatographie en phase gazeuse (CG/SM), appliquée surtout pour l'analyse et la détermination de la structure des huiles essentielles.
- e- Résonance Magnétique nucléaire (RMN) : très utilisée pour la détermination de la structure des molécules d'origine végétales (flavonoïdes, alcaloïdes, ...etc.)

V.2 Le spectre électromagnétique :

Le spectre électromagnétique représente la répartition des ondes électromagnétiques en fonction de leur longueur d'onde, de leur fréquence ou bien encore de leur énergie (Figure V.1).

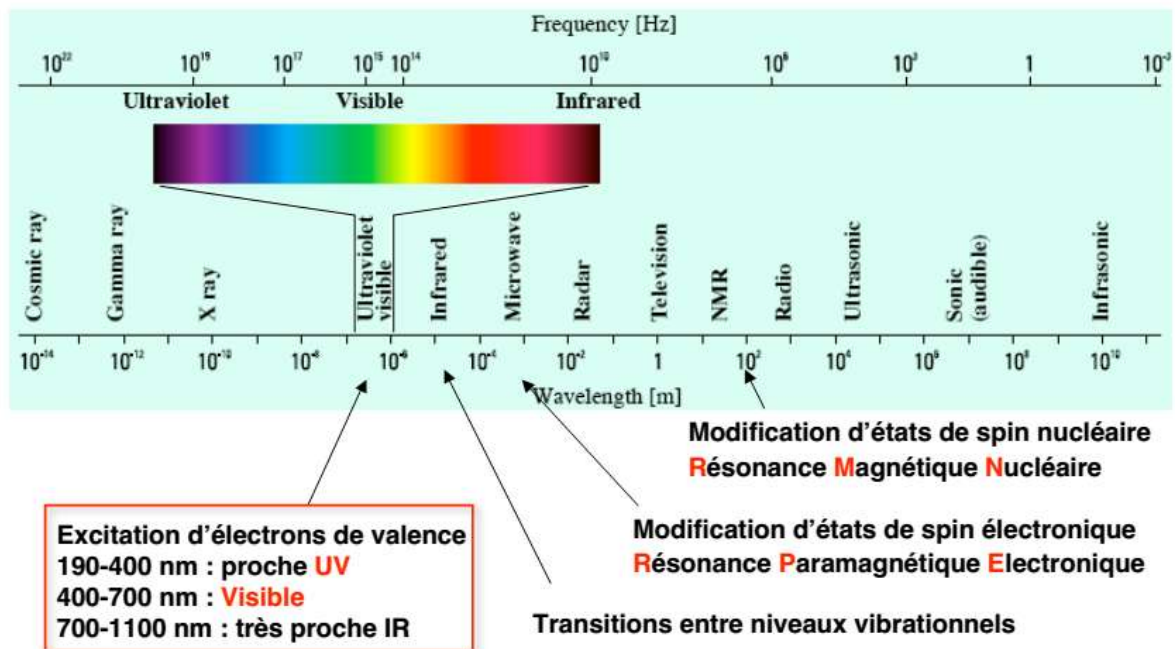


Figure V.1 : Spectre électromagnétique.

V.3 Principe de la spectrométrie UV-Visible :

La spectroscopie d'absorption dans l'UV et le visible est une méthode très commune dans les laboratoires. Elle est basée sur la propriété des molécules d'absorber des radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée.

Le domaine spectral UV-visible s'étend environ de 800 à 10 nm.

- a- Visible : 800 nm (rouge) – 400 nm (indigo)
- b- Proche UV; 400 nm – 200 nm
- c- UV-lointain: 200 nm – 10 nm

Dans une molécule, les transitions électroniques UV-visibles mettent en jeu les énergies les plus importantes de la chimie (environ de 13000 à 50000 cm^{-1} soit 160 à 665 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). L'ordre de grandeur des énergies mises en jeu est celui des énergies de liaison des molécules et ces rayonnements peuvent parfois provoquer des ruptures de liaisons. Plus généralement, ils provoquent des transitions électroniques entre les différents niveaux d'énergie des molécules.

V.4 Loi de Beer-Lambert :

Soit une lumière monochromatique traversant une solution absorbante de concentration C contenue dans une cuve d'épaisseur l (Figure V.2).

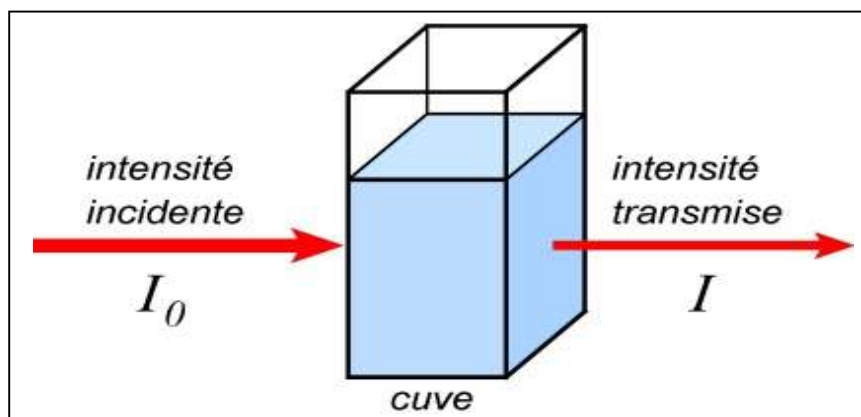


Figure V.2 : Représentation schématique du passage d'une lumière monochromatique à travers une solution absorbante

Une partie de ce rayonnement sera absorbée par l'échantillon et une partie sera transmise. Bouguer, Lambert et Beer ont étudié les relations qui existent entre I_0 et I : l'intensité d'une lumière monochromatique traversant un milieu où elle est absorbée décroît de façon exponentielle :

$$\mathbf{I = I_0 e^{-klC}} \quad (\text{V.1})$$

- * I_0 est l'intensité de la lumière incidente
- * I est l'intensité après passage à travers la cuve contenant la solution (intensité transmise)
- * l est la distance traversée par la lumière (épaisseur de la cuve) (en cm)
- * C est la concentration des espèces absorbantes
- * k est une constante caractéristique de l'échantillon.

A partir de l'équation (V.1) on peut avoir la relation suivante :

$$\log(I_0/I) = k.l.C/2.3 = \epsilon l C \quad (\text{V.2})$$

- * $\log(I_0/I)$ est appelé absorbance (A)
- * le rapport I/I_0 représente la transmission notée T .

ϵ est le coefficient d'extinction molaire ; c 'est une caractéristique de la substance étudiée à une longueur d'onde donnée. Si C est la molarité, ϵ est en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$.

On obtient alors la relation connue sous le nom de loi de Beer-Lambert :

$$A = -\log T = \epsilon l C \quad (\text{V.3})$$

V.5 Allure d'un spectre d'absorption

La bande d'absorption, observée dans le domaine de l'UV-visible, est caractérisée par sa position en longueur d'onde λ_{max} en nm (longueur d'onde maximale) (ou en nombre d'onde, cm^{-1}) et par son intensité liée au coefficient d'extinction molaire ϵ_{max} .

La position du maximum d'absorption correspond à la longueur d'onde de la radiation qui provoque la transition électronique. Quant à l'intensité, on peut montrer qu'elle est liée au moment dipolaire. Sa valeur permet de savoir si la transition est permise ou interdite.

Exemple : Le complexe $Ti(H_2O)_6^{3+}$ est rouge-violet et absorbe dans le vert (Figure V.3).

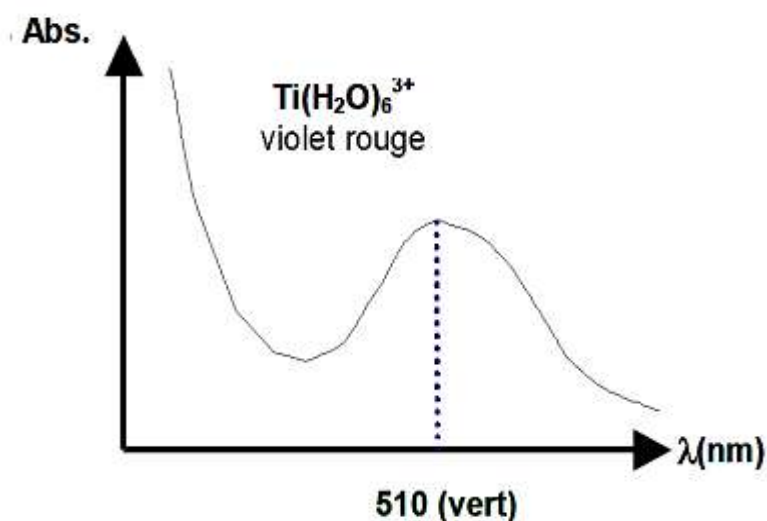


Figure V.3 : Bande d'absorption du complexe $Ti(H_2O)_6^{3+}$

V.6 Types de transitions électroniques

Les transitions électroniques correspondent au passage des électrons des orbitales moléculaires liantes et non liantes remplies, vers des orbitales moléculaires antiliantes non remplies. La longueur d'onde d'absorption dépend de la nature des orbitales mises en jeu. Le diagramme suivant illustre ceci pour des orbitales de type σ , π et n :

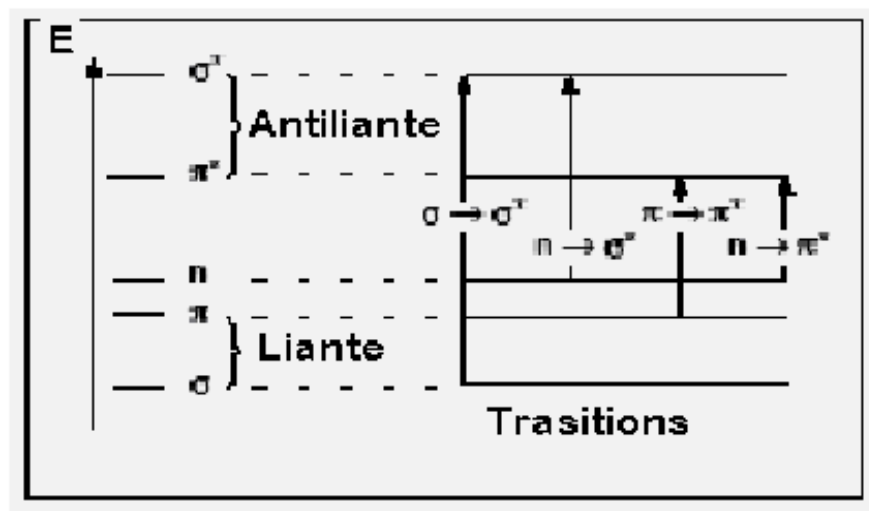


Figure V.4 : Diagramme illustrant les types de transitions

L'absorption d'un photon dans le domaine UV-visible peut souvent être attribuée à des électrons appartenant à de petits groupes d'atomes appelés chromophores ($C=C$, $C=O$, $C=N$, $C\equiv C$, $C\equiv N$...). La longueur d'onde d'absorption dépend de la nature des orbitales mises en jeu.

Les types de transitions électroniques sont les suivantes :

a-Transition $\sigma \rightarrow \sigma^*$

La grande stabilité des liaisons σ des composés organiques fait que la transition d'un électron d'une OM liante σ vers une OM antiliante σ^* demande beaucoup d'énergie. La bande d'absorption correspondante est intense et située dans l'UV-lointain, vers 130 nm. Ethane : $\lambda_{\max} = 135$ nm, $\epsilon = 10\,000$.

b-Transition $n \rightarrow \pi^*$

Cette transition résulte du passage d'un électron d'une OM non-liante n à une OM antiliante π^* . Ce type de transition a lieu dans le cas des molécules comportant un hétéroatome porteur de doublets électroniques libres appartenant à un système insaturé.

c-Transition $n \rightarrow \sigma^*$

Le transfert d'un électron du doublet n d'un hétéroatome (O, N, S, Cl..) à un niveau σ^* est observé pour les alcools, les éthers, les amines ainsi que pour les dérivés halogénés. Cette transition donne une bande d'intensité moyenne qui se situe à l'extrême limite du proche-UV.

Méthanol : $\lambda_{\max} = 183 \text{ nm}$, $\epsilon = 500$

Ether diéthylique : $\lambda_{\max} = 190 \text{ nm}$, $\epsilon = 2000$

Ethylamine : $\lambda_{\max} = 210 \text{ nm}$, $\epsilon = 800$.

d-Transition $\pi \rightarrow \pi^*$

La transition électronique dans les composés possédant une double liaison isolée conduit à une forte bande d'absorption vers 165-200 nm.

Sur le diagramme énergétique suivant sont situées ces transitions les unes par rapport aux autres dans le cas général.

Tableau V.1 : Exemples de transitions électroniques

Exemple	Transition	λ_{\max} , nm	ϵ
Ethylène	$\pi \rightarrow \pi^*$	165	15000
1-hexyne	$\pi \rightarrow \pi^*$	180	10000
Ethanal	$n \rightarrow \pi^*$	293	12
	$\pi \rightarrow \pi^*$	180	10000
Nitrométhane	$n \rightarrow \pi^*$	275	17
	$\pi \rightarrow \pi^*$	200	5000
Bromure de méthyle	$n \rightarrow \sigma^*$	205	200

e-Transition d – d

Dans les complexes des métaux de transition, on assiste sous l'effet du champ cristallin à une levée de dégénérescence des orbitales d.

En général, ces complexes sont colorés, par exemple, les solutions des complexes de cuivre(II) $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ qui sont bleues. Les absorptions dans le visible sont le plus souvent dues à une transition d'un électron d'une orbitale d peuplée à une orbitale d vide (Ex. un électron passe du niveau t_{2g} au niveau e_g pour une géométrie octaédrique).

On parle de transition d-d. Les coefficients d'extinction molaire sont souvent très faibles, de 1 à $100 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

IV.7 Additivité des absorbances :

La loi de Beer-Lambert est additive. Ceci veut dire que si on mesure l'absorbance A , dans une cuve d'épaisseur l , d'un mélange de deux composés 1 et 2 en solution dans un solvant, on obtiendra la même absorbance totale si la lumière passe successivement à travers deux cuves d'épaisseur l , placées l'une après l'autre, contenant l'une le composé 1 (Abs. A_1) et l'autre le composé 2 (Abs. A_2) (Le solvant doit être de même nature).

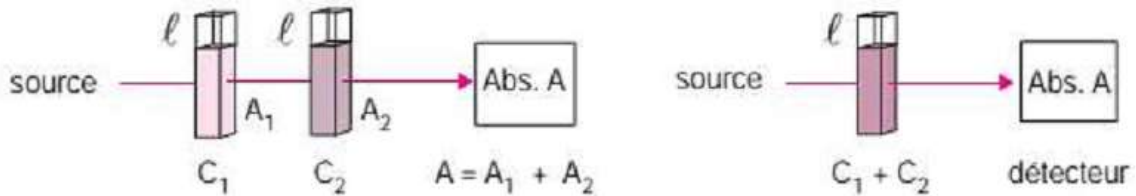


Figure V.5 Additivité des absorbances

Pour toute longueur d'onde, l'absorbance d'un mélange est égale à la somme des absorbances de chaque composant du mélange.

$$A = A_1 + A_2 = l (\epsilon_1 C_1 + \epsilon_2 C_2) \quad (\text{V.5})$$

V.8 Analyse multicomposants (MCA) :

Lorsqu'on est en présence d'un mélange de composés dont les spectres d'absorption individuels sont connus, on peut en déterminer la composition. Selon la loi d'additivité des absorbances, le spectre du mélange correspond à la somme pondérée des spectres de chacun des constituants.

V.8.1 Méthode algébrique de base :

Soit un mélange de trois composés a, b, c en solution de concentration (C_a, C_b, C_c). On mesure les absorbances de cette solution à trois longueurs d'onde λ_1, λ_2 et λ_3 , soit A_1, A_2 et A . Connaissant les valeurs des absorbances spécifiques de chacun des trois composés pris isolément pour ces trois longueurs d'onde on écrira, par application de la loi d'additivité des absorbances, le système suivant de trois équations (on suppose que le trajet optique des cuves utilisées est de 1 cm) :

$$\text{à } \lambda_1 \quad A_1 = \epsilon_a^1 C_a + \epsilon_b^1 C_b + \epsilon_c^1 C_c \quad (\text{V.5})$$

$$\text{à } \lambda_2 \quad A_2 = \epsilon_a^2 C_a + \epsilon_b^2 C_b + \epsilon_c^2 C_c \quad (\text{V.6})$$

$$\text{à } \lambda_3 \quad A_3 = \epsilon_a^3 C_a + \epsilon_b^3 C_b + \epsilon_c^3 C_c \quad (\text{V.7})$$

La résolution de ce système, qui correspond à une matrice $[3 \times 3]$, permet de trouver les trois concentrations cherchées C_a, C_b et C_c .

Cette approche donne de bons résultats quand les composés ont des spectres significativement différents, mais elle devient moins précise quand les spectres sont voisins puisqu'une petite erreur de mesure peut conduire à une variation importante du résultat.

V.8.2 Régression linéaire multilongueurs d'onde (méthode MLRA)

Les logiciels d'analyse quantitative peuvent utiliser un grand nombre de points extraits des spectres de l'échantillon à doser et des solutions d'étalonnage. À titre d'exemple est décrite, ci-après, une méthode de régression linéaire qui permet de neutraliser le bruit de fond et donc d'améliorer le résultat d'une analyse de deux composés connus, présents dans un échantillon. L'appareil utilise trois enregistrements mis en mémoire : un spectre de l'échantillon (qui contient le mélange des deux composés dont on veut trouver les concentrations) et deux spectres, dans le même domaine spectral, correspondant chacun à une solution de référence de concentration connue de l'un et de l'autre composé.

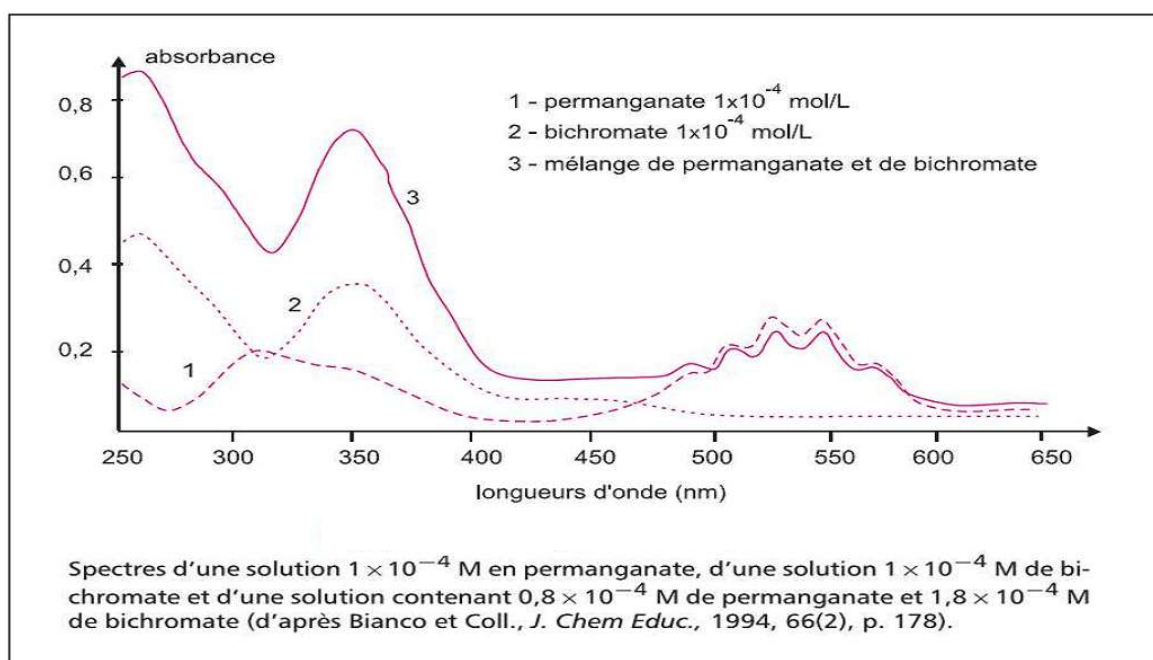


Figure V.6 : Analyse multicomposants

Pour chaque longueur d'onde, la loi d'additivité des absorbances permet d'écrire que l'absorbance du mélange considéré des deux composés (notés a et b), supposés n'interagissant pas l'un sur l'autre, est donnée par l'expression

$$A = \varepsilon_a l C_a + \varepsilon_b l C_b \quad (\text{V.8})$$

Pour chacun des deux spectres de référence, on a, en supposant que l'épaisseur des cellules de mesure est égale à 1 cm :

$$\text{Pour le composé a : } A_{\text{réf.a}} = \varepsilon_a \cdot C_{\text{réf.a}} \quad (\text{V.9})$$

$$\text{Pour le composé b : } A_{\text{réf.b}} = \varepsilon_b \cdot C_{\text{réf.b}} \quad (\text{V.10})$$

Ces deux dernières équations permettent de calculer les coefficients d'absorption ε de chaque constituant pur, à chaque longueur d'onde considérée. On peut donc déduire l'équation suivante :

$$A = \frac{A_{\text{réf.a}}}{C_{\text{réf.a}}} c_a + \frac{A_{\text{réf.b}}}{C_{\text{réf.b}}} c_b \quad (\text{V.11})$$

En divisant le premier membre par $A_{\text{réf.a}}$, on aura pour chaque longueur d'onde :

$$\left(\frac{A}{A_{\text{réf.a}}} \right) = \frac{c_a}{C_{\text{réf.a}}} + \frac{c_b}{C_{\text{réf.b}}} \cdot \left(\frac{A_{\text{réf.b}}}{A_{\text{réf.a}}} \right) \quad (\text{V.12})$$

Cette dernière équation est de la forme : $y = a x + b$

Les valeurs calculées sont sur une droite dont la pente et l'ordonnée à l'origine permettent de calculer c_a et c_b .

V.9 Applications de la spectroscopie UV-Visible

Les spectres UV fournissent généralement peu de renseignements sur la structure moléculaire des composés comparés aux spectres IR. Néanmoins, on les utilise soit pour une confirmation soit pour une identification grâce aux règles empiriques.

L'analyse quantitative par la spectrométrie UV-visible est très employée (beaucoup plus que l'analyse qualitative) grâce à l'utilisation de la loi de Beer-Lambert.

Comme applications, on peut citer :

- Dosage des molécules actives dans une préparation pharmaceutique
- Dosage du fer dans l'eau ou dans un médicament
- Dosage du benzène dans le cyclohexane
- D'autres applications sont connues pour le Contrôle Qualité ou le suivi de la cinétique d'une réaction, la détermination des constantes de dissociation des acides ou des constantes de complexation, la détermination des masses molaires...

Exercices d'applications
(Spectrophotométrie UV-Visible)

Exercice N°1 :

Une eau polluée contient du chrome ($M = 52 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) à la concentration massique de $0,1\cdot 10^{-3} \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

On choisit, pour son dosage, le complexe Cr^{VI} avec le diphénylcarbazine ($\lambda_{\text{max}} = 540 \text{ nm}$, $\xi_{\text{max}} = 41700 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Proposer une valeur du trajet optique de la cuve pour que l'absorbance soit de l'ordre de 0,40.

Exercice N°2 :

Une solution aqueuse de permanganate de potassium ($c = 1,28 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) a une transmittance de 0,5 à 525 nm, si on utilise une cuve de 10 mm de parcours optique.

- Calculer le coefficient d'absorption molaire du permanganate pour cette longueur d'onde ?
- Si on double la concentration, calculer l'absorbance et la transmittance de la nouvelle solution ?

Exercice N°3 :

Les peintures et vernis extérieurs doivent être protégés de l'effet des radiations solaires pour ralentir leur dégradation (photolyse et réactions photochimiques).

Quelle doit être la concentration, en $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, d'un additif UV pour que 90 % du rayonnement soit absorbé sur une épaisseur de 0,3 mm?

Données : $M = 500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; $\xi_{\text{max}} = 15000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour $\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$.

Exercice N°4 :

On veut déterminer la concentration (mol/L) de deux sels A ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2$) et B ($\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$) dans un échantillon inconnu en solution aqueuse. On enregistre un spectre dans le visible de chacun de ces deux composés pris isolément en solution aqueuse ainsi que de la solution échantillon à analyser. Le trajet optique des cuves utilisées est 1 cm.

Les valeurs des absorbances mesurées à 510 et 575 nm sur les trois spectres sont les suivantes :

le composé A ($1,5 \times 10^{-1} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) présente une absorbance de 0,714 à 510 nm et de 0,0097 à 575 nm. Le composé B ($6 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) présente une absorbance de 0,298 à 510 nm et de 0,757 à 575 nm. La solution à doser présente une absorbance de 0,40 à 510 nm et de 0,577 à 575 nm.

- Calculer les 4 coefficients d'absorption molaire $\epsilon_A(510)$, $\epsilon_B(510)$, $\epsilon_A(575)$ et $\epsilon_B(575)$.
- Calculer les concentrations molaires ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) des deux sels A et B dans la solution échantillon.

Exercice N°5 :

Application de la méthode MLRA (Régression linéaire multilongueurs d'onde)

On veut déterminer la concentration (mol/L) en KMnO_4 et $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ dans une solution aqueuse inconnue par la méthode MLRA (Régression linéaire multilongueurs d'onde).

On prépare deux solutions de référence, l'une KMnO_4 (10^{-4} mol/L) et l'autre en $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (10^{-4} mol/L). Les spectres de la solution inconnue et des deux solutions de référence sont enregistrés entre 250 et 400 nm. Le trajet optique des cuves utilisées est 1 cm. À partir des résultats, au nombre de 5, rassemblés dans le tableau ci-dessous :

- a) Trouver l'équation de la droite de régression

$$A_{\text{échant}}/A_{\text{permanganate}} = f(A_{\text{bichromate}}/A_{\text{permanganate}}).$$

- b) Calculer les concentrations molaires (mol/L) en KMnO_4 et $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ dans la solution échantillon.

λ (nm)	Abs MnO_4^- (réf.)	Abs $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ (réf.)	$A_{\text{échantillon}}$
266	0,042	0,410	0,766
288	0,082	0,283	0,571
320	0,168	0,158	0,422
350	0,125	0,318	0,672

Corrigés des exercices (Spectrophotométrie UV-Visible):

Exercice N°1 :

Données : $C = 0,1 \cdot 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$, $\lambda_{\text{max}} = 540 \text{ nm}$, $A = 0,40$

Coefficient d'absorption molaire : $\varepsilon = 41700 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

Avant d'appliquer la loi de Beer-Lambert, il faut vérifier les unités des paramètres qui rentrent dans la formule :

La concentration du chrome dans l'eau polluée doit être exprimée en mol.L^{-1} (concentration molaire), on doit donc diviser sur la masse molaire :

$$C = 0,1 \cdot 10^{-3} / 52 = 1,92 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$$

Selon la loi de Beer-Lambert, pour une longueur d'onde maximale on : $A = \varepsilon.l.c$

D'où : $l = A / \varepsilon.c$; **l représente le trajet optique de la cuve**

Application numérique :

$$l = 0,4 / (41700 \cdot 1,92 \cdot 10^{-6}) = 4,99 \text{ cm environ } \mathbf{5 \text{ cm}}$$

Exercice N°2 :

Données : $C = 1,28 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ C étant la concentration molaire d'une solution aqueuse de permanganate de potassium

Transmittance : T = de 0,5 à une longueur d'onde égale 525 nm

- a- Pour calculer le coefficient d'absorption molaire du permanganate pour cette longueur d'onde on applique la loi de Beer-Lambert mais pour cela on doit tout d'abord trouver la valeur de l'absorbance correspondante :

$$A = \text{Log} 1/T = \text{Log} 1/0,5 = 0,3$$

$$A = \varepsilon.l.c \text{ d'où } \varepsilon = A/l.c = 0,3 / (1 \cdot 1,28 \times 10^{-4}) = 2344 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$$

$$\varepsilon = \mathbf{2344 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}}$$

- b- Calcul de la transmittance de la solution lorsqu'on double la concentration :

Puisque $A = \varepsilon.l.c$, en doublant la concentration l'absorbance A sera aussi doublée donc la nouvelle valeur de l'absorbance est $A = 2 \cdot 0,3 = 0,6$; **A = 0,6**

$$\text{D'où : } \text{Log} 1/T = A = 0,6 \quad \Longrightarrow \quad \mathbf{T = 0,25}$$

Exercice N°3 :

On veut calculer la concentration, en g.L^{-1} donc **massique**, d'un additif UV pour que 90 % du rayonnement soit absorbé sur une épaisseur de 0,3 mm ($l = 0,03 \text{ cm}$ trajet optique de la cuve) :

Données : $M = 500 \text{ g.mol}^{-1}$; $\xi_{\text{max}} = 15000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ pour $\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$.

Si 90% du rayonnement est absorbé on a :

$$T = 100 - 90 / 100 = 10 / 100 = 0.1$$

$$\text{Donc } A = \text{Log } 1/T = \text{Log } 10 = 1$$

Par application de la loi de Beer-Lambert on a: $A = \epsilon \cdot l \cdot c$

$$\text{D'où } c = A / l \cdot \epsilon = 1 / (15000 \cdot 0,03) = 2,22 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$$

$$c = 2,22 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$$

Pour trouver une concentration massique à partir d'une concentration molaire on doit multiplier par la masse molaire

$$c = 2,22 \cdot 10^{-3} \cdot 500 = 1.11 \text{ g.L}^{-1}$$

Exercice N° 4:

Calcul des coefficients d'absorption molaire $\epsilon_{A(510)}$, $\epsilon_{B(510)}$, $\epsilon_{A(575)}$ et $\epsilon_{B(575)}$:

- a- A partir des données de l'exercice et par application de la loi de Beer-Lambert on trouve :

$$\epsilon_{A(510)} = 4,76$$

$$\epsilon_{B(510)} = 4,96$$

$$\epsilon_{A(575)} = 0,64$$

$$\epsilon_{B(575)} = 12,61$$

- b- Concentrations molaires ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) des deux sels A et B dans la solution échantillon.

$$C_A = 1,2 \cdot 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1} \quad \text{et} \quad C_B = 2 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$$

Exercice N°5 :

Application de la méthode MLRA (Régression linéaire multilongueurs d'onde)

Données : En admettant que a représente KMnO_4 et b représente $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ on a:

$$C_{\text{KMnO}_4} = C_a = 10^{-4} \text{ mol/L}$$

$$C_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7} = C_b = 10^{-4} \text{ mol/L}$$

La méthode de la Régression linéaire multilongueurs d'onde (MLRA) est une méthode déduite de la loi d'additivité des absorbances qui nous permettra de déterminer les valeurs des concentrations inconnues.

Pour cela on va appliquer la formule suivante :

$$\left(\frac{A}{A_{\text{réf.a}}} \right) = \frac{c_a}{c_{\text{réf.a}}} + \frac{c_b}{c_{\text{réf.b}}} \cdot \left(\frac{A_{\text{réf.b}}}{A_{\text{réf.a}}} \right)$$

Le tableau suivant récapitule les données dont on peut utiliser pour applique cette méthode dite MLRA :

λ (nm)	Abs MnO_4^- (réf.)	Abs $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ (réf.)	$A_{\text{échantillon}}$
266	0,042	0,410	0,766
288	0,082	0,283	0,571
320	0,168	0,158	0,422
350	0,125	0,318	0,672

Pour déduire Ca et Cb il faut tracer la droite correspondante à la fonction suivante :

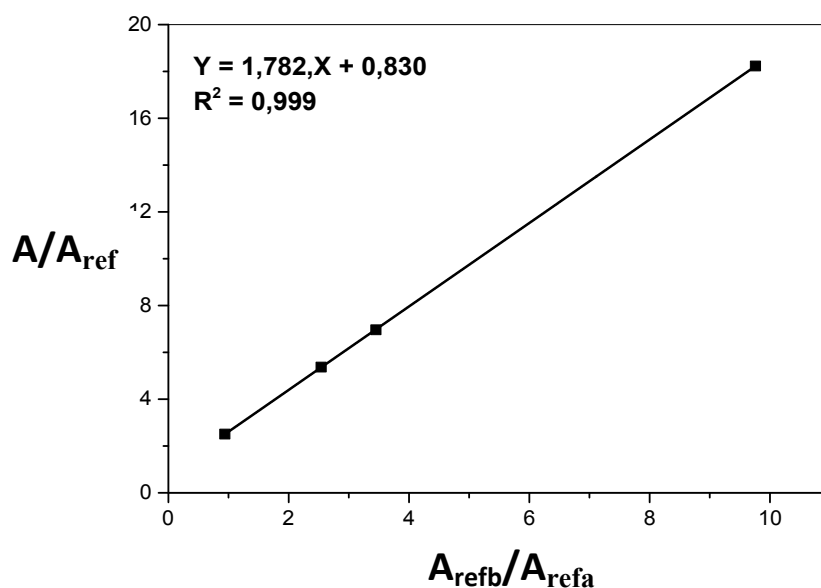
$$A/A_{\text{refa}} = f(A_{\text{refb}}/A_{\text{refa}})$$

Pour cela il faut ajouter au tableau deux colonnes :

Un correspondant à A/A_{refa} et l'autre à $A_{\text{refb}}/A_{\text{refa}}$

λ (nm)	Abs MnO_4^- (réf.) (A_{refa})	Abs $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ (réf.) (A_{refb})	$A_{\text{échantillon}}$	A/A_{refa}	$A_{\text{refb}}/A_{\text{refa}}$
266	0,042	0,410	0,766	18.23	9.76
288	0,082	0,283	0,571	6.96	3.45
320	0,168	0,158	0,422	2.51	0.94
350	0,125	0,318	0,672	5.37	2.54

La droite tracée a une équation de la forme : $y = a.x + b$



Représentation graphique de la fonction : $A/A_{\text{refa}} = f(A_{\text{refb}}/A_{\text{refa}})$

Les valeurs de la pente ainsi que de l'ordonnée à l'origine sont :

$$\mathbf{a = 1.782 \quad \text{et} \quad \mathbf{b = 0.830}}$$

$$\text{donc on a : } \mathbf{y = 1.782 x + 0.830}$$

Par analogie avec l'équation :

$$\left(\frac{A}{A_{\text{réf.a}}} \right) = \frac{C_a}{C_{\text{réf.a}}} + \frac{C_b}{C_{\text{réf.b}}} \cdot \left(\frac{A_{\text{réf.b}}}{A_{\text{réf.a}}} \right)$$

$$\text{On trouve que } \mathbf{a = 1.782 = C_b/C_{\text{réf.b}}}$$

$$\mathbf{b = 0.830 = C_a/C_{\text{réf.a}}}$$

Connaissant les valeurs de $C_{\text{réf.a}}$ (10^{-4} mol/L) et $C_{\text{réf.b}}$ (10^{-4} mol/L) on peut alors déduire les valeurs des concentrations C_a et C_b :

$$\mathbf{C_a = C_{\text{Permanganate}} = 0.83 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}}$$

$$\mathbf{C_b = C_{\text{Bichromate}} = 1.78 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}}$$

Chapitre VI

Spectroscopie Infra rouge

Introduction :

Le rayonnement infrarouge (IR) fut découvert en 1800 par Frédéric Wilhelm Hershel. Ces radiations localisées au-delà des longueurs d'onde dans le rouge, sont situées entre la région du spectre visible et des ondes hertziennes.

Dans la région IR du spectre électromagnétique, les molécules absorbent la lumière et subissent une excitation vibrationnelle.

La spectroscopie infrarouge apporte une aide précieuse car elle permet de confirmer la présence ou l'absence de groupements fonctionnels.

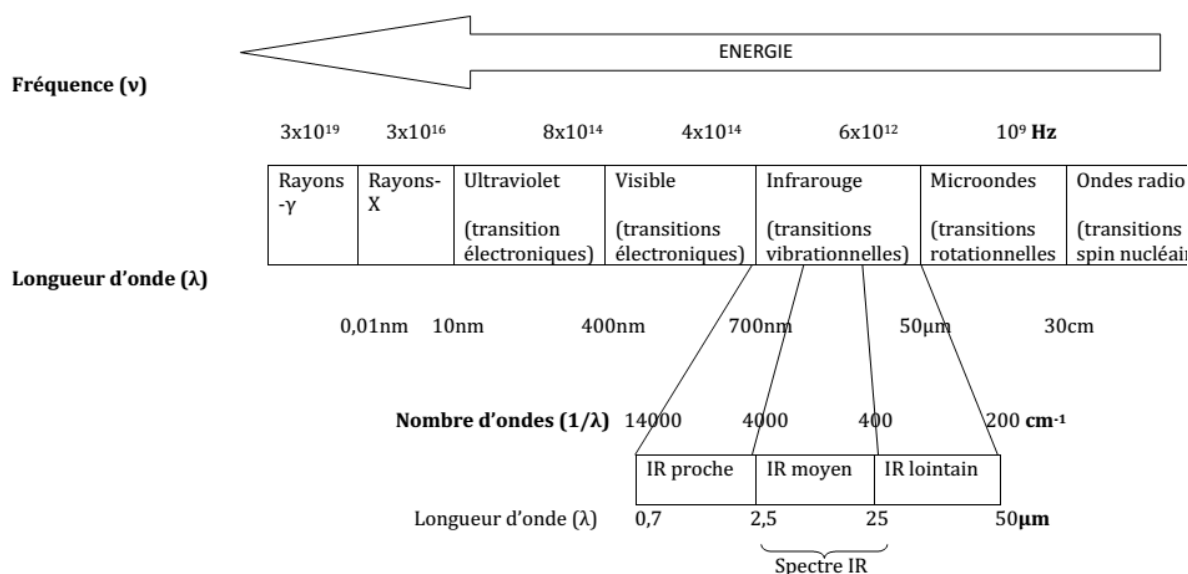


Figure VI.1 : Spectre électromagnétique

VI.1 Présentation des spectres infrarouges :

En général, en spectroscopie Infrarouge, on représente la transmittance, c'est à dire l'intensité transmise, comptée de 0 à 100%, par rapport à l'intensité du faisceau incident, au lieu de l'intensité absorbée. Ainsi, sur un spectre I.R. on trouve en abscisse le nombre d'onde (en cm^{-1}) et en ordonnée la transmittance T exprimée en pourcentage. Une transmittance de 100% signifie qu'il n'y a pas d'absorption, donc en I.R. les bandes d'absorption pointent vers le bas.

On qualifie une bande ou un pic en indiquant :

- La valeur du nombre d'onde correspondant au minimum de transmittance
- L'intensité du pic (fort (intense) / moyen ou faible)
- La largeur de la bande (étroite ou large).

Exemple :

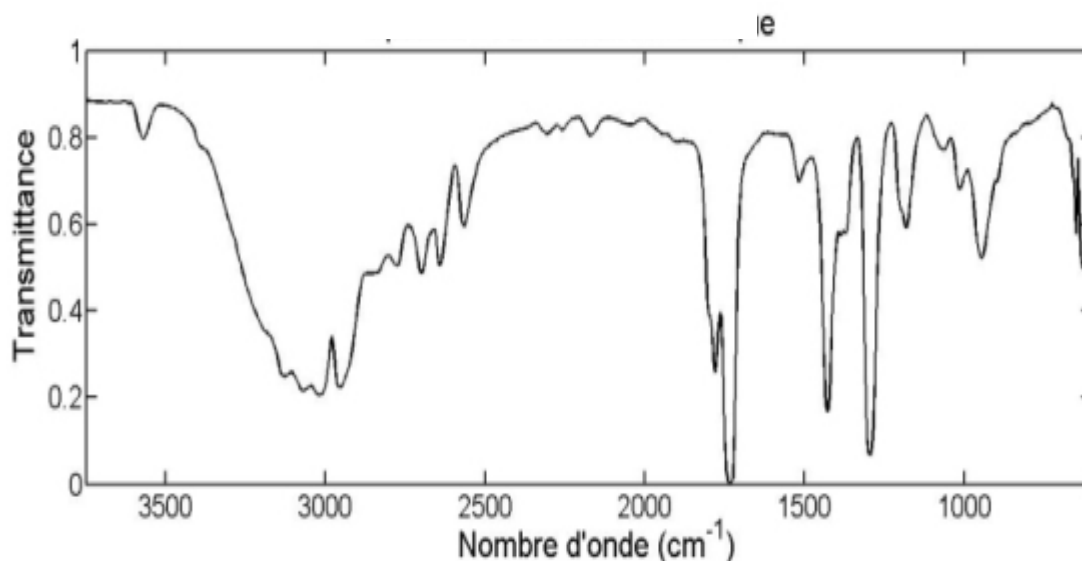


Figure VI.2 : Spectre IR de l'acide éthanoïque

VI.2 Principe de la spectroscopie infrarouge :

Pour la spectroscopie d'absorption IR, le rayonnement émis par la source polychromatique n'est généralement pas assez énergétique pour provoquer des transitions électroniques, mais il induit des transitions entre les niveaux d'énergie vibrationnelle. La transition vibrationnelle est également observée lors de la diffusion Raman qui est une spectroscopie de diffusion inélastique utilisant une radiation monochromatique (laser) pour exciter les électrons d'une liaison chimique. Lors de cette interaction il y a émission de radiations à des longueurs d'onde différentes de celle de la radiation incidente.

L'étude d'un spectre I.R permet :

- D'identifier les groupes fonctionnels d'un composé inconnu.
- Vérifier la pureté d'un produit connu, par l'absence de bande signalant la présence de composé étrangers.
- De suivre un processus réactionnel en étudiant l'apparition ou la disparition des bandes caractéristiques de certains groupes fonctionnels.

VI.2.1 Vibration des molécules diatomiques :

a- Modèle classique :

L'excitation vibrationnelle peut être envisagée en considérant deux atomes A et B unis par une liaison comme étant deux masses m_A et m_B reliées par un ressort de constante de raideur k .

Dans cette représentation, les masses oscillent autour de leur position d'équilibre avec une fréquence ν_0 , indépendante de l'élongation mais fonction de la constante de raideur k et de la masse réduite μ du système.

Le seul point invariant du système est le centre de gravité, on se place alors dans le référentiel barycentrique et on considère le mobile réduit de masse μ tel que :

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{m_A} + \frac{1}{m_B} \quad (\text{VI.1})$$

La pulsation caractéristique de l'oscillateur est donc :

$$\omega_0 = \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad \text{soit} \quad \nu_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (\text{VI.2})$$

Lorsque la molécule diatomique est soumise à l'action d'une onde électromagnétique de fréquence ν , celle-ci est absorbée si $\nu = \nu_0$, on dit qu'il y a résonance.

Le nombre d'onde correspondant est donné selon la **loi de Hooke** par la relation suivante :

$$\sigma_0 = \frac{\nu_0}{c} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (\text{VI.3})$$

Plus la multiplicité de la liaison est importante, plus la constante k est grande.

La valeur de k (donc de σ_0) renseigne sur la force d'une liaison :

Plus k est grand, plus la liaison est forte et plus le nombre d'onde d'absorption σ_0 est élevé.

K est la constante de force de la liaison.

Exemples :

Tableau VI.1 : Paramètres liés à la nature de la liaison carbone-carbone.

liaison	C-C	C=C	C≡C
ℓ (pm) longueur de liaison	154	134	121
D_{A-B} (kJ.mol ⁻¹) Energie de dissociation	345	615	812
σ_0 (cm ⁻¹) Nombre d'onde d'absorption	600 à 1500	1650	2260
K (N.m ⁻¹) Constante de force	145 à 900	970	1800

b- Modèle quantique :

L'énergie vibrationnelle E_v des niveaux d'énergie de vibration est quantifiée.

E_v est donnée par la relation :

$$E_v = h\nu_0\left(v + \frac{1}{2}\right) \quad (\text{VI.4})$$

v est un entier positif ou nul appelé nombre quantique vibrationnel. Avec ν_0 fréquence donnée par la loi de Hooke dans le modèle classique.

Remarques :

- Même dans son niveau fondamental ($v=0$), une molécule diatomique possède une énergie de vibration : il n'existe pas de molécule au repos.
- D'après la relation précédente, les niveaux énergétiques sont équidistants. Les transitions permises correspondent à $\Delta v = +1$, c'est-à-dire à l'absorption d'un rayonnement électromagnétique de fréquence ν_0 .
- Les transitions entre niveaux vibrationnels s'accompagnent aussi de transitions rotationnelles. Cela explique les bandes d'absorption plus ou moins larges sur le spectre au lieu des pics d'absorption.
- Pour observer une absorption notable en IR, il faut une variation du moment dipolaire de la molécule lors de la vibration. Ainsi les liaisons symétriques absorbent peu.

VI.2.2 Vibration des molécules polyatomiques

Dans ce cas, les liaisons subissent non seulement des mouvements de vibration, d'élongation, mais aussi d'autres mouvements de déformation angulaire qui modifient les angles des liaisons. Ces modes de vibration comprennent des vibrations de valence et des vibrations de déformation.

On appelle :

- Vibration d'élongation ou de valence (stretching)** : pour lesquelles la distance interatomique croît et décroît périodiquement, tout en restant dans l'axe de la liaison.
- Vibration de déformation angulaire (bending)** : pour lesquelles il y a une variation périodique des angles de valence.

Les modes de vibration peuvent être symétriques ou asymétriques. Par ailleurs à chacun d'eux correspond une fréquence de résonance ν_0 .

Nombre de modes de vibration : Pour une molécule comportant n atomes :

Le nombre de mode de vibration de celle-ci est donné par $3n-6$.

Si la molécule est linéaire, le nombre de mode de vibration est donné par $3n-5$.

Exemple : la molécule d'eau

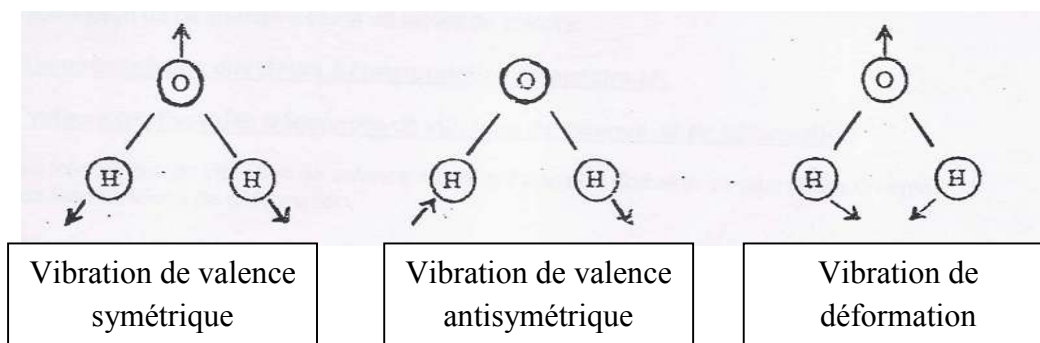


Figure VI.3 : Représentation schématisques des types de vibrations des molécules polyatomiques

VI.3 Etude des principales bandes caractéristiques :

Pour interpréter un spectre IR, on utilise des tables indiquant les plages d'absorption caractéristiques des différentes fonctions chimiques.

On peut en fait distinguer trois régions principales:

- **(4000-1500 cm^{-1}): Zone des fonctions**, c'est dans cette région que se trouvent les pics correspondant aux transitions vibrationnelles d'allongement de la plupart des groupes fonctionnels (R-C-H, R-OH, R-N-H, R-CH=O, RCO-R, R-COOH,.....)
- **(1500-1000 cm^{-1}): Empreinte digitale**, il s'agit d'une région comportant de nombreux petits pics correspondant aux transitions vibrationnelles de déformation. Cette région est totalement caractéristique de la molécule.
- **(1000-400 cm^{-1}): Région de faible énergie**, on observe surtout des transitions vibrationnelles de déformation hors du plan des liaisons C-H des alcènes et des composés aromatiques. Il s'agit en fait d'une région moins importante que les deux précédentes.

Pour exploiter un spectre IR :

En général, on se limite au repérage et à l'identification des bandes caractéristiques des groupes fonctionnels, grâce aux tables existantes et à la comparaison du spectre étudié (l'empreinte avec un spectre de référence).

VI.4 Appareillage :

VI.4.1 Principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre IR :

Le principe du spectrophotomètre IR est le même que celui utilisé en UV-visible : l'appareil envoie des radiations de fréquences bien déterminées modifiées progressivement : balayage en fréquence dans le domaine du proche infra rouge.

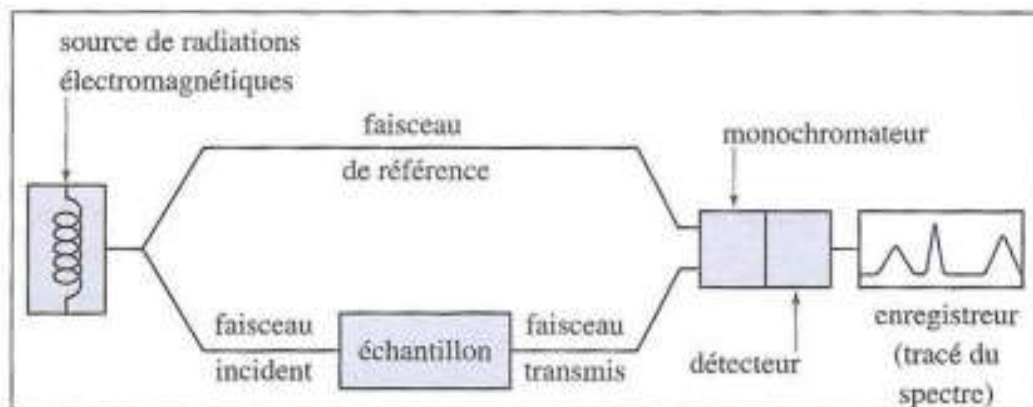


Figure VI.4 : Schéma du principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre IR

Actuellement on utilise des spectrophotomètres infrarouge à transformée de Fourier, ce qui permet d'obtenir toutes les fréquences en même temps sans effectuer un balayage. On obtient les spectres plus rapidement.

VI.4.2 Préparation de l'échantillon :

La préparation dépend de l'appareil utilisé : on peut soit analyser directement le composé pur soit le solubiliser dans un solvant (pour un liquide) ou le disperser dans un solide (pour un solide) avant l'analyse.

- Analyse du composé pur :

On place quelques gouttes (pour un liquide) ou une pointe de spatule (pour un solide) entre des plaques faites d'un sel qui n'absorbe pas dans le domaine de l'infrarouge (NaCl, KBr, AgCl).

- Analyse du composé dilué ou dispersé :

Pour les solides, on prépare une pastille de bromure de potassium (KBr) à l'aide d'une presse dans laquelle on a dispersé le composé à analyser.

Pour les liquides, on mélange le composé à un solvant inerte (le plus souvent le tétrachlorure de carbone). Ce solvant absorbe dans l'infrarouge, mais on peut s'affranchir de ce problème en plaçant une cellule de compensation contenant le solvant pur sur le trajet du faisceau de référence.

VI.5 Fréquences de vibrations de certaines fonctions chimiques :

Les valeurs des fréquences de vibrations de certaines fonctions sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau VI.2

Groupement	Liaison	Nombre d'onde	Vibration	Intensité
Alcools primaires	O-H	3640	élongation	intense et large
Alcools secondaires	O-H	3630	élongation	intense et large
Alcools tertiaires	O-H	3620	élongation	intense et large
Acides	O-H	3550-3500	élongation	intense et très large
Amines primaires	N-H	3500	élongation asymétrique	faible
		3410	élongation symétrique	faible
Amides primaires	N-H	3500	élongation asymétrique	faible
		3400	élongation symétrique	faible
Amines secondaires	N-H	3350-3310	élongation	faible
Amides secondaires	N-H	3400-3300	élongation	faible
≡C-H (alcynes)	C-H	3340-3300	élongation	moyenne et fine
Aromatiques	C-H	3080-3030	élongation	moyenne
=CH ₂ (alcènes)	C-H	3080	élongation asymétrique	moyenne
		2975	élongation symétrique	moyenne
-CH ₃ (alcanes)	C-H	2960	élongation asymétrique	forte
		2870	élongation symétrique	moyenne
-CH ₂ -	C-H	2925	élongation asymétrique	forte
		2850	élongation symétrique	forte
-C-H	C-H	2890	élongation	faible
Aldéhydes	C-H	2830-2720	élongation asymétrique	faible
		2650	élongation symétrique	moyenne
Nitrile	-C≡N	2260-2210	élongation	moyenne à forte
Aromatiques	C-H	2000-1660 plusieurs bandes	harmonique des déformations C-H	faible
Aldéhydes aliphatiques	C=O	1740-1720	élongation	forte
Aldéhydes aromatiques	C=O	1715-1695	élongation	forte
Cétones linéaires	C=O	1725-1705	élongation	forte
Acides	C=O	1800-1740	élongation	forte
Esters aliphatiques	C=O	1750-1730	élongation	forte
Cétones aromatiques	C=O	1700-1670	élongation	forte

Tableau VI.2 (Suite)

Amides secondaires	C=O	1700-1630	élongation	forte
Amides primaires	C=O	1690-1620	élongation	forte
Alcane	C-C	1000-1250	élongation	forte
Alcène	C=C	1645	élongation	moyenne
Aromatiques	C=C	1600 et 1500	élongation	variable
Alcyne	C≡C	2150-2100	élongation	faible
Amides primaires	N-H	1640-1560	déformation cisaillement	forte à moyenne
Amides secondaires	N-H	1580-1490	déformation	très faible
Amides primaires	N-H	1650-1590	déformation	moyenne
Amides secondaires	N-H	1570-1510	déformation	
-CH ₂ -	C-H	1470	déformation cisaillement	moyenne
-CH ₃ (alcanes)	C-H	1460 1380	déformation asymétrique déformation symétrique	moyenne
-CH	C-H	1340	déformation	faible
Alcools	O-H	1410-1330	déformation dans le plan	
Acides	O-H	1380-1280	déformation dans le plan	moyenne
Amides	C-N	1230-1030	élongation	moyenne
Amides aromatiques	C-N	1360-1180	élongation	moyenne à forte
Esters	C-O	1300-1050	élongation 2 bandes	
Acides	C-O	1190-1075	élongation	forte
Alcools tertiaires	C-O	1150	élongation	variable
Ether	C-O	1150-1070	élongation	
Alcools secondaires	C-O	1100	élongation	variable
Alcools primaires	C-O	1050	élongation	variable
Aromatiques	C-H	900-700	déformation dans le plan bandes caractéristiques du type de substitution	variable
Amine primaire	N-H	900-650	déformation torsion	moyenne et large
(CH ₂) _n	C-H	725-720	déformation balancement n>4	faible

Tableau VI.3 : Fréquences de vibration du benzène substitué en cm^{-1}

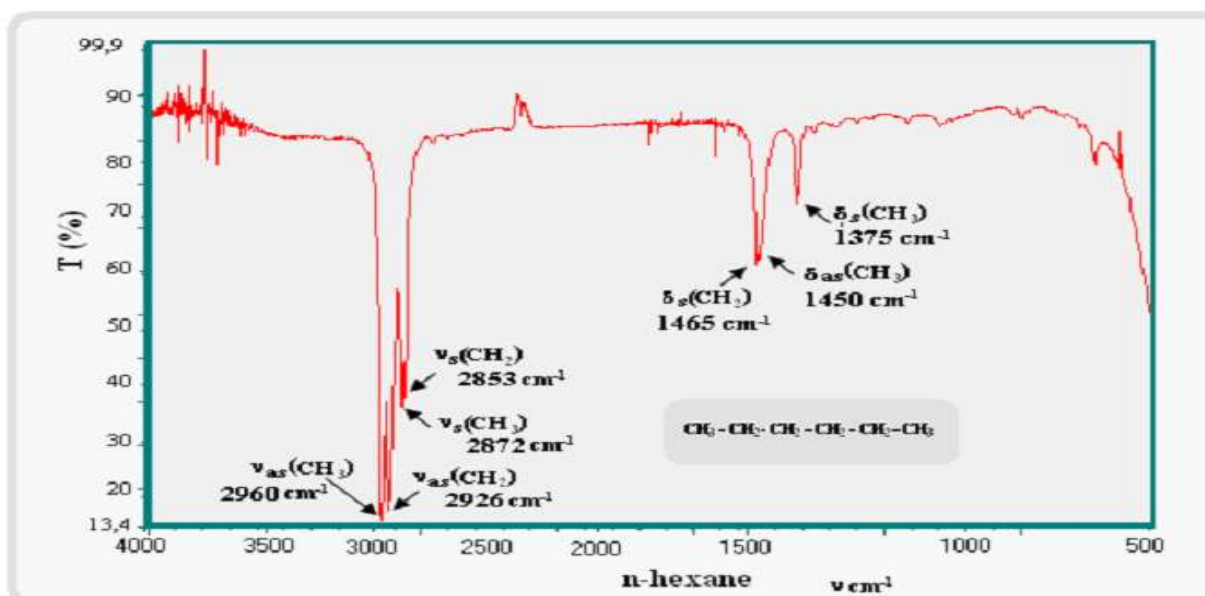
$\text{C}_{\text{sp}^2}-\text{H}$ (aromatique)	Valence	3030-3080	Moyenne
$\text{C}_{\text{sp}^2}-\text{H}$ (aromatique) monosubstitué	Déformation hors du plan	690 – 770	forte
$\text{C}_{\text{sp}^2}-\text{H}$ (aromatique) o-disubstitué	Déformation hors du plan	735 - 770	forte
$\text{C}_{\text{sp}^2}-\text{H}$ (aromatique) m-disubstitué	Déformation hors du plan	680 – 725	moyenne
$\text{C}_{\text{sp}^2}-\text{H}$ (aromatique) p-disubstitué	Déformation hors du plan	750- 810	forte
$\text{C}_{\text{sp}^2}-\text{H}$ (aromatique) 1,2,3-trisubstitué	Déformation hors du plan	800 - 860	forte
$\text{C}_{\text{sp}^2}-\text{H}$ (aromatique) 1,2,4-trisubstitué	Déformation hors du plan	685 – 720	moyenne
$\text{C}_{\text{sp}^2}-\text{H}$ (aromatique) 1,3,5-trisubstitué	Déformation hors du plan	770- 800	forte
$\text{C}_{\text{sp}^2}-\text{H}$ (aromatique) 1,3,5-trisubstitué	Déformation hors du plan	860 - 900	moyenne
$\text{C}_{\text{sp}^2}-\text{H}$ (aromatique) 1,3,5-trisubstitué	Déformation hors du plan	675 – 730	forte
$\text{C}_{\text{sp}^2}-\text{H}$ (aromatique) 1,3,5-trisubstitué	Déformation hors du plan	810 - 865	forte

VI.6 Spectres infrarouges de quelques fonctions organiques :

Les spectres IR sont donc tracés dans l'intervalle maximal $[400, 4000]$ (cm^{-1}), la grandeur portée en ordonnée étant la transmittance $T = I/I_0$, I étant l'intensité transmise par l'échantillon et I_0 l'intensité transmise par la référence.

a- Les alcanes

Exemple : n-hexane



On trouve principalement les vibrations d'élongation de la liaison C–H entre 3000 et 2840 cm^{-1} . Nous retrouvons ici les fréquences suivantes :

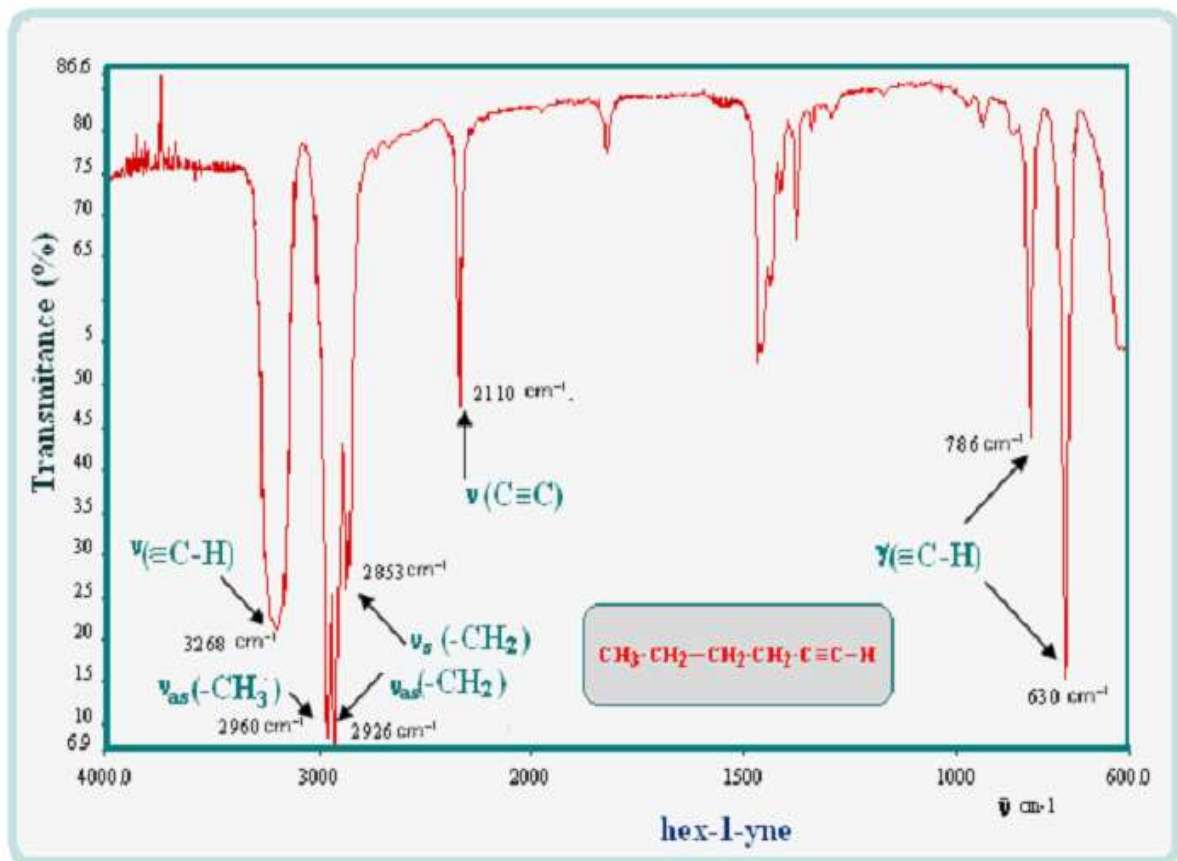
$$\begin{array}{ll} \nu_{\text{as}}(\text{CH}_3) : 2960 \text{ cm}^{-1} & \nu_{\text{s}}(\text{CH}_3) : 2872 \text{ cm}^{-1} \\ \nu_{\text{as}}(\text{CH}_2) : 2926 \text{ cm}^{-1} & \nu_{\text{s}}(\text{CH}_2) : 2853 \text{ cm}^{-1} \end{array}$$

Vers 1400 cm^{-1} se situent les vibrations de déformation dans le plan des liaisons C-H :

$$\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3) : 1450 \text{ cm}^{-1} \quad \delta_{\text{s}}(\text{CH}_3) : 1375 \text{ cm}^{-1} \quad \delta_{\text{s}}(\text{CH}_2) : 1465 \text{ cm}^{-1}$$

Une vibration de déformation hors du plan des liaisons CH_2 apparaît à 722 cm^{-1}

b- Les alcynes

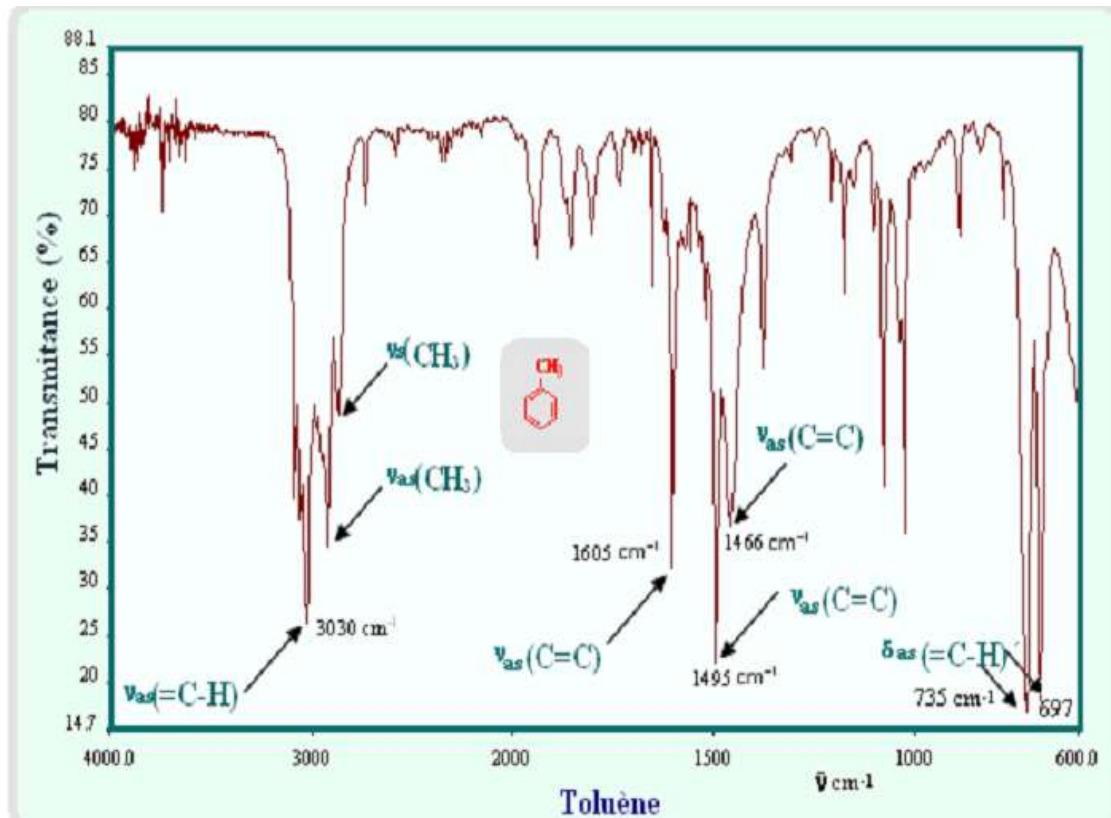


Il faut remarquer la faible bande de l'élongation $\text{C}_{\text{sp}} \equiv \text{C}_{\text{s}}$ à 2110 cm^{-1} .

Par contre, la bande d'élongation $\equiv \text{C}_{\text{sp}} - \text{H}$ des alcynes monosubstitués est toujours intense.

c- Composés aromatiques monosubstitués

Exemple : toluène



Dans ces cas, il faut toujours s'intéresser aux bandes des basses fréquences de 900 à 650 cm^{-1} . C'est là que l'on trouve les renseignements concernant le nombre de substituants du cycle aromatique et leur position l'un par rapport à l'autre.

Exercices d'applications
(Spectroscopie Infrarouge)

Exercice N°1

Calculer la valeur de la constante de force pour la vibration d'élongation de la liaison C=O produisant une absorption à 1715cm^{-1} . Même question pour la vibration de la liaison simple C-O produisant une absorption à 1050cm^{-1} .

Exercice N°2

On considère une vibration d'élongation C-H donnant lieu à une absorption à 3100cm^{-1} . Quelle sera la valeur du nombre d'onde de l'absorption correspondante de l'homologue deutérié ?

(On considérera que la valeur de la constante de force est la même dans les deux cas)

Exercice N°3

La liaison entre deux atomes d'une molécule biatomique est caractérisée par une constante de force de 1000N/m . Cette liaison est responsable d'une absorption située à 2000cm^{-1} . En admettant que l'énergie de la radiation incidente est transformée en énergie de vibration, trouver une valeur approchée de l'augmentation de l'élongation maximum de cette liaison.

Exercice N°4

- Soit la constante de la force de la molécule HF, $k_{\text{HF}} = 966\text{N.m}^{-1}$

Données : (H : $A = 1\text{g.mol}^{-1}$; F : $A = 19\text{g.mol}^{-1}$, Nombre d'Avogadro $N_A = 6,023 \cdot 10^{23}$)

- Calculer la fréquence d'absorption de vibration de cette molécule.
- Calculer les valeurs d'énergie, exprimée en joule, correspondant aux niveaux de vibrations : $v = 0, 1, 2$ et 3 de la molécule HF.
- Quelle est la valeur de l'élongation maximale de la liaison r pour l'état fondamentale ($v = 0$) ? La comparer à la valeur de la longueur de liaison ($r_e = 0.0917\text{nm}$ avec r_e la distance inter nucléaire à l'équilibre (de vibration) et r la distance réelle des deux atomes au temps t).
- Calculer le nombre d'onde en cm^{-1} de la raie d'absorption IR de la molécule HF en solution.

Données : Nombre d'Avogadro $N_A = 6,023 \cdot 10^{23}$

C (célérité ou vitesse de la lumière) = $3 \cdot 10^8\text{m/s}$; Constante de planck : $h = 6,62 \cdot 10^{-34}\text{J/s}$

Corrigés des exercices (Spectroscopie Infrarouge)

Exercice N°1

Calcul de la valeur de la constante de force pour la vibration d'élongation de la liaison C=O

Données : $\bar{\nu} = 1715 \text{ cm}^{-1}$

Pour la liaison C-O : on a $\bar{\nu} = 1050 \text{ cm}^{-1}$

Pour modéliser les vibrations des liaisons, on se réfère à l'oscillateur harmonique, ensemble formé par deux masses pouvant glisser sans frottement sur un plan et réunies par un ressort.

Si on écarte les deux masses d'une valeur x_0 par rapport à la distance d'équilibre

Re et qu'on relâche le système, celui-ci se met à osciller avec une période qui dépend de la constante de raideur du ressort $k (\text{N} \cdot \text{m}^{-1})$ et des masses en présence.

La fréquence approchée est donnée par **la loi de Hooke** dans laquelle m (kg) représente la masse réduite du système.

$$\nu_{\text{Vib.}} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad \text{Avec} \quad \mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$

Le modèle précédent est applicable à la liaison chimique qui relie deux atomes, à condition de faire intervenir l'aspect quantique qui régit les espèces aux dimensions atomiques.

Pour une liaison on a :

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad \text{Avec} \quad \bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c}$$

$\bar{\nu}$: Nombre d'onde

λ : Longueur d'onde

c : vitesse de la lumière

Donc on doit tout d'abord calculer la masse réduite μ qui doit être en kg comme unité.

Les masses molaires atomiques du carbone et de l'oxygène sont respectivement **12 g/mol** et **16 g/mol**.

On doit alors utiliser le nombre d'Avogadro N_A pour trouver la masse de chaque atome :

Nombre d'Avogadro $N_A = 6,023 \cdot 10^{23}$

$$\mu = \frac{\frac{m_C m_O}{N_A} \frac{m_C m_O}{N_A}}{\frac{m_C}{N_A} + \frac{m_O}{N_A}}$$

Remarque : les masses doivent être converties en kg

Application numérique : $\mu = 1,14 \cdot 10^{-26} \text{ kg}$

Pour calculer la constante de force pour la vibration d'élongation de la liaison C=O

On applique la formule :

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2 \pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

Application numérique : $k = 1190 \text{ N/m}$ pour la liaison C=O

$k = 446 \text{ N/m}$ pour la liaison C-O

Exercice N°2

Pour la liaison C-H $\longrightarrow \bar{\nu} = 3100 \text{ cm}^{-1}$

Pour la liaison C-D $\longrightarrow \bar{\nu} = ?$ (D : Deutérium)

$m_C = 12 \text{ g/mol}$; $m_H = 1 \text{ g/mol}$; $m_D = 2 \text{ g/mol}$

Puisque on suppose que la valeur de la constante de la force est la même dans les deux cas, le principe de la solution de cet exercice se base sur le calcul de la valeur de cette constante en appliquant la loi de Hooke et puis on devra calculer les valeurs des masses réduites dans chaque cas :

Formules :

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2 \pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \qquad \mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$

Remarque : il ne faut pas oublier de convertir les masses en kg et d'utiliser le nombre d'Avogadro :

Application numérique : $\mu \text{ (C-H)} = 1,53 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$

$k = 523 \text{ N/m}$

$\mu \text{ (C-D)} = 2,85 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$

$\bar{\nu} \text{ (C-D)} = 2275 \text{ cm}^{-1}$

Exercice N°3

Données: $k = 1000 \text{ N/m}$; $\bar{\nu} = 2000 \text{ cm}^{-1}$

Puisque on suppose dans cet exercice que l'énergie de la radiation incidente est transformée en énergie de vibration on a : $\Delta E_{\text{tot}} = \Delta E_{\text{cin}} + \Delta E_{\text{v}}$

$\Delta E_{\text{cin}} = 0 \implies \Delta E_{\text{tot}} = \Delta E_{\text{v}}$

Avec

$$\Delta E_{\text{vib.}} = \frac{1}{2} k \Delta x_0^2$$

Donc pour calculer la valeur approchée de l'augmentation de l'élongation maximum (Δx_0) de cette liaison on doit calculer la valeur de l'énergie de vibration correspondante :

$$\Delta E_v = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda = h \cdot c \cdot \bar{\nu}$$

Application numérique : $\Delta E_v = 3,97 \cdot 10^{-20} \text{ J}$

D'où : $\Delta x_0 = 8,9 \cdot 10^{-12} \text{ m}$

Exercice N°4

- Données : Constante de la force de la molécule HF , $k_{\text{HF}} = 966 \text{ N.m}^{-1}$

Données : (H : A = 1 g.mol⁻¹ ; F : A = 19 g.mol⁻¹, Nombre d'Avogadro $N_A = 6,023 \cdot 10^{23}$)

- e- Calcul de la fréquence d'absorption de vibration de cette molécule :

Application de la loi de Hooke :

$$\nu_{\text{vib.}} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

Application numérique : $\nu = 1,245 \cdot 10^{14} \text{ Hz}$

- f- Calcule des valeurs d'énergie, exprimée en joule, correspondant aux niveaux de vibrations : $v = 0, 1, 2$ et 3 de la molécule HF.

Pour cela on applique la formule : $E_v = h \cdot \nu (v + \frac{1}{2})$

$v = 0, 1, 2, \dots$, est appelé **nombre quantique de vibration**. Il ne peut varier que d'une unité ($\Delta v = +1$, transition dite de « simple quantum »). Les différentes valeurs de l'expression sont séparées par un même intervalle $\Delta E_{v_{\text{ib}}} = h \cdot \nu$

Les valeurs des énergies de vibration trouvées pour chaque nombre quantique de vibration sont récapitulées dans le tableau ci-dessous :

v	0	1	2	3
E_v	$h \nu / 2$	$3h \nu / 2$	$5h \nu / 2$	$7h \nu / 2$
$E_v \text{ (J)}$	$4,125 \cdot 10^{-20}$	$1,23 \cdot 10^{-19}$	$2,06 \cdot 10^{-19}$	$2,88 \cdot 10^{-19}$

- g- Calcul de la valeur de l'élongation maximale de la liaison r pour l'état fondamentale ($v = 0$) :

$$v = 0 \text{ donc } E_v = 4,125 \cdot 10^{-20} \text{ J}$$

$$\text{On va appliquer la formule suivante : } E_{\text{vib.}} = \frac{1}{2} k \Delta x_0^2$$

$$\text{Avec } \Delta x = r - r_e$$

$r_e = 0.0917 \text{ nm}$; r_e est la distance inter nucléaire à l'équilibre (de vibration)

r la distance réelle des deux atomes au temps t .

donc pour calculer la valeur de l'élongation maximale de la liaison r il faut calculer Δx à partir de l'expression de l'énergie de vibration :

$$\text{d'où : } r - r_e = \sqrt{\frac{2E_v}{k}} \text{ on déduit que } r = 0,009 \text{ nm}$$

- Comparaison de la valeur trouvée de r avec la valeur de la longueur de liaison à l'équilibre ($r_e = 0.0917 \text{ nm}$)

$$r_e = 0.0917 \text{ nm} \quad \longrightarrow \quad 100 \%$$

$$r = 0,009 \text{ nm} \quad \longrightarrow \quad x \%$$

$$x = 0,009 \cdot 100 / 0,0917$$

$x = 9,8 \%$ à peu près 10 % de différence entre les deux valeurs d'élongation de la liaison.

- h- Calcule du nombre d'onde en cm^{-1} de la raie d'absorption IR de la molécule HF en solution : ν

$$\bar{\nu} = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

Application numérique : $c = 3.108 \text{ m/s}$; $k = 966 \text{ N/m}$; Pour la masse réduite, il faut la calculer comme c'est montré précédemment : $\mu = 1,57 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$

$$\bar{\nu} = 4150.82 \text{ cm}^{-1}$$

Chapitre VII

Résonance Magnétique Nucléaire

Introduction

La résonance magnétique nucléaire (RMN), dont les premiers travaux, vers 1945, sont dus aux physiciens Bloch et Purcell, est très vite devenue une méthode spectroscopique polyvalente irremplaçable dans divers secteurs de la chimie. La RMN permet l'étude des composés en solution ou à l'état solide. Elle sert aussi bien en analyse quantitative qu'en analyse structurale, mais c'est surtout dans ce dernier domaine qu'elle fait preuve de toute sa puissance. Elle est la meilleure méthode pour obtenir des renseignements structuraux sur les composés moléculaires, elle revêt donc une importance pratique toute particulière en chimie organique et en biochimie. La RMN est utilisée en complément des méthodes de spectroscopie optique et de la spectrométrie de masse pour permettre de préciser la formule développée, la stéréochimie du composé étudié.

La résonance magnétique nucléaire est devenue, pour ces raisons, une des techniques majeures d'étude aussi bien des structures moléculaires que des cristaux, dont on ne saurait se passer. Actuellement, il existe des techniques couplées de chromatographie liquide ou d'électrophorèse avec la RMN.

Il existe plusieurs types de RMN. Celle, présentée dans ce chapitre, est la RMN du proton, c'est-à-dire celle mettant en jeu les atomes d'hydrogène, atomes composés d'un proton et d'un électron. La RMN consiste à soumettre une molécule à un champ magnétique. Ce dernier permet de faire résonner les atomes d'hydrogène de la molécule.

VII.1 Spectre RMN

Un spectre RMN comporte des pics ou séries de pics appelés "signaux" correspondants à la résonance des différents protons présents dans la molécule. Ces signaux sont placés sur un axe horizontal indiquant une grandeur appelée "déplacement chimique" notée δ et exprimée en partie par million (ppm).

Le déplacement chimique reflète le décalage entre la fréquence de résonance des protons de la molécule étudiée et une fréquence de résonance prise pour référence. En général la fréquence prise pour référence est la fréquence de résonance des protons de la molécule de tétraméthylsilane (**TMS**). Une molécule contient des protons identiques qui seront représentés par un seul pic dont l'aire est proportionnel au nombre de protons présents. Le spectre RMN du proton aura donc plusieurs signaux avec différents déplacements chimiques, représentant les différents environnements et non le nombre de protons présents. L'intégration des signaux afin d'obtenir l'aire sous les pics permet de connaître le nombre total de protons présents.

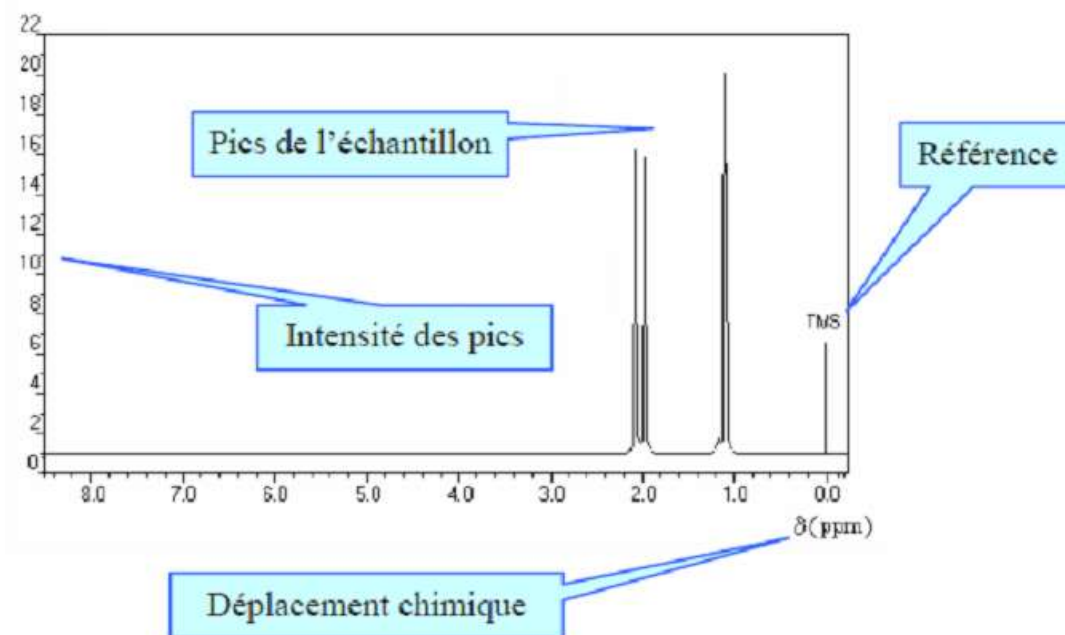


Figure VII.1 : Représentation schématique d'un spectre RMN

VII.2 Les protons équivalents :

Des protons sont dits équivalents si leur environnement chimique est le même. En particulier, des protons sont équivalents :

- S'ils sont portés par un atome ne comportant que des liaisons simples.
- S'ils sont portés par deux atomes identiques ayant le même environnement. De tels atomes sont alors symétriques l'un de l'autre par l'un des éléments de symétrie de la molécule (plan, axe ou centre de symétrie).

Par définition, des protons équivalents possèdent le même environnement chimique et perçoivent donc le même champ magnétique : des protons équivalents ont le même déplacement chimique et forment un seul et même signal sur un spectre RMN. Ce signal est proportionnel au nombre de protons équivalents présents.

Exemples :

La molécule d'éthanol	La molécule d'éthane-1,2-diol
$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{OH}$	$\text{HO} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{OH}$
Les 3 protons de CH_3 sont équivalents	Les deux groupes CH_2 ont des protons équivalents.
Les 2 protons de CH_2 sont équivalents	Les deux groupes hydroxyle OH ont des protons équivalents

- Détermination du nombre de protons équivalents

Sur un spectre RMN la courbe d'intégration comporte des paliers à chaque signal dont la hauteur est proportionnelle au nombre de protons :

- Si un premier palier est deux fois plus haut qu'un deuxième alors le premier signal correspond à deux fois plus de protons que le deuxième (il peut y avoir 1 et 2 protons ou 2 et 4 ou 3 et 6...).
- Si un premier palier est trois fois plus haut qu'un deuxième alors le premier signal correspond à trois fois plus de protons que le deuxième (il peut y avoir 1 et 3 protons ou 2 et 6 ou 3 et 9...).
- S'il existe un rapport de 3 / 5 entre deux palier alors il y a aussi un rapport de 3 / 5 entre le nombre de protons des deux signaux (il peut y avoir 3 et 5 protons ou 6 et 10...) Et ainsi de suite...

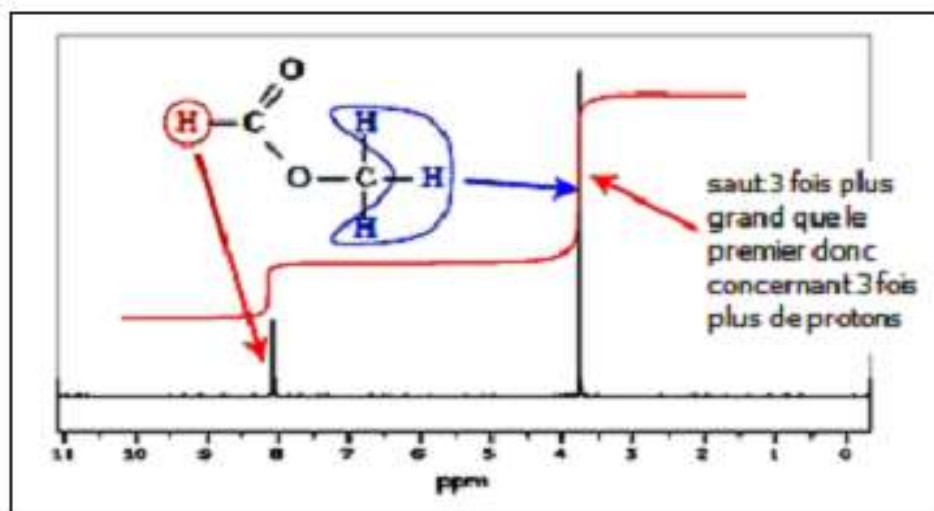


Figure VII.2 : Courbe d'intégration présentant des sauts dont la hauteur est proportionnelle au nombre de protons concernés par le signal

VII.3 Signification du déplacement chimique :

Plus le déplacement chimique est faible plus l'environnement du proton est chargé d'électrons qui font écran, le proton est dit **blindé**. Inversement, plus un signal a un grand déplacement chimique, moins il y a d'électrons qui font écran, le proton est dit "**déblindé**". Les atomes fortement électronégatifs (attirant les électrons vers eux) entraînent une augmentation du déplacement chimique car les électrons seront plus proches de cet atome. Les liaisons multiples ont également un effet "déblindant".

VII.4 Les signaux à pics multiples :

Des protons non équivalents portés par des carbones différents sont susceptibles d'interagir entre eux, ce qui modifie également leurs fréquences de résonance. Il en résulte un signal comportant plusieurs pics.

Si un proton est porté par un atome de carbone dont le ou les atomes de carbone voisins portent au total un nombre n de protons alors le signal obtenu comporte $n + 1$ pics.

Exemples :

- Dans le cas d'un proton voisin alors le signal comporte $1 + 1 = 2$ pics appelé doublet
- Dans le cas de deux protons voisins alors le signal comporte $2 + 1 = 3$ pics appelé triplet
- Dans le cas de trois protons voisins alors le signal comporte $3 + 1 = 4$ pics appelé quadruplet.

Pour des interactions plus complexes, le nombre de pics présents ne sera pas facilement identifiable, on parlera alors de multiplet.

VII.5 Principe de détermination de la structure d'une molécule à l'aide d'un spectre RMN :

La RMN s'utilise en général en complément de méthodes permettant d'identifier la formule brute de la molécule (spectrométrie de masse par exemple). Elle peut aussi s'employer en complément de la spectroscopie infrarouge qui permet d'identifier la présence de certaines fonctions chimiques ou certains types de liaisons. Pour des composés simples, il est également possible de comparer le spectre obtenu à une banque de données de spectres de molécules connues. En connaissant la formule brute de la molécule, la RMN permet de déterminer sa structure à partir des éléments suivants :

- ❖ La valeur des déplacements chimiques des différents signaux permet d'identifier certaines liaisons et groupements chimiques : des fourchettes de déplacements chimiques sont connues suivant le type de groupement ou liaison.
- ❖ La courbe d'intégration permet de déterminer le nombre de protons équivalents entre eux et les proportions entre les différents types de protons.
- ❖ La multiplicité des pics permet de connaître le nombre de protons portés par les atomes de carbone voisins.

VII.6 Facteurs affectant les déplacements chimiques :

L'examen d'un grand nombre de spectres de RMN fait apparaître des facteurs généraux responsables d'effets prévisibles et cumulables sur le déplacement chimique.

A- Effets de substitution et d'hybridation :

Le simple remplacement d'un hydrogène par un reste carboné R produit un déblindage des protons restants. L'effet atteint 0,6 ppm lorsqu'on passe de RCH₃ à CHR₃. Cet effet peut atteindre 40 ppm en RMN ¹³C. L'état d'hybridation des atomes de carbone influe de manière encore plus nette sur la position des signaux.

Ces variations sont dues à l'anisotropie des liaisons chimiques, c'est-à-dire à la nonhomogénéité de la densité électronique autour des atomes liés, à laquelle peut s'ajouter l'effet de petits champs magnétiques induits par circulation des électrons. Ainsi les protons éthyléniques sont déblindés parce que situés dans un plan appauvri en électrons. Inversement, les protons acétyléniques situés dans l'axe de la liaison CC sont plongés dans un environnement plus riche en électrons et sont par conséquent blindés. Quant aux protons aromatiques, ils sont fortement déplacés vers les champs faibles car, à l'effet d'anisotropie précédent, s'ajoute un petit champ local généré par le « courant de cycle », qui se superpose au champ principal.

B- Effets divers (solvants, liaisons hydrogène et matrice)

Les solvants, généralement sans atomes d'hydrogène, utilisés pour diluer les composés organiques étudiés en RMN ¹H ou ¹³C, influencent la position des signaux. Le solvant, beaucoup plus abondant que le soluté, conduit avec ce dernier dont la concentration est de l'ordre de quelques pourcents, à des associations dont la stabilité dépend des polarités respectives. En conséquence, les tables de corrélation doivent préciser la concentration et le solvant utilisés.

En RMN ¹H, la position du signal du chloroforme dans des mélanges chloroforme/toluène passe de 7,23 ppm ; (90 % chloroforme/10 % toluène v/v.) à 5,86 ppm (10 % chloroforme/90 % toluène). Ce déplacement vers les champs forts, pour les mélanges riches en toluène, s'explique par l'existence de complexes dans lesquels le proton du chloroforme est dans la zone de blindage du noyau aromatique.

Le solvant pour RMN le plus courant est le chloroforme deutérié (CDCl₃), suffisamment polaire pour dissoudre la plupart des composés. On utilise également l'acétone-d₆ (C₃D₆O), le méthanol-d₄ (CD₃OD), la pyridine-d₅ (C₅D₅N) ou l'eau lourde (D₂O).

Lorsque le composé possède des atomes d'hydrogène mobiles, des échanges D ↔ H peuvent avoir lieu avec certains solvants, ce qui entraîne des modifications d'intensité et de position des signaux correspondants. Les liaisons hydrogène modifient l'entourage électronique de certains protons, rendant parfois difficile la prévision des déplacements chimiques.

Enfin les interactions, entre molécules voisines, et la viscosité agissent également sur la résolution du spectre via le temps de relaxation spin/réseau.

VII.7 Appareillage et analyse en RMN :

A- Appareillage :

L'excitation des protons nécessite un champ magnétique intense. Par exemple, dans le cas des utilisations médicales, comme l'IRM, il est nécessaire d'utiliser des champs d'intensité importante. Ce champ magnétique est créé par une bobine supraconductrice parcourue par un champ électrique. L'échantillon est placé au centre de la bobine. Afin de permettre à la bobine d'être supraconductrice, celle-ci est plongée dans un bain d'hélium. La bobine dégageant de la chaleur, l'hélium a tendance à s'évaporer. Pour ralentir l'évaporation et maintenir le système à une température constante, la RMN possède une double enveloppe (à la manière d'un thermos) dans laquelle est injecté de l'azote liquide (environ -196°C).

Plus l'intensité est importante plus les spectres obtenus sont détaillés et l'identification de composés en faibles quantités peut-être réalisée. Les appareils RMN sont très imposants en comparaison à d'autres appareillages de chimie analytique. En effet, il faut protéger la bobine de la chaleur extérieure, et surtout l'opérateur du champ magnétique intense. Pour des raisons pratiques, on imagine aussi facilement l'intérêt de ne pas avoir un fort aimant sans protection à proximité des bureaux.

B- Déroulement de l'analyse :

La plupart du temps, l'analyse RMN se déroule en phase liquide. Cependant, elle est également possible en phase solide avec une adaptation de l'appareillage. Les fortes interactions des molécules entre elles en phase solide donnent des signaux moins résolus (pics larges). Ces spectres sont donc moins facilement exploitables.

Pour l'analyse en phase liquide, l'échantillon doit être solubilisé dans un solvant deutéré (hydrogènes remplacés par son isotope le deutérium), car le deutérium n'est pas excité par le champ magnétique. Il n'interférera donc pas avec le signal du soluté. Dans un solvant classique (avec hydrogène), le spectre RMN est impacté par les signaux des protons du solvant ainsi que les interactions de ceux-ci avec la molécule analysée. L'analyte

en solution est placé dans un fin tube en verre adapté. Le tube est introduit au sein de l'appareil et l'analyse est lancée via l'ordinateur.

C- Les limites de l'analyse RMN :

Pour effectuer une analyse structurale en RMN, il est nécessaire d'avoir un produit très pur. En effet si la solution analysée contient plusieurs composés chimiques en égales quantités, il sera impossible de savoir quels signaux sont reliés à la même molécule. De plus, le risque de superposition de signaux est très important. La quantité d'analyte nécessaire est variable, selon la richesse de la molécule en protons et la puissance de l'appareil.

Cela est souvent une limite pour le chercheur analysant des composés extraits de plantes ou effectuant des essais de synthèse organique. En effet, les quantités de produits purs obtenues sont souvent infimes. Comparée à d'autres analyses comme la chromatographie ou la spectrométrie de masse, la RMN est relativement "gourmande" en quantité d'échantillon.

Bibliographie (Méthodes spectrales) :

- Skoog, West, Holler, Crouch, Chimie Analytique, 8ème édition Bruxelles (2013).
- Gwenola BURGOT et Jean Louis BURGOT, Méthodes Instrumentales d'Analyse Chimique, Tec et Doc 2002.
- Frédéric Verger, Spectroscopie infrarouge exaltée de surface pour la détection de composés organiques dissous dans le milieu marin, (2012).
- E. Quivet, Chimie analytique instrumentale, Notions de spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire, Université de Marseille.
- S. Evariste, Systèmes π -conjugués et assemblages supramoléculaires organophosphorés : synthèse et propriétés physico-chimiques, Partie I, (2017)
- Analyse instrumentale, Biotechnologie végétale et Amélioration, Cours Spectroscopie Uv-Visible, (2019-2020).
- Folco Laverdière, Anja Holstein, Laurent Thiebaut, Robert Mallee, Guillaume Gravejat, Benjamin Desclozeaux, Dossier Couplage : Les principales méthodes d'analyse, 1999.
- M. Hesse. H. Meier. B. Zeeh. Méthodes spectroscopiques pour la chimie organique. Masson. Paris, 1997.
- W. P. Atkins. Chimie Physique. DeBoeck Université. 2000.
- J. M. Hollas. Spectroscopie. Dunod. Paris, 2003.
- C. Cohen-Tannoudji. B. Diu. F. Laloë. Mécanique quantique. Tomes I et II, collection enseignement des arts, Hermann, Paris. 1998.
- Silverstein, Basler, Morill. Identification Spectrométrique de composés organiques. DeBoeck Université. 1998.