

**==> Renseignements : Laboratoire de Chimie-Analytique - escalier D - 4ème étage.**

**==> Programme :**

**I. METHODES D'ANALYSE UTILISANT LES RAYONNEMENTS**

1. Spectrophotométrie d'émission atomique, d'absorption atomique
2. Spectrophotométrie d'absorption moléculaire (UV - visible - IR)
3. Spectrofluométrie
4. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)
5. Spectrométrie de masse
6. Turbidimétrie
7. Néphélométrie

**II. METHODES DE SEPARATION**

1. Distillation
2. Extraction
3. Chromatographie
4. Electrophorèse

**==> Enseignement pendant le 1er semestre et examen en juin**

**==> ED et TD pendant le second semestre**

**==> Objectifs du cours :**

- Faire connaître les principales méthodes utilisées dans les domaines pharmaceutiques et biologiques
- Préparer le concours d'internat
- Préparer aux U.V optionnelles de MSBM "Méthodes d'Analyse"

**C 1 = Méthodologies physico-chimiques  
C 2 = Analyse instrumentale**

**==> Contrôles des connaissances :**

- Examen écrit
- Durée : 1 h 30
- Session : juin
- QROC + Exercices + Synthèse
- Note / 40

- . QROC / 20
- . Exercices / 10 (interprétation d'un chromatogramme - calculs...)
- . Question de Synthèse / 10

NB : La question de synthèse représente souvent un nombre d'heures important, or la réponse est à rédiger dans un emplacement limité.  
La note sera fonction de la qualité de la réponse et par conséquent du nombre de choses écrites. Il faudra :

1. Commencer par resituer le sujet
2. Avoir un plan
3. Faire ressortir les éléments importants
4. Equilibrer les différentes parties de la réponse.

## CHAPITRE 1 : GENERALITES

### I. DEFINITIONS - TERMES

### II. RAPPELS SUR LES RADIATIONS ELECTROMAGNETIQUES

1. Caractère ondulatoire
2. Caractère corpusculaire

### III. FORMES D'ENERGIE DANS LA MATIERE

1. Energie cinétique ( $E_c$ )
2. Energie de transition électronique ( $E_e$ )
3. Energie de vibration ( $E_v$ )
4. Energie de rotation ( $E_r$ )
5. Energie totale ( $E_T$ )
6. Représentation des niveaux d'Energie

### IV. INTERACTIONS RAYONNEMENT / MATIERE

1. Réflexion
2. Absorption
3. Emission
4. Diffusion

### V. LES SPECTRES

### VI. CLASSIFICATION DES METHODES D'ANALYSE

## CHAPITRE 1. : GENERALITES

### I. DEFINITIONS - TERMES

- **Spectroscopie** : Méthode d'analyse <sup>qualitative</sup> ~~quantitative~~ basée sur l'étude de l'interaction entre le rayonnement et la matière.
- **Spectrométrie** : Méthode d'analyse quantitative basée sur l'interaction matière/rayonnement.
- **Spectrophotométrie** : Il s'ajoute par rapport au terme précédent la notion de photon.

On parle indifféremment de spectrométrie et de spectrophométrie.  
Par contre, s'il s'agit de spectrométrie de masse, on n'utilisera pas le terme de spectrophotométrie, car à ce niveau le photon n'a plus sa place.

- **Photométrie** : Méthode d'analyse quantitative du rayonnement. On travaille en lumière monochromatique, avec des filtres.

### II. RAPPELS SUR LES RADIATIONS ELECTROMAGNETIQUES

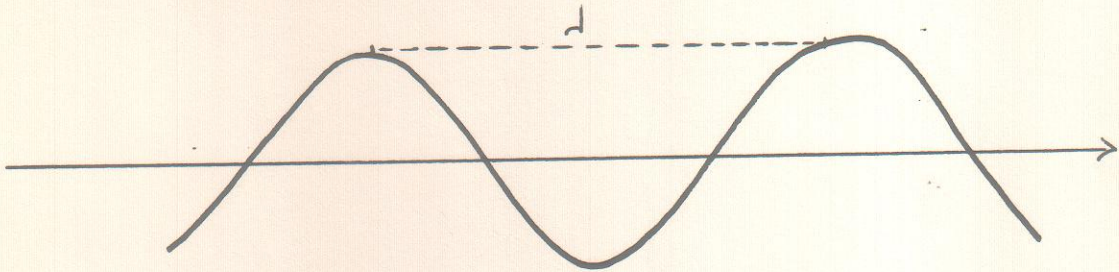
Les radiations électromagnétiques sont la résultante de deux vecteurs perpendiculaires l'un par rapport à l'autre et variant de manière sinusoïdale.

Il s'agit des vecteurs champ magnétique et champ électrique.

La radiation se propage perpendiculairement de ces deux vecteurs.

Ces rayonnements présentent un caractère ondulatoire et un caractère corpusculaire.

#### 1. Caractère ondulatoire



La radiation magnétique est une onde. Elle se déplace dans le vide à la vitesse de  $c = 299,79 \cdot 10^6$  m/s.

Elle est caractérisée par :

--> La longueur d'onde ( $\lambda$ )

= Distance séparant deux passages du vecteur champ à la même valeur algébrique.

Elle est exprimée en mètre (multiple ou sous multiple).

**NB** : L'emploi de l'Å est interdit dans le système international.

--> Le nombre d'onde ( $\bar{\nu}$ )

= Nombre de longueurs d'onde par unité de longueur.

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} \quad (\text{cm}^{-1})$$

4

NB : En spectrophotométrie visible, on utilise la  $\lambda$   
I R, on utilise la  $\bar{\nu}$

--> La période (T)

= Temps qui sépare deux passages du vecteur champ à la même valeur algébrique.

--> La fréquence ( $\nu$ )

= Nombre de périodes par unité de temps (seconde).

$$\nu = \frac{1}{T} \quad (\text{Hz ou cycles } / \Delta)$$

$$T = \frac{\lambda}{c}$$

$$\nu = \frac{c}{\lambda}$$

$$\nu = c \bar{\nu}$$

## 2. Caractère corpusculaire : (quantique)

A l'onde est associée l'énergie quantifiée; on parle de quantum d'énergie qui correspond à un photon.

$$E = h\nu \quad \text{avec } h = 6,6256 \times 10^{-34} \text{ J. s (ne pas savoir)}$$

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad \text{et} \quad E = hc\bar{\nu}$$

Plus  $\lambda$  d'un rayonnement est élevée, plus son énergie sera faible.

$\Leftrightarrow$  L'énergie du rayonnement est inversement proportionnelle à  $\lambda$  et proportionnelle au nombre d'ondes.

## III. FORMES D'ENERGIE DANS LA MATIERE

On trouve 4 formes d'Énergie (E) :

--> l'E cinétique

--> l'E de transition électronique

--> l'E de vibration

--> l'E de rotation.

### 1. L'énergie cinétique = E de translation (Ec)

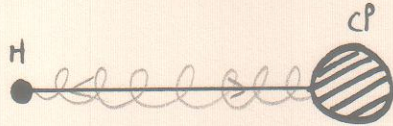
- Elle est liée au mouvement des atomes ou des molécules dans l'espace.
- Elle est non quantifiée : elle peut donc varier de façon continue.
- Elle est proportionnelle à la température du milieu.

**2. L'énergie de transition électronique = "E électronique" (Ee)**

- Elle est liée à la position des électrons sur les orbitales atomiques ou moléculaires.
  - L'E va augmenter lorsqu'un e- passe d'une orbitale inférieure à une orbitale supérieure.
  - C'est une E quantifiée, elle variera donc de façon discontinue.
  - ΔE correspond à la différence des énergies de deux orbitales.
- Ordre de grandeur : pour  $\Delta E = 4,97 \cdot 10^{-19} \text{ J}$  ( $\lambda = 400 \text{ nm}$ ).  $\bar{\nu} = 25000 \text{ cm}^{-1}$

**3. L'énergie de vibration (Ev)**

- Elle concerne uniquement les molécules.
- Considérons une molécule d'HCP

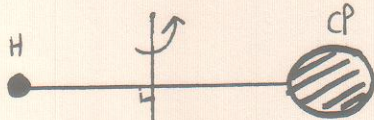


Cette molécule est capable de vibrer, c'est-à-dire que la liaison peut se raccourcir puis s'allonger : ce qui équivaut à une vibration.

- C'est une énergie quantifiée.
- Pour  $\Delta E = 3,8 \cdot 10^{-20} \text{ J}$  ( $\lambda = 5 \mu\text{m}$  et  $\bar{\nu} = 2000 \text{ cm}^{-1}$ )

**4. L'Energie de rotation (Er)**

- Elle ne concerne que les molécules.
- La molécule peut tourner autour d'un axe passant par son axe de gravité et perpendiculaire à la liaison.

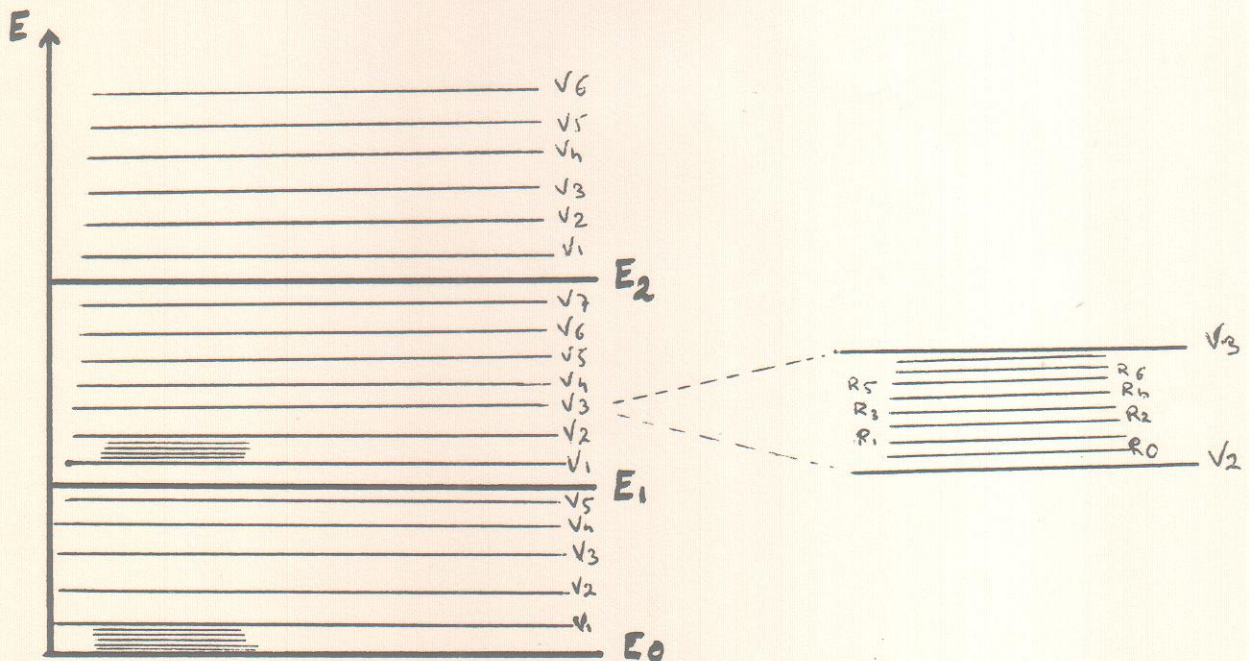


- Pour  $\Delta E = 2,0 \cdot 10^{-22} \text{ J}$  ( $\lambda = 1000 \mu\text{m}$ )  $\bar{\nu} = 10 \text{ cm}^{-1}$

**5. L'Energie totale (ET)**

$$E_T = E_c + E_e + E_r + E_v$$

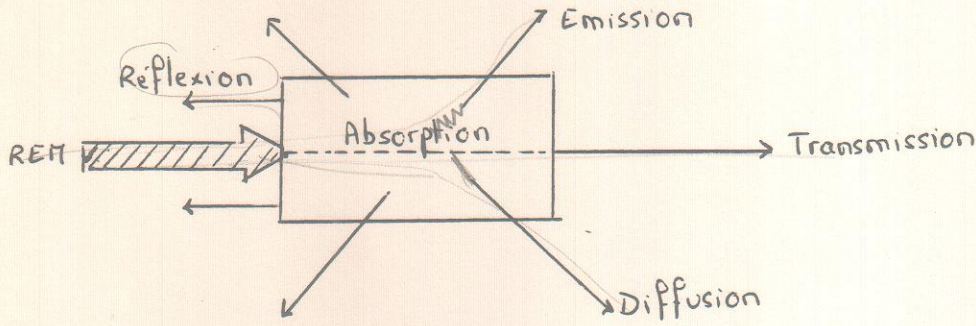
**6. Représentation des niveaux d'énergie**



- Chaque niveau d'énergie correspond à la position d'un électron sur un niveau fondamental ou excité : E0, E1, E2...
- A l'intérieur de chacun de ces niveaux électroniques on trouve des niveaux d'énergie de vibration.
- A l'intérieur de chaque niveau de vibration sont présents des niveaux d'énergie de rotation.

**NB :** Pour l'atome, on ne considèrera que les niveaux d'énergie électronique : E0, E1, E2... Pour les molécules, le phénomène est plus complexe.  
 L'Energie d'un atome ou d'une molécule ne varie pas de façon continue.

**IV. INTERACTION ENTRE LE RAYONNEMENT ET LA MATIERE :**



**1. Phénomène de réflexion**

- Le REM vient frapper la matière : s'il s'agit d'une lumière polychromatique (cas de la lumière blanche) et que la lumière est totalement réfléchi, l'objet nous apparaît blanc.
- Dans le cas d'une lumière réfléchi, il n'y a pas de modification de  $\lambda$ .
- Si seulement une partie de cette lumière polychromatique est réfléchi, alors l'autre partie est absorbée et l'objet apparaît avec la lumière complémentaire.

**2. Absorption**

**a) Aspect qualitatif :**

Lorsque le REM est absorbé, il y a passage de la molécule d'un état fondamental à un état excité, c'est-à-dire qu'il y a passage d'un niveau d'énergie inférieur à un niveau d'énergie supérieur.  
 Pour qu'il y ait absorption, il faut que l'énergie du rayonnement électromagnétique (du photon) soit la même que celle qui sépare deux niveaux d'énergie dans la matière.

**b) Aspect quantitatif loi de Beer-Lambert :**

**● Conditions :**

- > Radiations lumineuses monochromatiques, en faisceau parallèle, arrivant sous une incidence normale.
- > Solution homogène isotrope, non luminescente, non diffusante.
- > Solution contenue dans une cuve à deux faces planes et parallèles.



• Les lois :

--> Loi de Lambert-Bouguer :

$$\phi_{Tr} = \phi_0 e^{-k b}$$

$\phi_{Tr}$  = flux transmis  
 $\phi_0$  = flux incident  
 $k$  = coef. d'absorption linéaire  
 $b$  = parcours optique

--> Loi de Beer :

$$\phi_{Tr} = \phi_0 e^{-k_m \cdot h}$$

$$\phi_{Tr} = \phi_0 e^{-k_\epsilon \cdot c}$$

$h$  = "a rond" = concentration exprimée en masse  
 $c$  = concentration exprimée en quantité de matière (mol.  $l^{-1}$ )  
 $k_m$  = coef. d'absorption  
 $k_\epsilon$  = coef. d'absorption

Le flux énergétique décroît exponentiellement quand la concentration du composé absorbant augmente. Cette loi relie donc le flux transmis à la concentration du composé absorbant.

Les symboles utilisés dépendent de la norme française de l'AFNOR.

--> Loi globale de Beer-Lambert :

$$\phi_{Tr} = \phi_0 \cdot 10^{-ab h}$$

$$\phi_{Tr} = \phi_0 \cdot 10^{-\epsilon b c}$$

$$I_r = I_0 e^{-\epsilon c}$$

$$I_r = I_0 e^{-\epsilon c}$$

$a$  = coef. spécifique d'absorbance massique  
 $\epsilon$  = coef. spécifique d'absorbance molaire  
 $b$  = parcours optique  
 $h$  = concentration en masse  
 $c$  = concentration en quantité

$I$  = Intensité de lumière  
 $E$  = coef. d'extinction  $E$  1% 1cm)  
 $\epsilon$  = coef. d'absorptivité molaire  
 = parcours optique  
 $c$  = concentration

==> Termes selon AFNOR

==> Termes dont il avait l'habitude

c) Pourcentage de transmission

$$\frac{\phi_{Tr}}{\phi_0} \times 100 = \text{pourcentage de transmission}$$

$$T\% = \frac{I_r}{I_0} \times 100$$

$$T = \frac{I_r}{I_0} = \text{Transmittance}$$

## d) Absorbance

$$A = \log \frac{\Phi_0}{\Phi_T}$$

$$A = abR$$

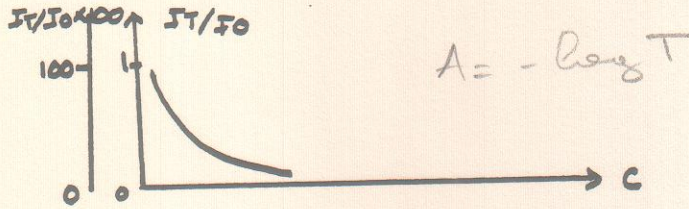
$$A = \epsilon bc$$

$$A = \log \frac{I_c}{I_i}$$

$$A = E \rho c$$

$$A = \epsilon \rho c$$

selon le coef. d'absorptivité choisi.

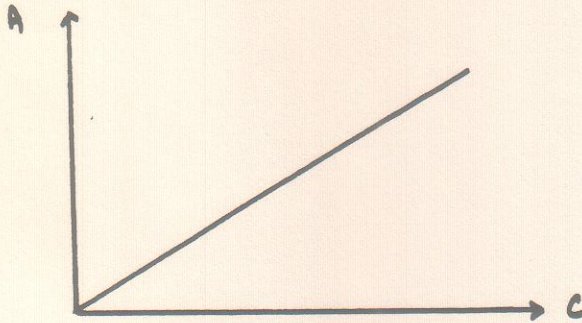


$I_T / I_0 =$  Transmittance

$I_T / I_0 \times 100 =$  pourcentage de transmission

$l =$  constant

On préfère avoir une relation linéaire plutôt qu'exponentielle, c'est pourquoi on travaille plus volontiers avec les absorbances.



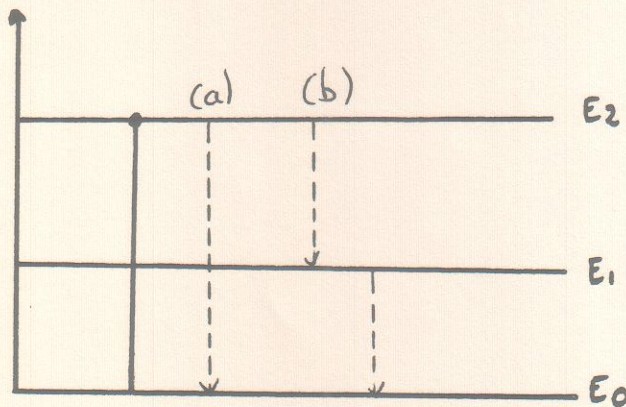
$l =$  constant

$A =$  Absorbance = densité optique

$= E \rho c$        $E$  1% 1 cm = coef. d'extinction

$= \epsilon \rho c$        $\epsilon$  = coef. d'absorptivité molaire.

## 3. Emission





L'atome dans un état excité va chercher à revenir à l'état fondamental, donc au niveau d'énergie le plus bas. Il aura deux possibilités :

--> Il pourra dissiper son énergie sous forme d'énergie thermique, par choc entre les molécules (on ne verra rien).

--> Il revient à l'état fondamental en émettant une radiation électro-magnétique. C'est une énergie quantifiée.

- Il pourra le faire en une seule fois (a) :

$$E2 - E0 = h\nu_1$$

- Il pourra le faire en plusieurs étapes (b) :

$$E2 - E1 = h\nu_2$$

$$E1 - E0 = h\nu_3$$

Sous certaines conditions et en simplifiant beaucoup  $\Phi_e = k.c$

$\Phi_e$  = flux de l'intensité émise.

L'émission est un terme très général qui englobe les notions de :

$\lambda_{emise} > \lambda_{absorbé} \Leftrightarrow E_{absorbé} > E_{emise}$

--> **Fluorescence** :  $\lambda_{emise}$  de la lumière émise est plus grande que  $\lambda_{absorbé}$  de la lumière absorbée.

--> **Luminescence**

--> **Photoluminescence** : émission de la lumière qui a été obtenue après absorption des photons par le composé.

--> **Chimiluminescence** : l'énergie fournie est une énergie chimique.

--> **Bioluminescence** : l'énergie est fournie par une réaction biochimique.

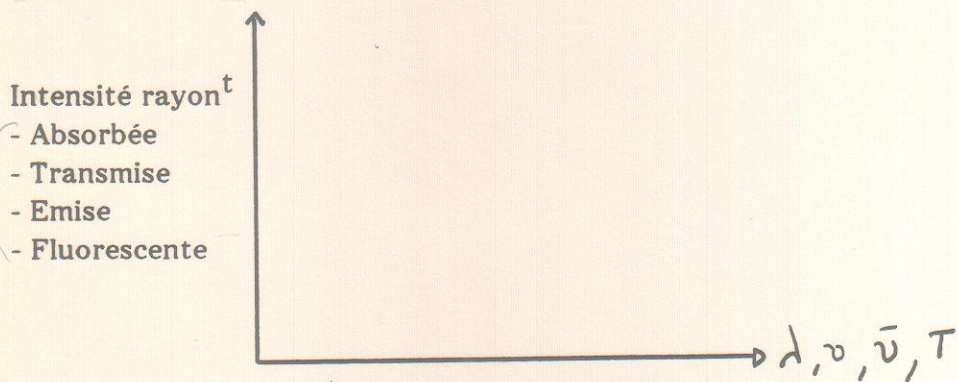
4. Diffusion

- Il y a seulement modification de la direction du rayonnement magnétique incident.

- Utilisation de ce phénomène en néphélométrie et turbidimétrie.

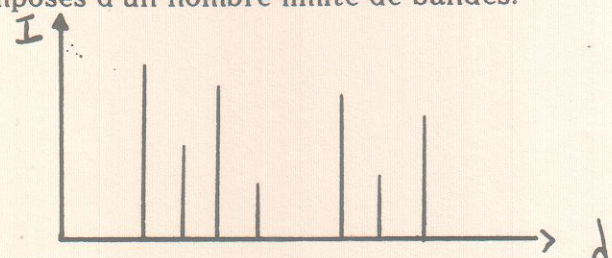
V. LES SPECTRES

**Définition** : Un spectre est la représentation d'une grandeur caractéristique de l'intensité du rayonnement en fonction d'une grandeur caractéristique de l'énergie du rayonnement.



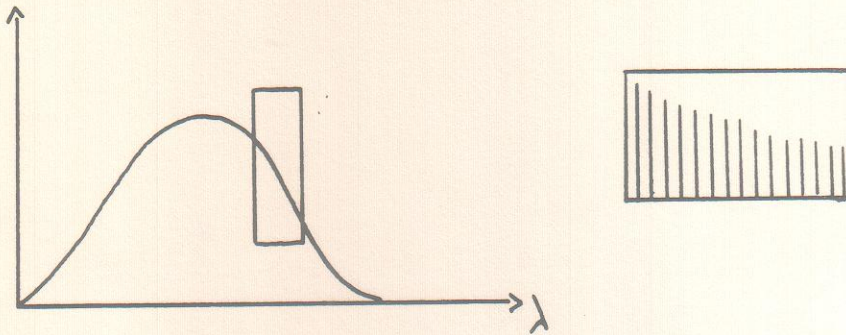
1. Les spectres de Raies ou spectres discontinus

Ils sont composés d'un nombre limité de bandes.



Dans le cas représenté, le nombre de niveau d'énergie est peu important.  
C'est le cas lorsqu'on a affaire à des atomes.

## 2. Les spectres de bandes ou spectres continus



- Cas se présentant lorsqu'on a affaire à des molécules qui possèdent un grand nombre de niveaux d'énergie.
- En fait, un nombre important de raies très proches les unes des autres donnent cet aspect continu.

## VI. CLASSIFICATION DES METHODES D'ANALYSE.

- Voir tableau.
- Les méthodes que l'on étudiera sont soulignées.

RAYONNEMENT	LONGUEUR D'ONDE	ATOME		MOLÉCULE		ÉTUDE DE...
		ABSORPTION	EMISSION	ABSORPTION	EMISSION	
RX	$10^{-3}$ à 10nm		Fluorescence X			e- des couches profondes.
UV lointain	10 à 200nm					e- périphériques
UV proche Visible	200 à 400nm. 400 à 700 nm.	<u>Absorption atomique</u>	<u>émission atomique</u> fluorescence atomique	<u>absorption moléculaire</u> <u>UV. visible</u>	<u>fluorescence</u>	phénomènes de vibration et de rotation
IR proche IR moyen	0,75 à 2,5 $\mu$ m <u>2,5 à 50 <math>\mu</math>m</u> 4000 à 100 $\text{cm}^{-1}$			<u>absorption</u> <u>IR</u>	diffusion RAMAN	
IR lointain	50 à 1000 $\mu$ m					
ondes	0,1 à 100 cm			spectromètre microonde.		phénomène de rotation pure.
ondes radio	1 à 1000m				<u>R.N.N.</u> <u>R.P.E.</u>	noyau. électron.

N.B: R.N.N = Résonance Magnétique Nucléaire.  
R.P.E = Résonance Paramagnétique Electronique.

## Chapitre 2 : ABSORPTION ATOMIQUE EMISSION ATOMIQUE

**Introduction :** Ces méthodes sont basées sur l'absorption ou l'émission de radiations lumineuses.

Les radiations lumineuses nous intéressant vont de 200 nm à 700 nm.

Ces méthodes comportent 3 étapes :

1. **Obtention des atomes à l'état de vapeur.** Généralement on part de solutions d'ions métalliques. On fournit de la chaleur pour les amener à cet état. (dans une flamme ou un four).

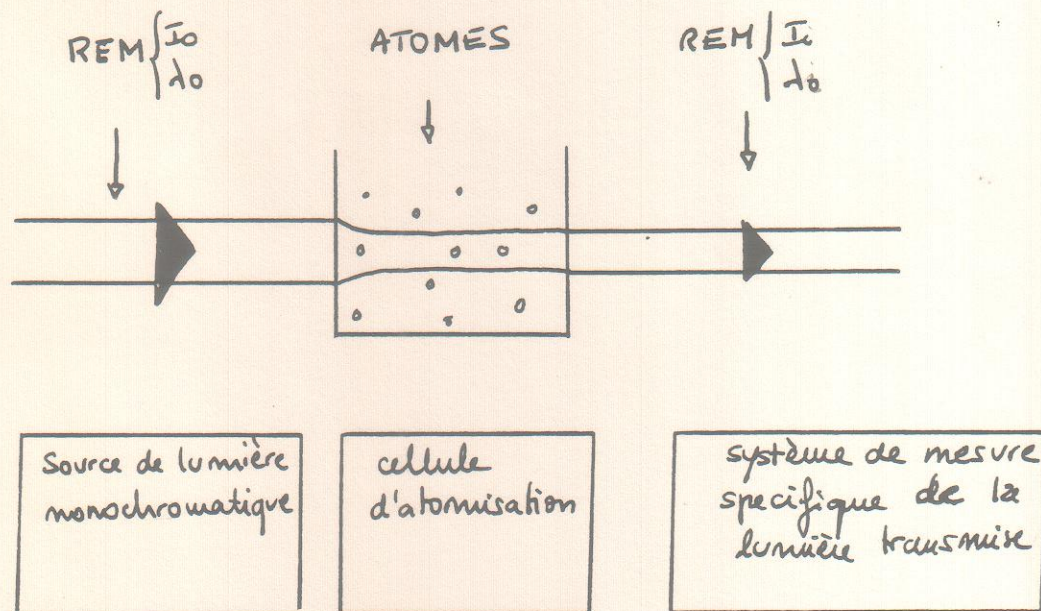
2. **Fourniture d'E** à ces atomes à l'état de vapeur de manière à ce qu'ils passent d'un état fondamental à un état excité.

- Absorption atomique AA ---> REM
- Emission atomique EA ---> toutes les sources d'Energie.

### 3. Mesure de l'énergie

- Cas de AA : on mesure le rayonnement électromagnétique qui aura été absorbé.
- Cas de EA : on mesure le rayonnement électromagnétique émis.

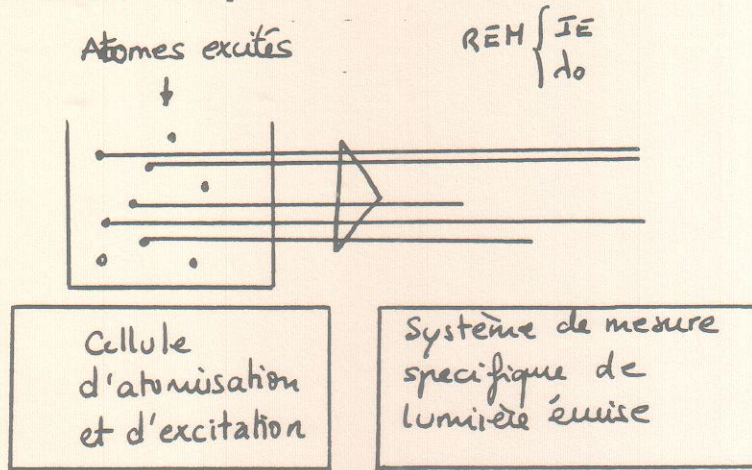
--> Absorption Atomique



- Cellule d'atomisation : système nous permettant d'obtenir des atomes à l'état de vapeur.

- Le rayonnement est en partie absorbé par les atomes à l'état de vapeur. On étudie

## --> Emission Atomique



- Les longueurs d'onde des raies sont caractéristiques d'un élément et permettent sa caractérisation.

- L'intensité des raies dépend de la concentration en l'élément --> dosage.

## I. ASPECTS THEORIQUES

### 1. Rappels sur la structure de l'atome :

- Est composé d'un noyau possédant des neutrons et des protons ainsi que d'e- gravitant autour de ce dernier.

- Les électrons sont caractérisés par :

--> le nombre quantique principal  $n = 1, 2, 3, \dots$  : caractérise la couche où se trouve l'élément,

--> le nombre quantique secondaire  $l = 0 \text{ à } (n-1)$  : caractérise le moment angulaire de l'e- (sous couches s, p, d, f),

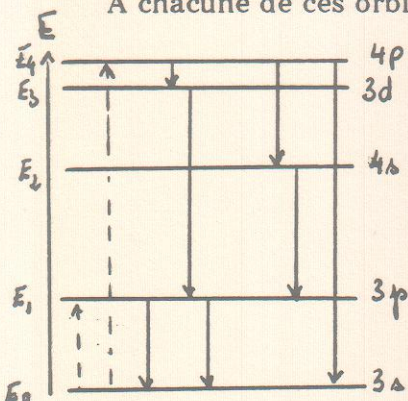
--> le nombre quantique magnétique  $m : -l < m < +l$  : caractérise l'orientation des orbitales dans un champ magnétique,

--> le nombre quantique de spin  $s = \pm 1/2$  : caractérise le sens de rotation de l'e- sur lui-même.

### 2. Diagrammes d'Energie

Na :  $1s^2 2s^2 2p^6 3s^1$  à l'état fondamental.

A chacune de ces orbitales correspond un niveau d'énergie différent.



- il y a une correspondance entre la position électronique et ces énergies.

NB : Nous nous intéressons aux e- de valence.

### 3. Echanges d'énergie au niveau de l'atome

- Si on apporte <sup>de l'</sup> énergie à l'atome, l'e- au niveau 3 s passera, selon la quantité d'énergie fournie, sur une autre orbitale :

exemple : passage de  $E_0$  à  $E_4$ . Ceci nous donne la représentation du spectre d'absorption (----).

- Par suite, l'électron revient à l'état fondamental directement ou non (—).

- L'énergie est produite soit sous la forme d'un rayonnement électromagnétique, soit sous forme d'un rayonnement thermique.

- Notons que toutes les transitions électroniques ne sont pas permises : comme le passage de 3 s à 4 s. Il existe des règles de sélection comme :

"le nombre magnétique secondaire doit varier de +1 ou -1"

"la somme  $(l + s) = J$ , J étant le moment cinétique total, doit être telle que  $\Delta J = 0, \pm 1$ "

. (Mais ceci n'est pas valable pour Na et d'autres éléments).

$$\Delta m = +1 \text{ ou } -1 \text{ pas } 0$$

$$\Delta J = 0, \pm 1$$

NB : Il y a plus de raies à l'émission qu'à l'absorption.

## II. LES SPECTRES

### 1. Multiplicité des raies

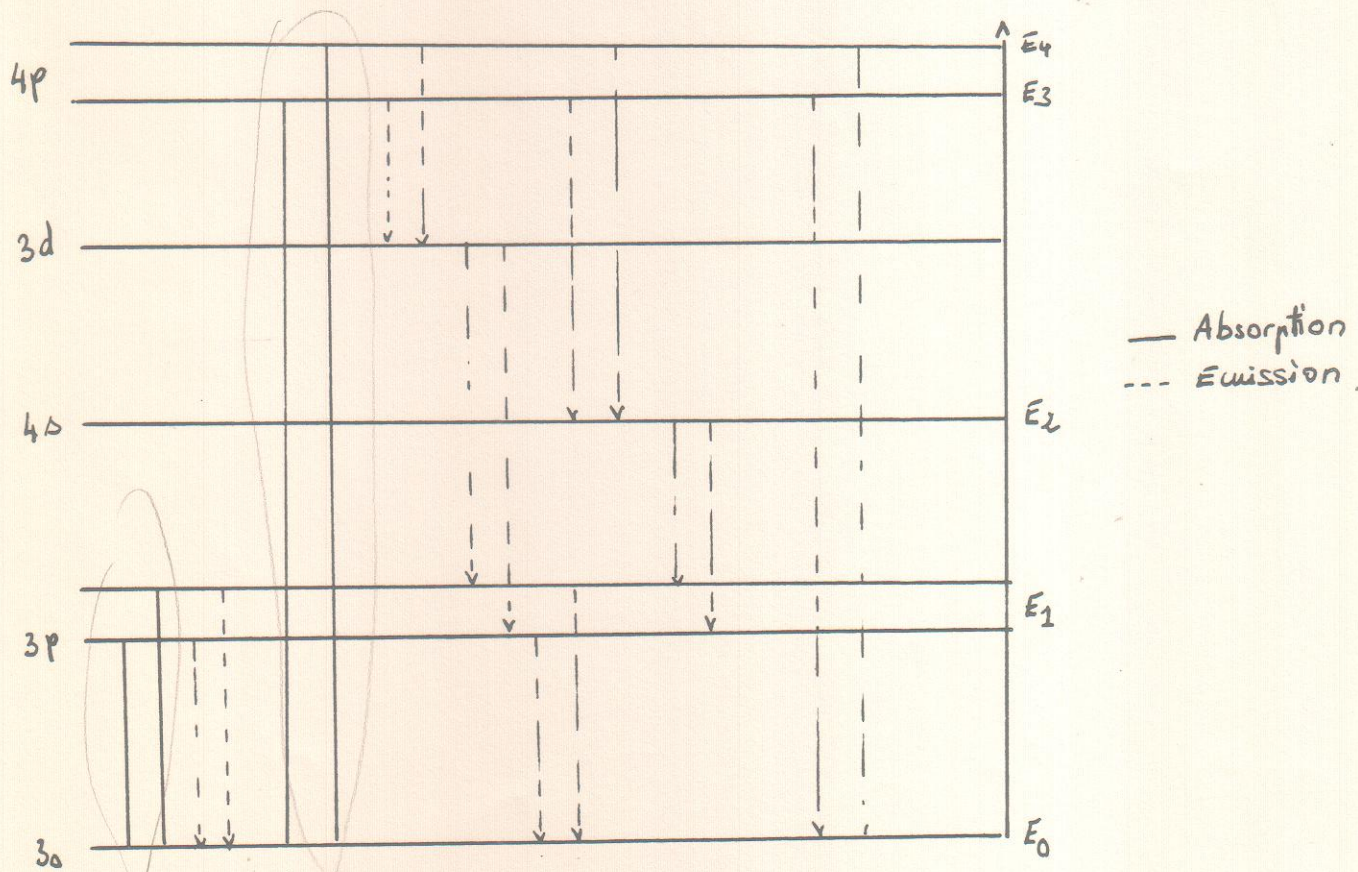
Cas du sodium :

On s'aperçoit qu'il y a des raies dédoublées.

Le passage 3 s  $\rightarrow$  4 p donne deux raies : à 330,30 nm et 330,23 nm

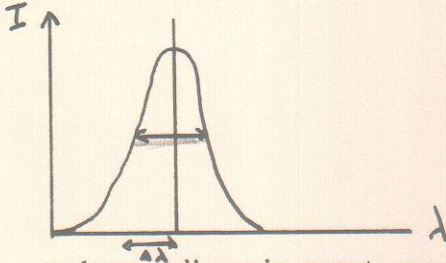
Le passage 3 s  $\rightarrow$  3 p donne deux raies : à 589,59 nm et 589,00 nm

Le nombre de ces raies rapprochées est égal au nombre de la colonne + 1 :  
ici  $1 + 1 = 2$ .



Ces raies doubles sont dues au fait que dans une population d'atomes, certains possèdent l'e- de valence à une valeur de spin  $+1/2$  et d'autres à une valeur de spin  $-1/2$  : donc il existe une petite différence énergétique.

## 2. Elargissement des raies



- présence d'un pic ayant une allure gaussienne
- l'intensité varie en fonction de sa longueur d'onde.

Les causes de cet élargissement :

--> L'élargissement naturel : est lié au principe d'incertitude d'Heisenberg.

"La durée de vie de l'état excité n'est pas la même pour tous les atomes. Elle se répartit toujours selon une manière gaussienne autour d'une valeur moyenne. L'Énergie de l'atome dépend de la durée de vie de l'état excité".

La longueur d'une raie à mi-hauteur est de  $10^{-5}$  nm.

--> L'état Doppler-Fizeau :

Tous les atomes n'ont pas la même vitesse, ce qui provoque cet élargissement. La différence de longueur d'onde  $\Delta\lambda$  est tel que :

$$\Delta\lambda = \lambda \frac{v}{c} \cos \theta$$

$\theta$  = angle d'observation  
 $\Delta\lambda$  = différence de longueur d'onde par rapport à la moyenne  
 $v$  = vitesse des atomes  
 $c$  = vitesse de la lumière

- L'effet Lorentz :

Quand la pression augmente, le nombre de collisions entre les atomes augmente ce qui entraîne des différences de vitesses.

- L'effet Stark :

L'élargissement est ici dû à une différence du champ électrique.

## 3. Raie de résonance

Parmi toutes les transitions électroniques susceptibles de se produire, c'est la raie qui correspond au passage de l'e- de son état fondamental au niveau d'énergie directement supérieur (absorption) et du passage de ce niveau à l'état initial (émission).

Pour le Na : passage 3 s  $\rightarrow$  3 p. Cette raie est la plus intense car c'est là qu'il faut fournir le moins d'énergie pour passer d'un état fondamental à un état excité.

#### 4. Position des raies

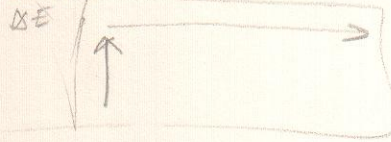
Pour un élément donné, on a une raie caractéristique : raie de résonance; elle se trouve pour la longueur d'onde la plus élevée. *Car petite E.*

Comme  $\Delta E$  est la plus faible,  $\lambda$  est la plus grande.

Si l'on considère l'ensemble des éléments, on constate que dans la classification périodique, lorsque l'on va :

$\rightarrow$  de gauche à droite :  $\Delta E \uparrow$  donc  $\lambda \downarrow$

$\rightarrow$  de haut en bas :  $\Delta E \downarrow$  donc  $\lambda \uparrow$



1 A	2 A	3 A	4 A	4 A	6 A
Na	Mg	Al	Si	P	cl
589	285	214	<200	<200	<200
K					
766					
Rb					
780					
Cs					
894					

On utilise surtout l'absorption atomique et l'émission atomique pour les métaux.

#### 5. Intensité des raies

- Elle dépend de la raie à laquelle on s'adresse pour un élément donné (raie de résonance).

- Pour un élément donné et pour une raie donnée, l'intensité dépend de la concentration de l'élément.

Si on est en AA, la loi de Beer-Lambert s'applique mais avec des conditions particulières. On est en effet en phase vapeur et non pas en solution. Par ailleurs on ne travaille pas avec une cuve ! Cependant :

$$I_T = I_0 e^{-k c}$$

Si on est en EA :

$$I_T = k c$$

L'intensité des raies dépend aussi de la proportion d'atome à l'état excité. Cette dernière nous est donnée par la loi de Boltzman :

$$N = N_0 e^{-\frac{(E_n - E_0)}{kT}}$$



$N$  = nombre d'atomes à l'état excité  
 $N_0$  = nombre d'atomes à l'état fondamental  
 $E_n$  = Energie du niveau excité  $n$   
 $E_0$  = Energie du niveau fondamental  
 $k$  = cte de Boltzman  
 $T$  = température absolue

$N$  dépend donc de la température.  
 $N_0$

Ordres de grandeur de  $\frac{N}{N_0}$

$\text{Na} = 5 \cdot 10^{-6}$  à 2000 K  
 $= 3 \cdot 10^{-4}$  à 3000 K

$\text{Zn} = 7,3 \cdot 10^{-15}$  à 2000 K  
 $= 5,6 \cdot 10^{-10}$  à 3000 K

La sensibilité de la méthode augmentera donc quand la température augmente.  
 On dose plus facilement les alcalins.  
 Il faut bien vérifier la température.

### III. ETUDE DES METHODES

#### 1. Présentation générale

On étudiera les méthodes d'Absorption Atomique :

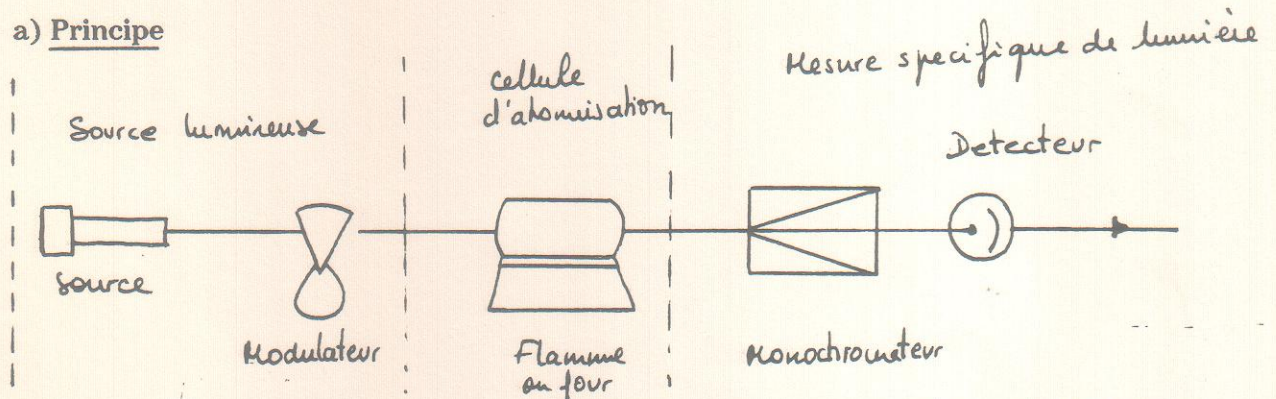
- obtention des atomes par une flamme,
- obtention des atomes dans un four.

En ce qui concerne l'Emission atomique :

- excitation des atomes dans une flamme = spectrométrie d'émission de flamme (photométrie de flamme),
- l'arc électrique,
- l'étincelle électrique,
- plasma couplage enduit : mode d'excitation plus récent.

#### 2. Spectrométrie d'absorption atomique

##### a) Principe



Le but est d'obtenir un rayonnement monochromatique, en uv, visible, de longueur d'onde connue.

La cellule d'atomisation est soit la flamme, soit le four : évaporation de la solution et obtention d'atomes. La plupart du temps il s'agit de la réduction d'ions métalliques en métal.

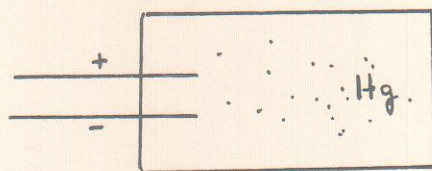
Présence d'un système de sélection de la lumière : modulateur et monochromateur.

##### b) Appareillage

→ Source :

— Obtention de la lumière grâce à une lampe :

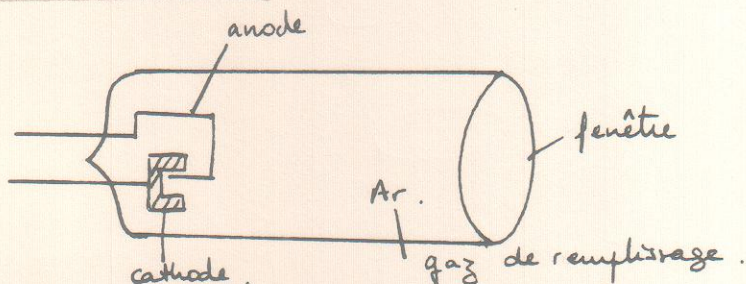
• Lampe à vapeur spectrale : elles sont constituées d'une enceinte en verre si on travaille dans le visible, ou en quartz si on travaille dans l'uv.  
On réalise le vide et on introduit un métal volatilisable.



lampe à vapeur de  
Hg ou de Na.

Si on crée une ddp entre l'anode et la cathode, il se produit un échauffement. Les chocs entre les atomes métalliques font qu'ils vont absorber de l'énergie et passer d'un état stable à un état excité. Ils reviennent à l'état stable en émettant un rayonnement électromagnétique.  
On utilise généralement le sodium et le mercure.

### Lampes à cathode creuse



Enceinte dans laquelle on réalise le vide. Puis on ajoute un gaz rare qui peut être : de l'Argon, de l'Helium. Cette enceinte est en verre ou en quartz. La fenêtre est généralement en quartz.

L'anode est du fil de tungstène.

La cathode est composée du métal que l'on veut doser : Cu, Zn.

Si on applique une ddp entre les électrodes on obtient des ions  $\text{He}^+$  ou  $\text{Ar}^+$ . Ces derniers sont attirés par la cathode et si leur énergie est suffisante, ils vont arracher des atomes du Cu ou de Zn et on retrouvera dans l'enceinte des atomes à l'état de vapeur qui, par des chocs, se retrouveront dans un état excité. En revenant à l'état fondamental, ils émettent des radiations.

On utilise le même métal que celui qu'on veut doser. Donc, la longueur d'onde correspondra exactement à celle que l'élément est capable d'absorber.

On applique des tensions de 100 à 300 V avec des intensités de 5 à 100 mA.

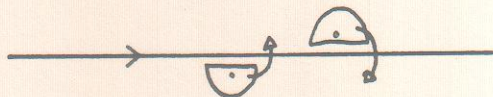
Si on a des tensions trop importantes, il se produit un élargissement de la raie de résonance ce qui comporte des inconvénients.

Il existe des raies correspondant à un seul élément, comme il existe des lampes multi-éléments  $\rightarrow$  ex. : Ca, Mg et Zn, ce qui permet de doser avec la même lampe plusieurs éléments simultanément.

### - Utilisateur d'un modulateur

Moduler le signal revient à interrompre le faisceau lumineux  $x$  fois par seconde. Ce peut être :

. une interruption mécanique par l'utilisation d'un semi-disque tournant,



. une interruption électrique : alimentation de la cathode creuse en courant alternatif.

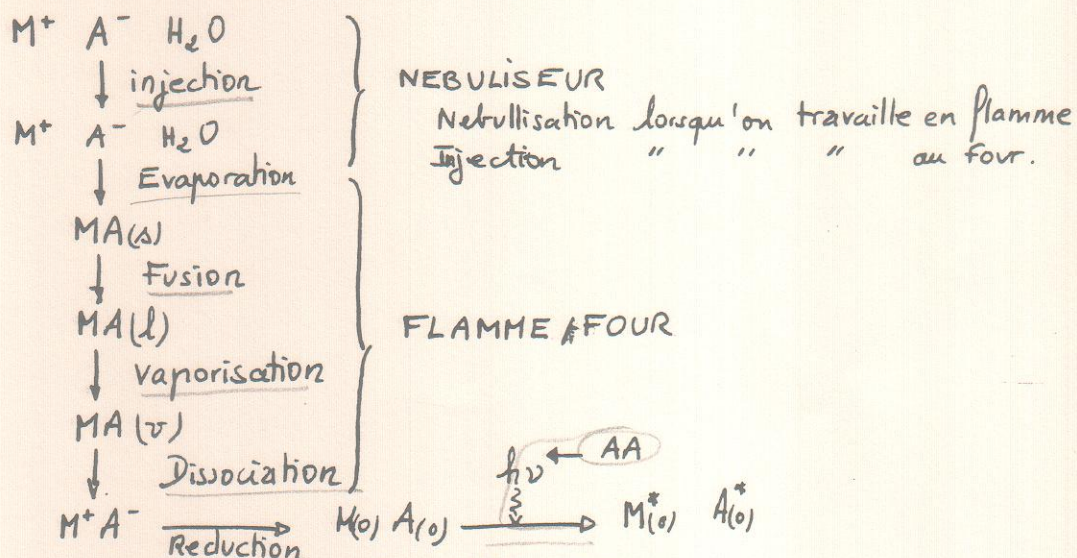
Cette modulation présente un double intérêt :

- . obtention d'un courant alternatif : or on sait mieux enregistrer un courant alternatif qu'un courant continu,
- . le rayonnement transmis est alternatif,
- . dans la source elle-même, il y a émission de rayonnements continus et on est capable de mesurer seulement celui qui est alternatif (on évite ainsi les interférences).

### → Cellule d'atomisation

Il s'agit d'une flamme ou d'un four.

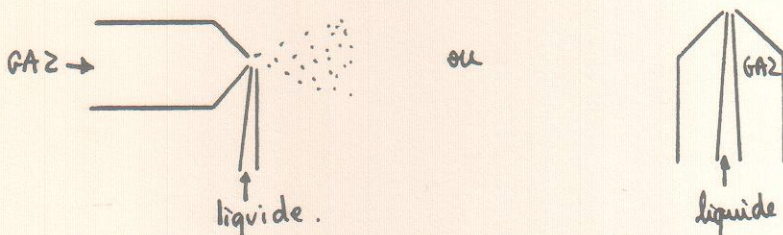
Au départ, on part d'une solution d'ions métalliques. Le solvant ( $H_2O$ ) s'évapore, donc on retrouve le sel  $MA$  à l'état solide, puis liquide, puis à l'état de vapeur.



Le rayonnement lumineux est apporté par la cathode creuse.

### • Travail avec une flamme

- 1ère étape = nébulisation : utilisation d'un nébuliseur. A l'aide d'un jet gazeux sous pression à grande vitesse des gouttelettes du liquide sur lequel il agit se forment. Le gaz crée une dépression qui aspire le liquide et arrache des gouttelettes.



On essaie d'obtenir les plus petites gouttelettes possibles car le nébulisat sera envoyé dans la flamme. Comme la vitesse du gaz dans la flamme est rapide, le temps où il demeurera sera très bref. Or, un certain nombre d'opérations doivent se produire : comme l'évaporation qui sera d'autant plus rapide que les gouttes seront petites.

La taille des gouttelettes dépend : de la densité, de la TS du liquide.

### - Utilisateur d'un brûleur :

On distingue deux types de brûleurs :

--> Le brûleur à flamme turbulente = brûleur de diffusion. Sa caractéristique essentielle : le carburant et le comburant sont conduits jusqu'au bec. Il est intéressant lorsqu'on utilise des gaz explosifs :  $O_2 / H_2$ . Il présente l'inconvénient d'avoir une flamme instable. Ainsi, on l'utilisera plutôt en émission lorsqu'on fait intervenir un étalon interne.

Il s'agit en fait d'un nébuliseur et d'un brûleur. (voir annexe)

--> Le brûleur à flamme laminaire = brûleur de prémélange.

Le plus classique est le bec bunsen. On réalise le mélange carburant-comburant avant d'arriver au bec du brûleur. La flamme est plus stable.

La flamme est large et mince. Elle constitue la cellule de mesure. La largeur de la flamme correspond au parcours optique : ce parcours sera d'autant plus long que la flamme sera large.

Les principaux mélanges gazeux utilisés : en fonction des mélanges, on obtient des températures plus ou moins élevées.

--> Températures plus faibles.

Butane - air }  
Propane - air } ==> 1900° C

Ces mélanges nous permettent de doser les alcalins et alcalino-terreux seulement.

--> Températures plus importantes.

$H_2$  - air ==> 2100° C  
 $H_2$  -  $O_2$  ==> 2000° C  
Acétylène -  $O_2$  ==> 3100° C  
Acétylène -  $N_2O$  ==> 2950° C

Le protoxyde d'azote ( $N_2O$ ) présente un caractère réducteur ce qui évite l'oxydation des métaux de la flamme.

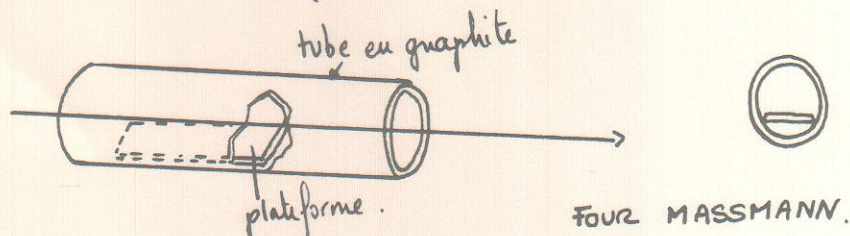
NB : Il ne faut pas retenir les températures mais savoir que l'on utilisera, selon la température que l'on désire, l'air, l' $O_2$  ou le  $NO_2$ ...

#### Exemples :

Dosage du chlorure de sodium : fond à 800° C - vapeur à 1500° C donne des atomes à 1700 --> 1900° C.

Dosage de  $Mg Al_2 O_4$  : est encore solide pour 0° > 2000° C.

. Travail avec un four : (voir annexe).



C'est un tube en graphite dans lequel se trouve une "plateforme" où on dépose l'échantillon.

Longueur : 5 à 6 cm,

Diamètre : 0,5 à 1 cm.

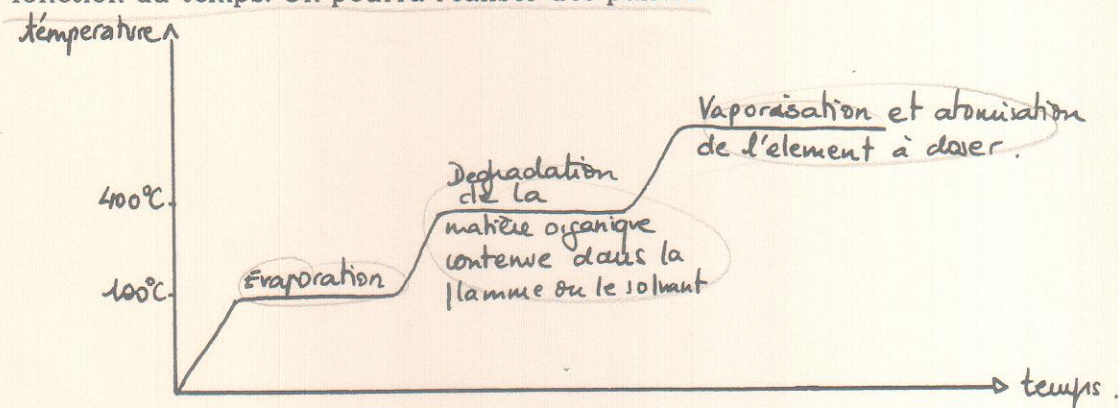
Le faisceau lumineux provenant de la source traverse le four dans le sens longitudinal.

A l'aide d'une microseringue on dépose quelques microlitres de l'échantillon sur la plateforme.

Le four est relié à un système électrique.

Le graphite est un mauvais conducteur, on a donc un échauffement du tube par effet joule. Ceci permettra les différentes étapes : de l'évaporation au passage sous forme d'atomes.

On peut programmer l'intensité du courant électrique, donc la température en fonction du temps. On pourra réaliser des paliers.



La totalité de l'échantillon sera utilisée pour la mesure, alors que dans une flamme, seule une partie participe au phénomène d'absorption. On peut donc doser des concentrations bien plus faibles d'élément.

On peut travailler en atmosphère réductrice : ceci permet le passage de  $M^+$   $\rightarrow$   $Mo$  et évite la formation d'oxydes métalliques.

Il n'y a pas de recyclage du nébuleuseur.

Le dosage est plus lent : système se prêtant moins à l'automatisation.

#### → Système de mesure

- Un monochromateur, un prisme ou un réseau est utilisé pour sélectionner le rayonnement.
- Détecteur : photodiode, photomultiplicateur.
- Courant pour traiter le signal.

#### c) Mesures :

- Il y a toujours une étape de mise en solution. Ce sont soit des solutions aqueuses ou des solutions où l'on a ajouté des solvants organiques (acétone).

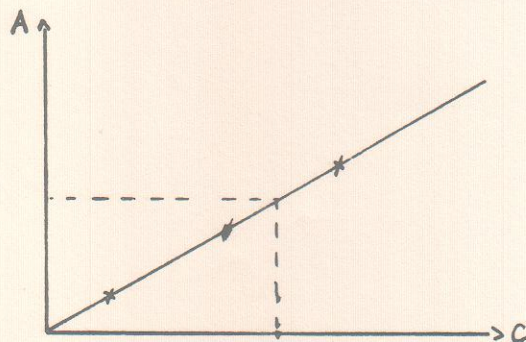
- On effectue une mesure d'absorbance qui est proportionnelle à la concentration.  $A = k l c$ .

- On travaille dans l'UV avec une cuve en quartz à faces parallèles;  $k$  dépend de la température.

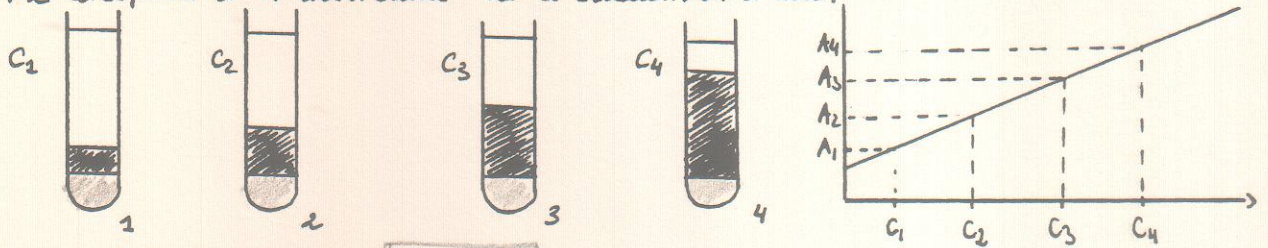
Il est donc impossible de travailler en valeur absolue : on travaille toujours par rapport à des étalons.

→ En étalonnage externe : On prépare des solutions étalons d'éléments à doser en concentration croissante. On mesure leur absorbance. On peut tracer une droite d'étalonnage. Par suite, on mesure l'absorbance du composé à doser et on en déduit sa concentration.

Inconvénient : Les solutions étalon vont avoir un environnement différent de celui de l'échantillon à doser (du fait de la présence d'ions, de corps organiques...).



→ Méthodes des ajouts dosés : On ajoute à l'échantillon à doser des quantités croissantes d'étalon. On mesure ensuite l'absorbance. Ici on ne passe pas par l'origine.  $A_x$  correspond à l'absorbance de l'échantillon à doser.



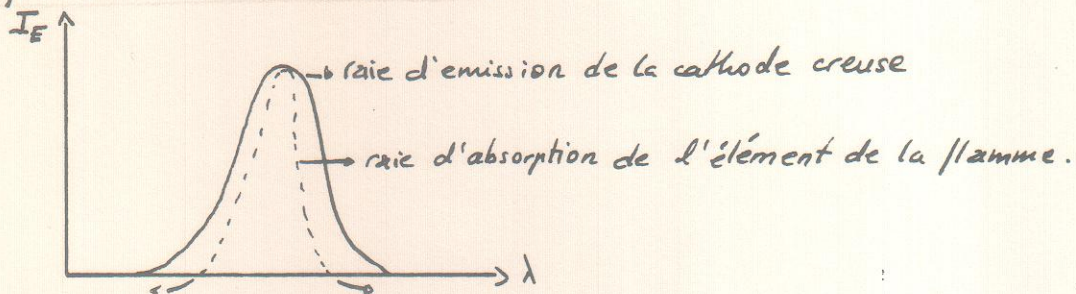
On a la relation  $y = ax + b \rightarrow b = y - ax$   
Ici les étalons se retrouvent dans le même environnement que le composé à doser. Ceci est avantageux car les interférences se retrouvent aux deux niveaux.

#### d) Interférences

- En absorption atomique on rencontre un grand nombre d'interférences.
- On distingue trois types d'interférences.
  - > spécifiques,
  - > chimiques,
  - > physiques.

##### a) Interférences spectrales :

- Elargissement de la raie d'émission de la cathode creuse : si la température élevée, plus présence d'un champ électrique.

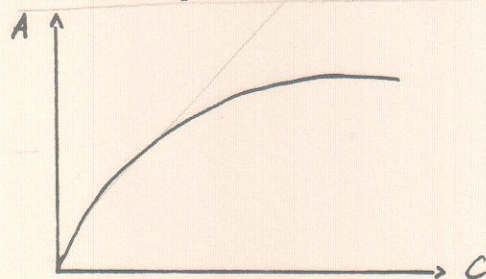


Une partie de la lumière de la cathode creuse ne pourra être absorbée par l'élément dans la flamme.

Si on reprend la loi de Beer-Lambert :  $A = \log \frac{I_0}{I_T}$ . Il y a majoration de la lumière

transmise. On obtiendra plus une relation linéaire

$I_T$  : intensité de la raie transmise.



Pour remédier à ce phénomène, on n'appliquera pas de ddp trop importantes à la cathode creuse.

##### - Absorption non spécifique dans la flamme :

Un certain nombre de composés vont être susceptibles d'absorber la raie d'émission. Ces molécules sont présentes dans l'échantillon que l'on veut doser.

L'intensité de la lumière transmise apparaîtra plus faible qu'elle ne devrait l'être. On trouve alors des quantités de l'élément à doser plus grandes qu'elles ne le sont en réalité. La méthode des ajouts remédie à ces inconvénients.

### B Interférences chimiques

#### - Formation d'oxydes :

Dans une flamme, on trouve :  $O_2$ ,  $H_2O$ ,  $OH^-$ ,  $CO_2$ . Ces composés sont capables :

--> d'oxyder directement un métal :  $MO^{++} \rightarrow MO$ .

--> formation d'hydroxyde :  $M^+ + HOH \rightarrow MOH + H^+$

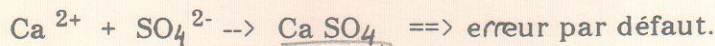
Ces composés formés présentent un caractère réfractère : sont dissociables à températures bien plus élevées que celles que l'on peut obtenir avec la flamme. On trouve des quantités moindres d'éléments à doser.

Pour remédier à ces phénomènes on utilise des flammes à caractère réducteur : en mettant moins d' $O_2$ , en utilisant le protoxyde d'azote.

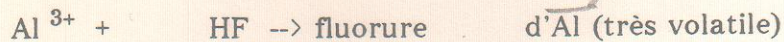
#### - Formation de composés insolubles / très volatiles :

Ceci se produit lorsqu'il y a dans l'échantillon des composés susceptibles de former des sels insolubles.

Exemple : dosage d'ions  $Ca^{2+}$  mais présence de  $SO_4^{2-}$  :



Exemple : dosage d'ions Al mais présence dans la flamme de HF :



Il faut ajouter à la solution à doser des composés qui auront tendance à déplacer les équilibres (tampons spectraux).

Dans les cas étudiés : adjonction de chlorures --> chlorure d'Al moins volatile.

Les tampons utilisés sont : le chlorure de lanthane ( $LaCl_3$ ) et le chlorure de strontium ( $SrCl_2$ ).

### γ) Interférences physiques

#### - Effet de matrice (en phase solide non spécifique).

Il se manifeste par l'inclusion de l'élément à doser dans une matrice non détruite par la flamme. On obtient une diminution d'un signal de l'élément à doser.

Ex. : si on a du sodium dans une matrice de  $Ca^{2+}$ .

#### - Différences de viscosité, de TS et de densité entre la solution à doser et les solutions étalons

On ajoute, de ce fait, des composés qui augmenteront la viscosité.

Ainsi, on peut ajouter de l'albumine ou d'autres polymères dans l'étalon pour obtenir des solutions isovisqueuses au sérum.

Utilisation d'agents mouillants.

NB : Ces interférences interviennent au niveau du nébuliseur.

### e) Applications

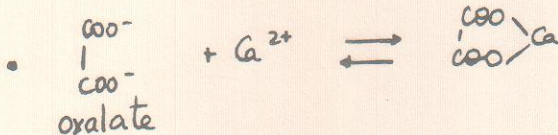


- On peut doser directement tous les métaux. Selon la place dans la classification, on utilisera des conditions expérimentales différentes (température). Toutefois, les alcalins sont plutôt dosés par émission atomique.

- Dosage indirect pour les métalloïdes : méthodes plus compliquées.



Il faudra effectuer une redissolution du précipité + un lavage + un dosage + une déduction de la concentration.



- Application en biologie : Le calcium reste un atome de référence, ainsi que le Mg<sup>2+</sup>. On utilise des oligoéléments : Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>.

- Application en toxicologie : pour tous les métaux lourds qui sont toxiques comme Pb, Hg, ...

- Pour l'environnement, notamment en ce qui concerne la surveillance des eaux : Pb, Hg, Al.

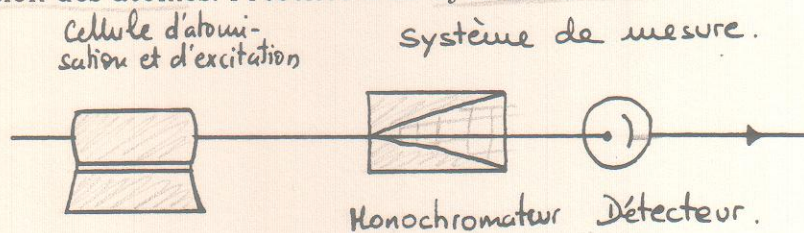
Toutes les eaux de ville sont surveillées pour leur concentration en Al : il est dangereux pour les personnes en hémodialyse. Chez ces personnes, l'aluminium se fixe au niveau du cerveau (car il ne peuvent pas l'éliminer), ce qui provoque des névropathies.

- Au niveau des médicaments en ce qui concerne la vérification des produits finis.

### 3. Spectrométrie d'émission atomique de flamme (photométrie de flamme)

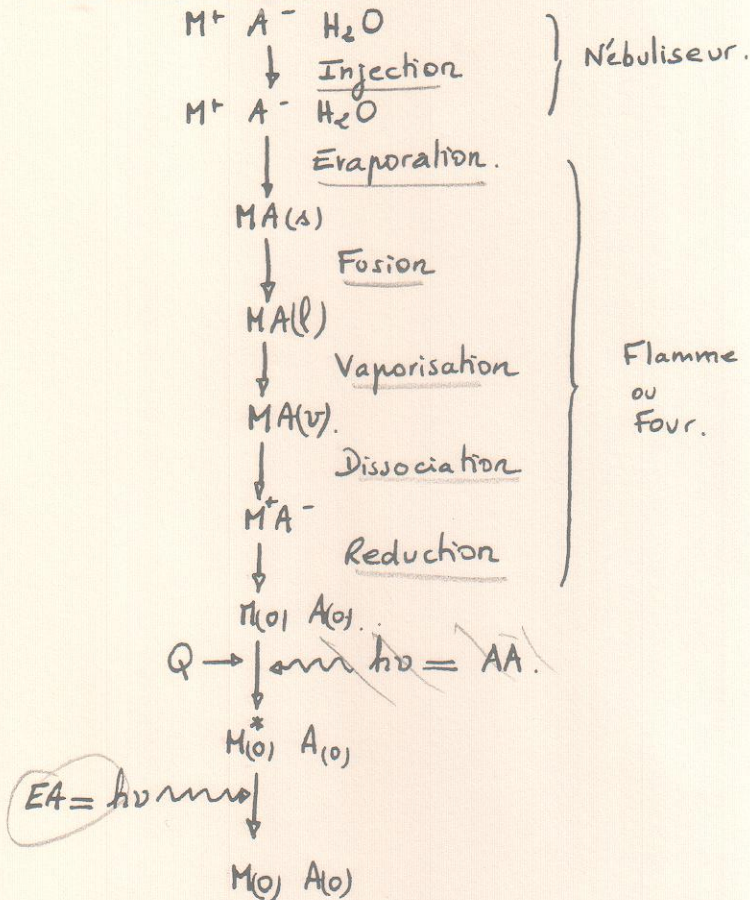
#### a) Principe

L'appareillage est simplifié : on a une cellule d'atomisation qui est aussi une cellule d'excitation des atomes. Présence d'un système de mesure.



## b) Appareillage

→ La cellule d'atomisation et d'excitation :



En EA, la flamme amène l'atome d'un niveau fondamental à un état excité. La flamme a une énergie relativement faible → seuls les alcalins et alcalinoterreux sont accessibles par cette méthode.

- Utilisation d'un nébuliseur → pour obtenir les gouttelettes les plus fines possibles.

- Brûleur de diffusion : le plus utilisé.

- Les gaz utilisés : air - Propane ou air - Butane.

→ Système de mesure de la lumière

- On a un système de sélection du rayonnement qui pourra être un monochromateur mais qui, généralement, est un filtre interférentiel.

- Le détecteur est composé par des photodiodes.

## c) Les mesures

On cherche à mesurer le rayonnement émis par les atomes :

$$I_e = k N$$

$$= k' c$$

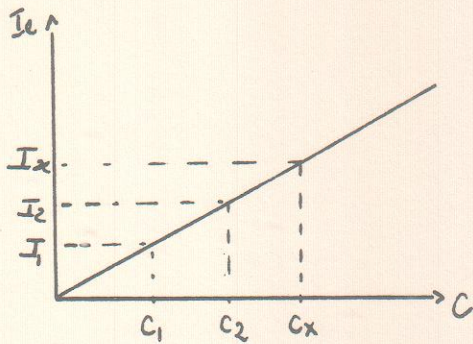
$N$  : nombre d'atomes présents dans la flamme

$c$  = concentration de l'élément à doser

$k' \neq$  dépend de la température du nébulisat.

On fait toujours des mesures en valeur relatives.

→ Par un étalonnage externe : préparation de solutions étalons d'élément à doser en concentration croissante.

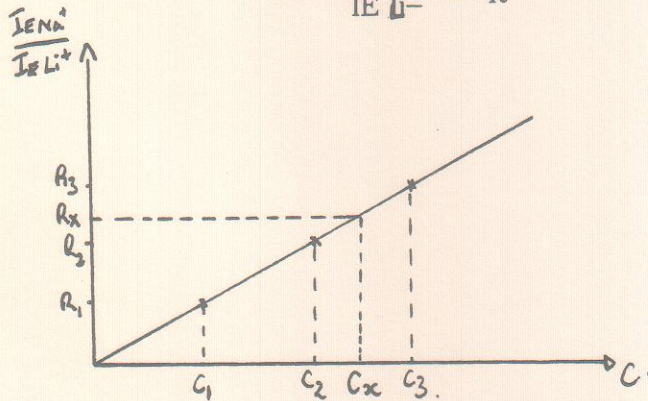


Cette technique nécessite un contrôle constant des conditions opératoires

➔ Par une méthode d'étalonnage interne (Méthode préférée)

On ajoute aux étalons et à la solution à doser une quantité constante d'un autre élément (par exemple d'un sel de lithium).  
 On mesure simultanément l'intensité de la lumière émise pour l'élément à doser et pour le lithium. On effectue le rapport des deux intensités :

$$\frac{IE Na^+}{IE Li^+} = R$$



Si les conditions expérimentales varient (comme la température de la flamme) : les interférences porteront à la fois sur le  $Na^+$  et le  $Li^+$ .  
 Ainsi le rapport les annulera ou les compensera.

Les propriétés d'un étalon interne :

- son potentiel d'excitation doit être voisin de celui de l'élément à doser,
- ses propriétés chimiques doivent être voisines,
- la  $\lambda$  émise par l'élément interne doit être voisine de celle de l'élément à doser.

	$Na^+$	$K^+$	$Li^+$
$\lambda(nm)$	589	767	670

d) Interférences

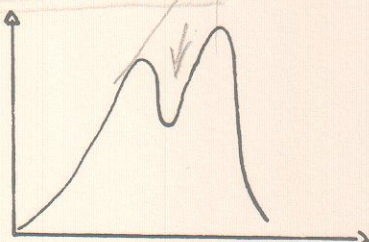
a) Interférences spectrales :

- Self absorption dans la flamme :

L'élément à l'état excité revient à l'état fondamental en émettant une radiation lumineuse  $h\nu \rightarrow$  détecteur.

Si la concentration en atome est importante, il restera un certain nombre d'atomes à l'état fondamental qui recevront ces radiations et passeront alors à un état excité : il y a donc un défaut de radiations arrivant au niveau du détecteur.

Les atomes ont tendance à absorber autour de la valeur théorique : on parle d'un renversement des raies.



Le phénomène de self réabsorption est d'autant plus important que la concentration de l'échantillon est importante, c'est pourquoi on travaillera sur des dilutions.

- Emission non spécifique par des molécules

Molécules qui vont brûler dans la flamme et émettre des radiations non spécifiques.

**β) Interférences chimiques**

- Formation d'oxydes réfractaires.
- Ce n'est pas vrai avec les alcalins mais vrai pour les alcalino-terreux.
- Formation de composés insolubles ou au contraire très volatiles.

**γ) Interférences physiques**

- Effet de matrice: l'élément à doser est inclue dans un autre.
- Problèmes de viscosité, TS et densité entre les étalons et les solutions à doser (on tend à avoir des composés isovisqueux).

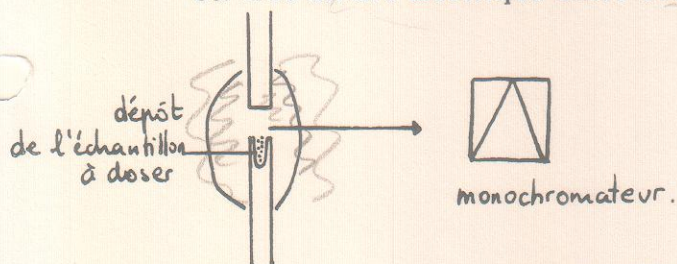
**e) Applications**

- Les composés concernés sont les alcalins et les alcalino-terreux.
  - Méthodes utilisées en biologie pour doser le  $\text{Na}^+$  et le  $\text{K}^+$  (urines...) ainsi que la  $\text{Ca}^{2+}$  (plus rare).
- De plus en plus on utilise des électrodes spécifiques au  $\text{Na}^+$  et au  $\text{K}^+$ .
- Au niveau du médicament : dosage de  $\text{Li}^+$  utilisé comme médicament chez les sujets maniacodépressifs.

**4. Autres spectrométries d'émission**

**a) Spectrométrie d'émission d'arc :**

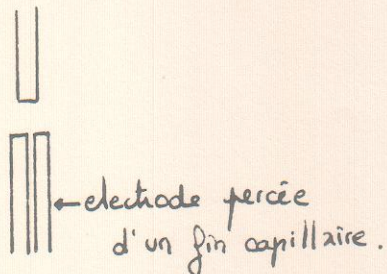
- On utilise un arc électrique au lieu d'une flamme.
- Pour obtenir les atomes à l'état de vapeur et pour les exciter.
- On crée un arc électrique entre deux électrodes (en graphite).



- On applique une ddp de 100 à 200 V pour des intensités fortes de 4A (gaz inerte + vide).

Le rayonnement émis arrive sur un monochromateur. Un système enregistre l'intensité de la lumière émise en fonction de la longueur d'onde. Cette méthode est surtout utilisée au niveau qualitatif : on regarde la position des différentes raies pour identifier l'élément.

**b) Spectrométrie d'étincelles**



Le capillaire sert à amener la solution entre les deux électrodes.  
 On provoque une étincelle sous une ddp très importante entre 15 et 40.000 V.  
 Cette étincelle porte les atomes à l'état de vapeur puis à l'état excité.  
 Le système récepteur est le même que précédemment.  
 C'est aussi une méthode qualitative.

### c) Spectrométrie d'émission par plasma à couplage induit (ICP) (inductively coupled plasma)

Cette méthode se développe considérablement.

- La flamme est remplacée par un plasma. Un plasma est un gaz ionisé mais électriquement neutre (présence d'ions  $\ominus$  + d'ions  $\oplus$  + d'e-).

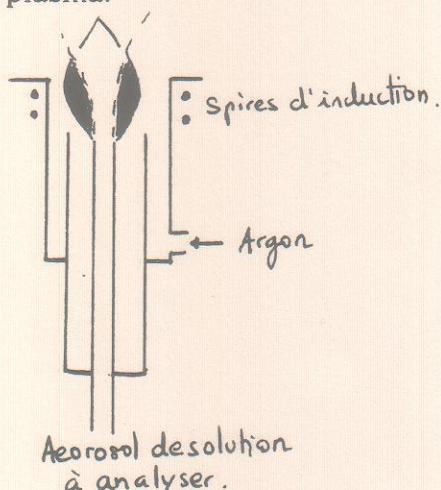
Il est habituellement produit par décharge entre électrodes, par microondes ou inductions haute fréquence.

Le plasma a les propriétés d'un gaz neutre. Il possède une température très élevée, voisine de 7000° C.

#### → Appareillage :

--> Nébuliseur (plus perfectionné que ceux précédemment étudiés)

--> torche à plasma.



C'est un système de 3 tubes concentriques. La solution à analyser est envoyée sous forme de nébulisat. Le 3ème tube sert à envoyer le gaz plasmogène (gaz rare) : le plus utilisé est l'argon. Ces systèmes de verre sont entourés d'une spire de fil conducteur parcouru par un courant alternatif haute fréquence, ce qui crée un champ électromagnétique très intense. La collision des atomes d'argon entraîne la formation d'ions  $\ominus$  + d'ions  $\oplus$  et d'e-.

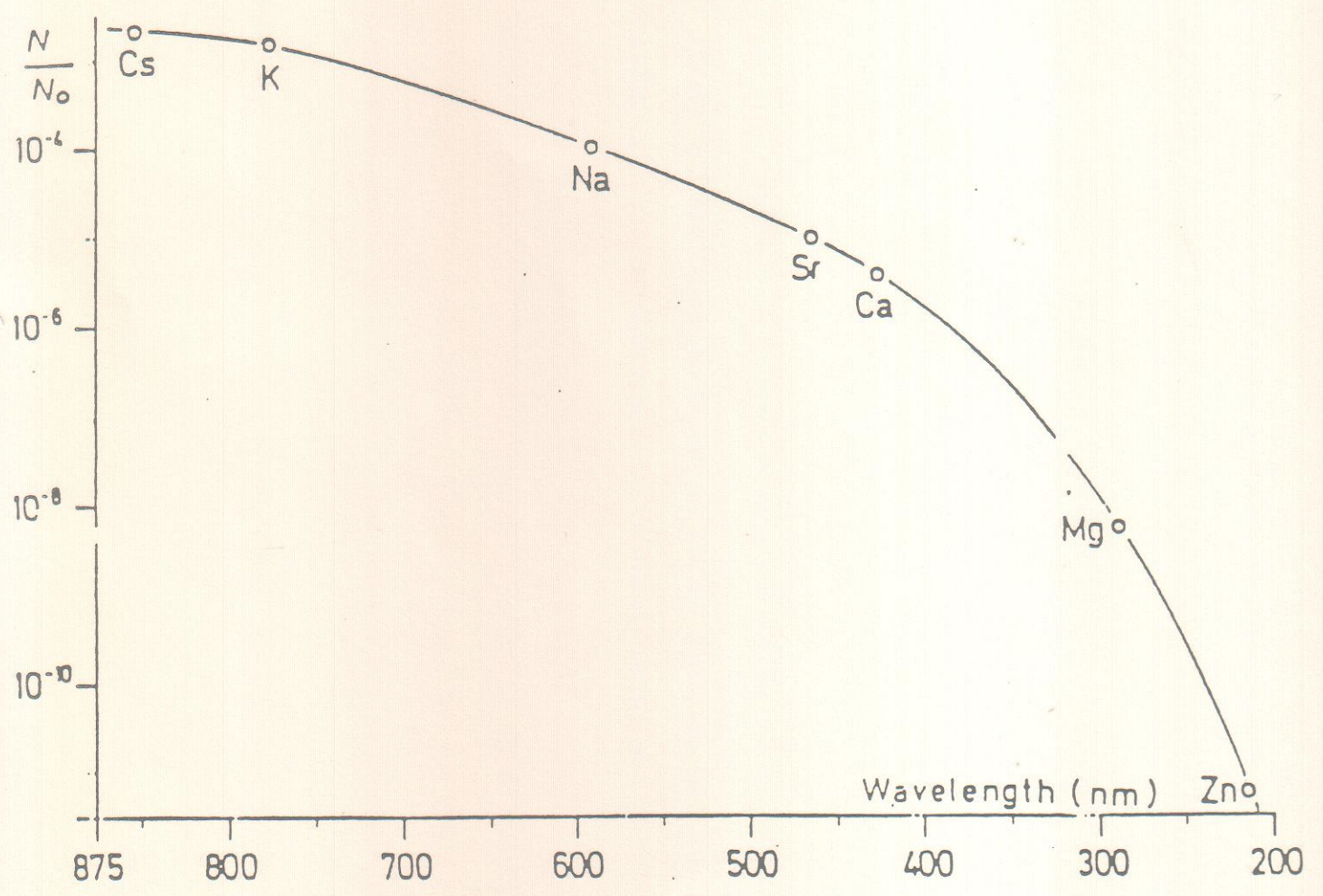
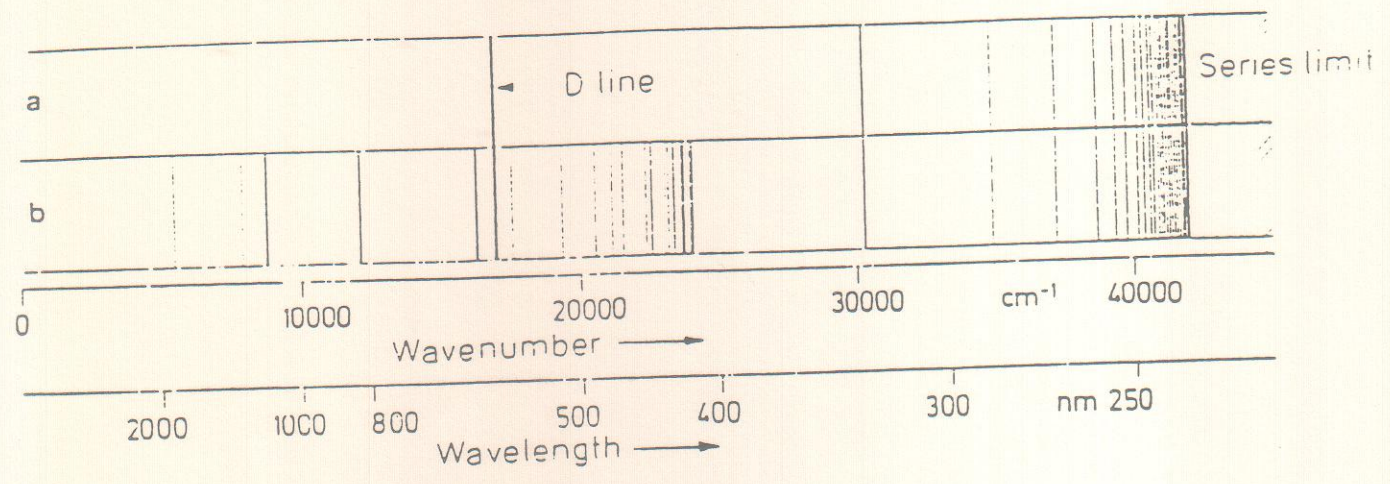
Finalement on mesure l'intensité de la lumière émise (utilisation de monochromateurs pour la sélection).

#### → Mesure :

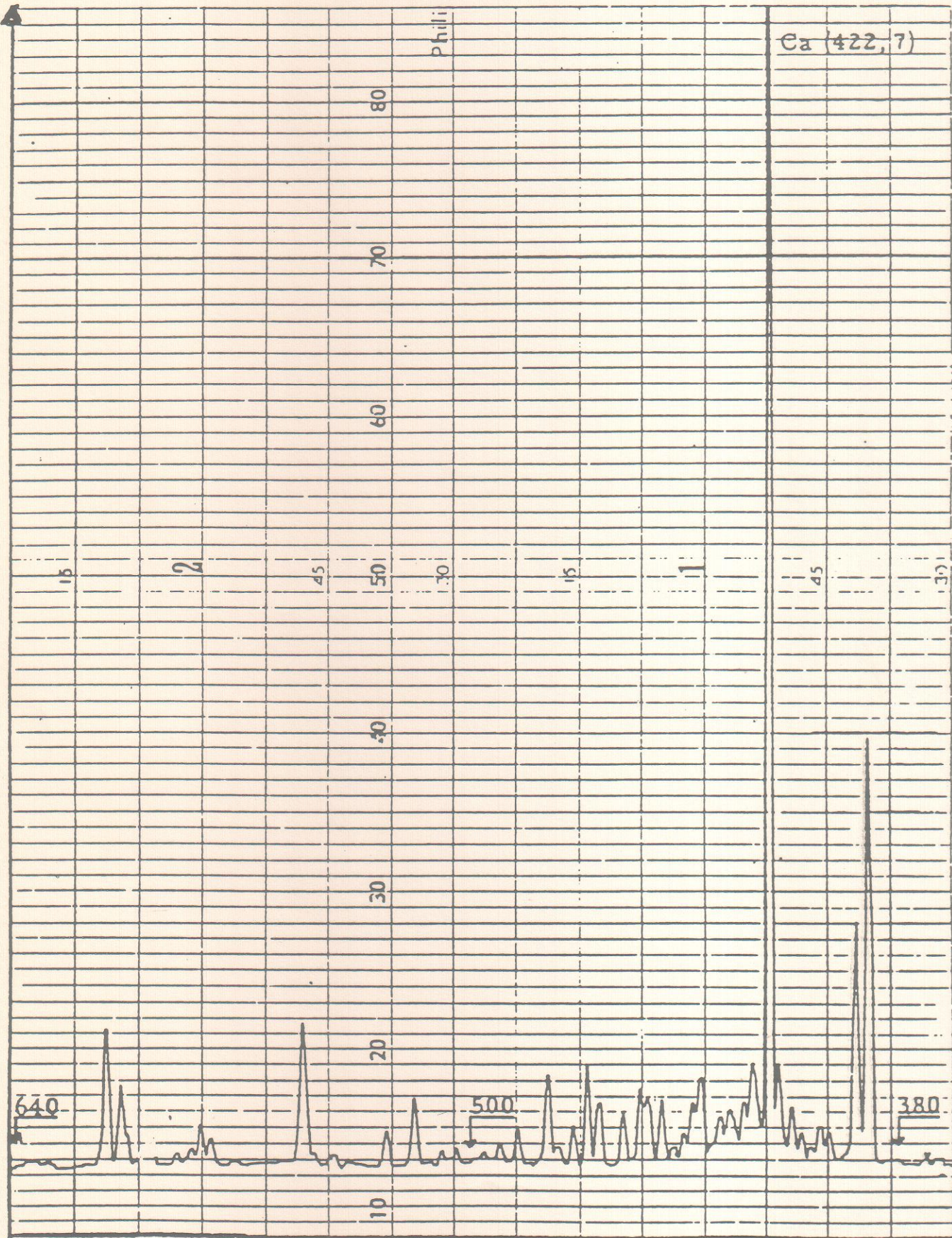
On travaille en général par étalonnage externe.

#### → Applications :

On peut doser par émission la plupart des éléments, ce qui n'était pas possible avec une flamme. Par ailleurs, on peut doser simultanément différents éléments : il suffit de sélectionner la bonne longueur d'onde.



I<sub>E</sub>



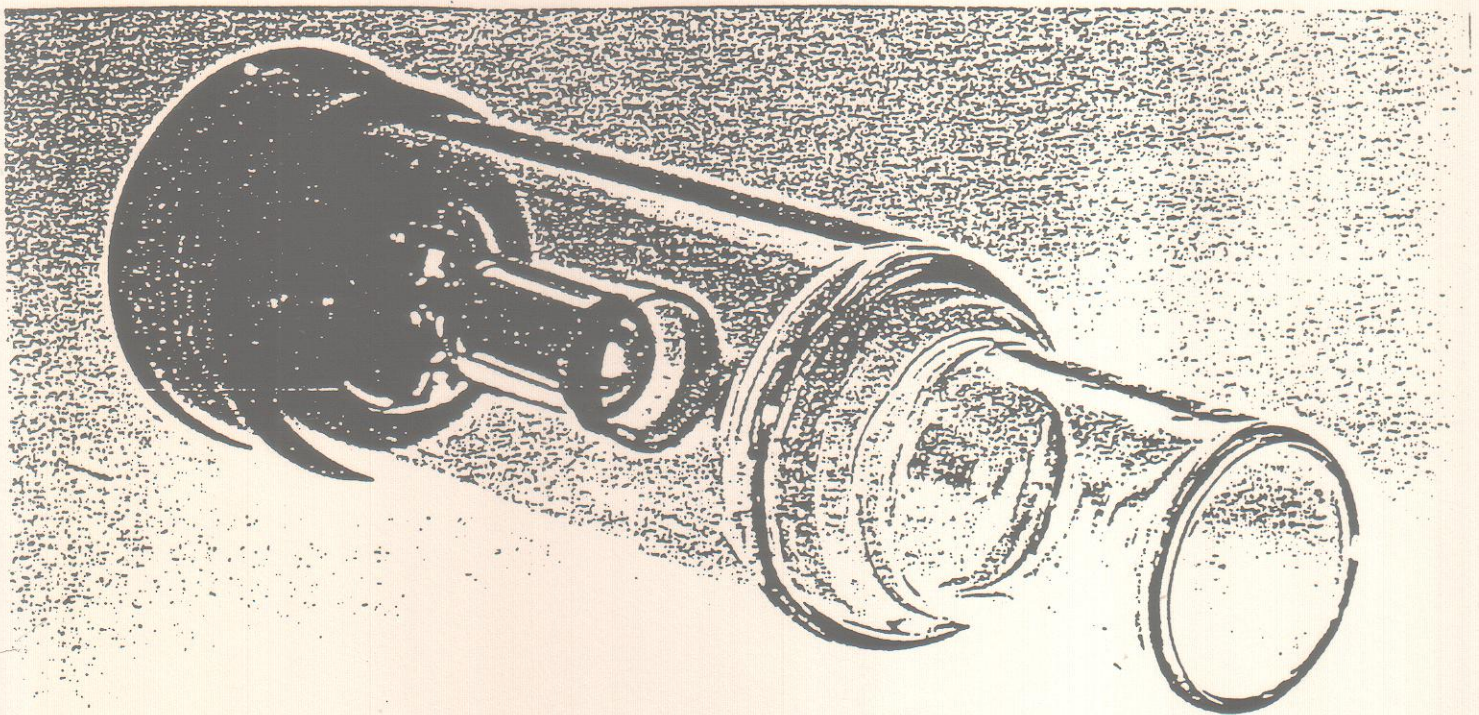
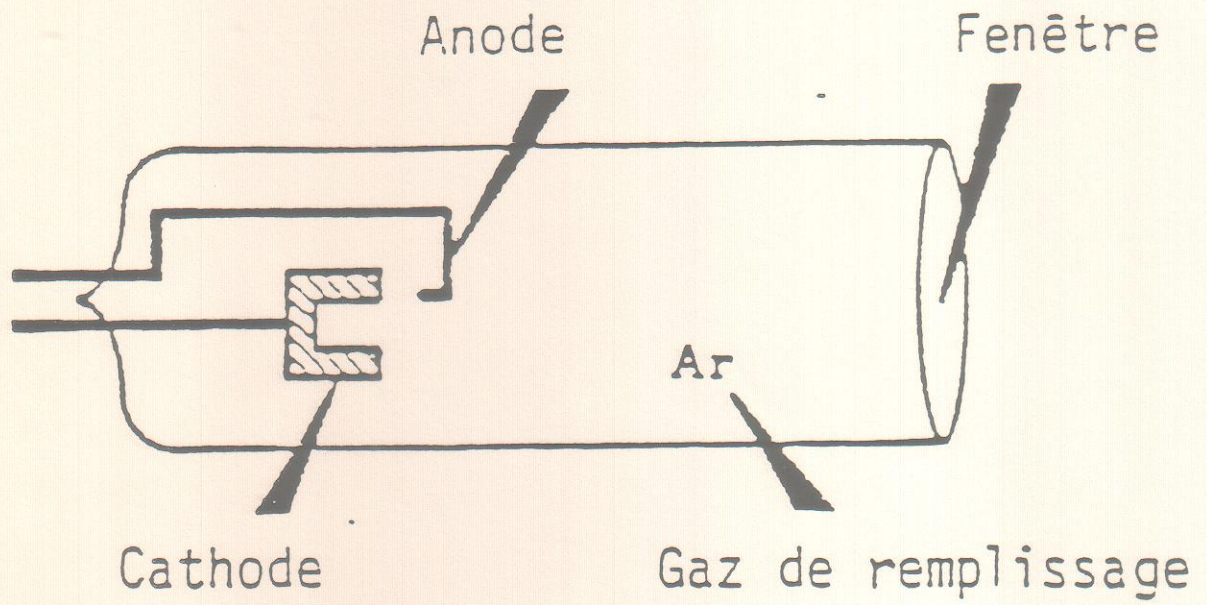
640

500

380

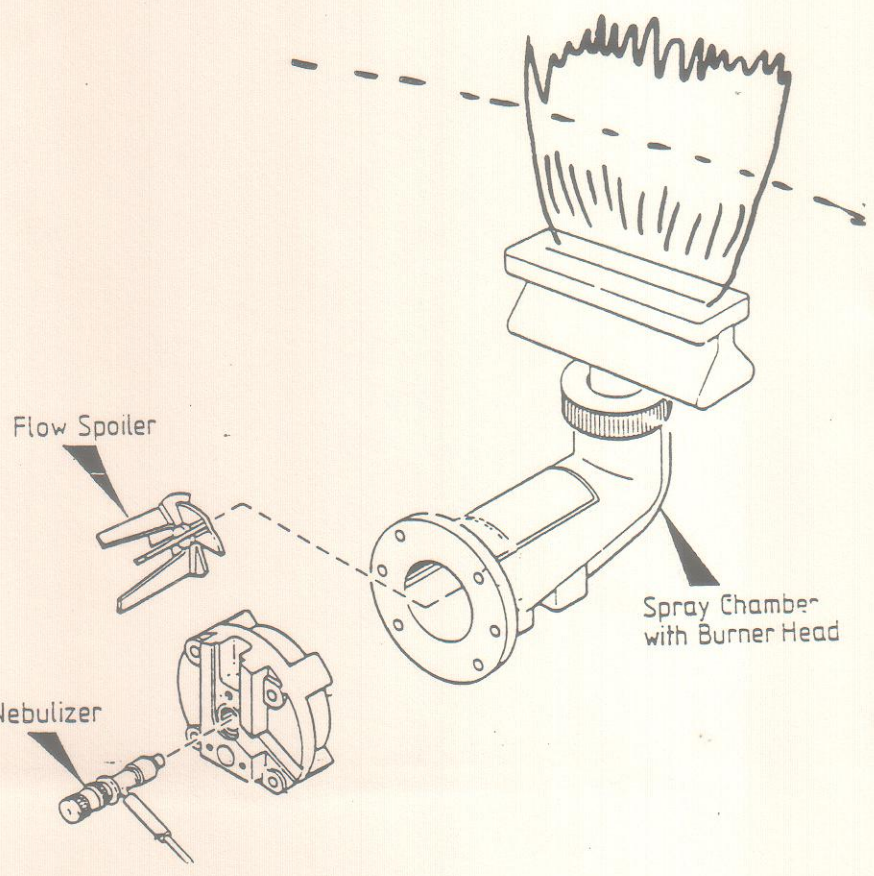
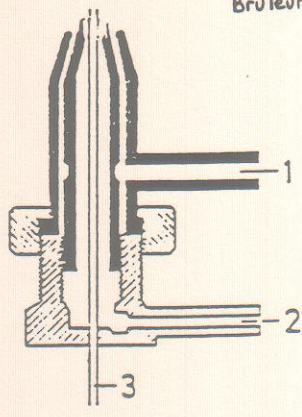
Handwritten marks at the bottom right corner of the page.

## LAMPE A CATHODE CREUSE



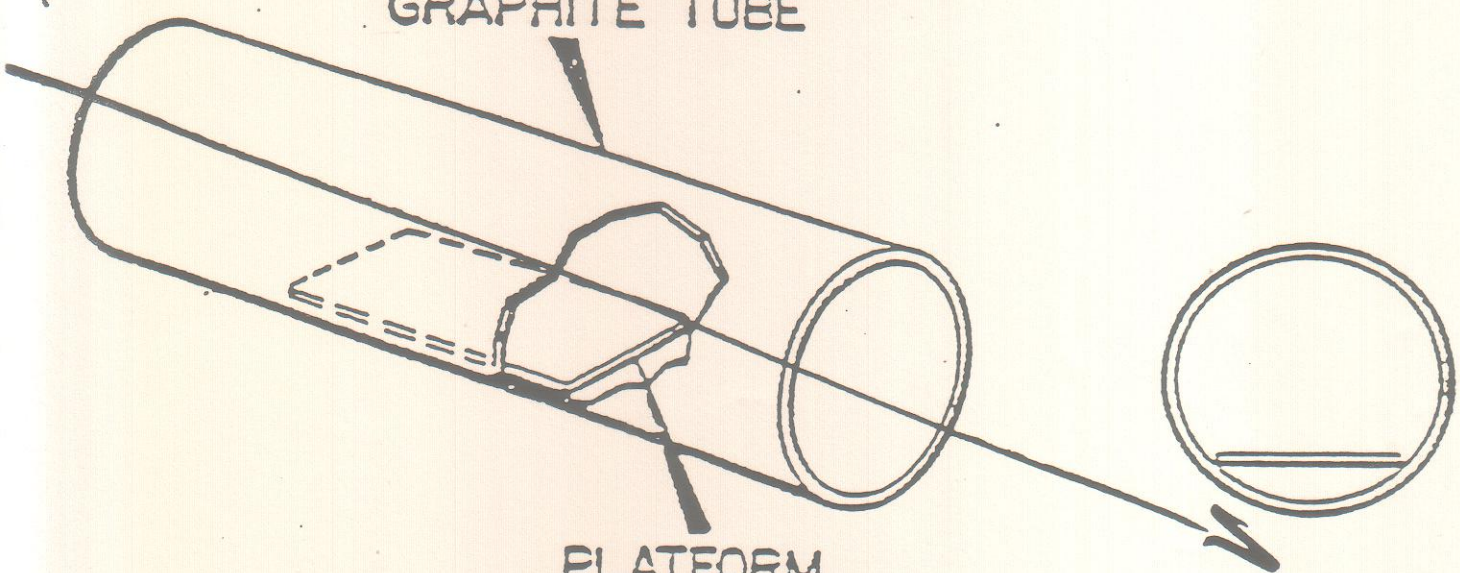


Bruleur à flamme turbulente.



GRAPHITE TUBE

PLATFORM



# SPECTROPHOTOMETRIE - UV VISIBLE

## I. ASPECTS THEORIQUES

### 1. Orbitales moléculaires

- a) Molécules homonucléaires diatomiques
- b) Molécules organiques
- c) Molécules hétéronucléaires

### 2. Transitions électroniques

### 3. Energie dans les molécules

## II. LES SPECTRES

### 1. Groupements chromophores et auxochromes

### 2. Position des bandes

- a) Classement - descriptif
- b) Position des bandes
- c) Facteurs modifiant la position

### 3. Intensité des bandes

- a) Absolue
- b) Relative

## III. MESURE

### 1. Instrumentation

- a) Appareil monofaisceau
- b) Appareil double faisceau
- c) Autres appareils

### 2. Echantillonnage

### 3. Conditions de mesure

- a)  $A = f(c)$  si  $d$  fixée
- b)  $A = f(d)$

### 4. Contrôle de l'appareillage

- a) Exactitude des longueurs d'ondes
- b) Exactitude des absorbances
- c) Vérification de la linéarité de réponse de l'appareil

## IV. APPLICATIONS

### 1. Analyse qualitative

### 2. Analyse quantitative

### 3. Domaines

## SPECTROPHOTOMETRIE UV - VISIBLE

C'est une spectrométrie d'absorption moléculaire :

- L'énergie mise en jeu est l'énergie de transition électronique. Elle correspond à un domaine spectral allant de 10 à 750 nm (exprimé en longueur d'onde).

- En pratique, on ne peut descendre en-dessous de 200 nm car le  $\text{CO}_2$  et l' $\text{O}_2$  de l'atmosphère absorbent. Pour avoir des bandes d'absorption  $> 200 \text{ nm}$  il faudrait travailler sous vide.

--> Travail dans l'u.v. 200 - 350 nm.

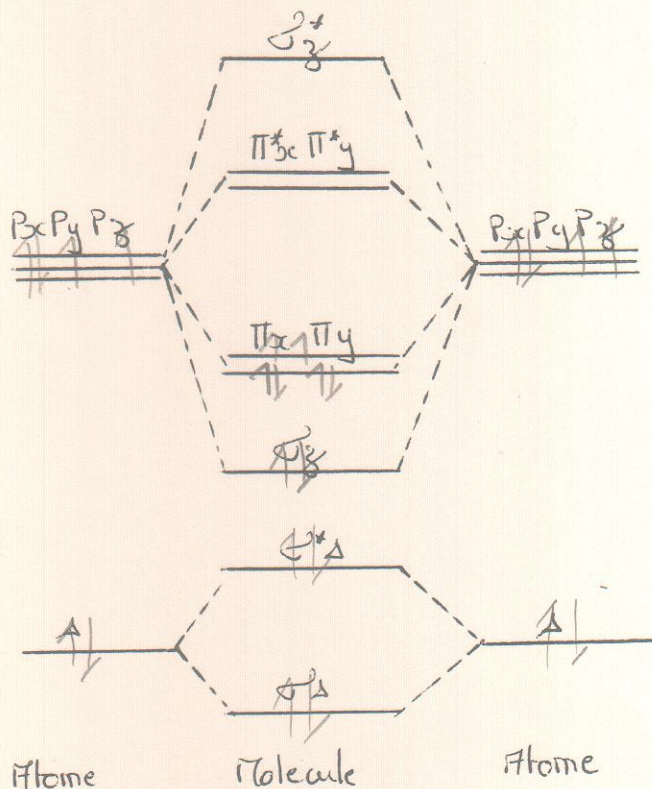
--> Travail dans le visible : 350 - 700 nm. On doit utiliser du quartz en dessous de 350 nm, mais dans ce domaine de longueurs d'ondes on pourra prendre du quartz, du verre, du plastique.

## I. ASPECTS THEORIQUES

### 1. Orbitales moléculaires

Une molécule est formée d'atomes liés entre eux par une/des liaisons chimiques. Les e- gravitent dans l'orbitale moléculaire. Lorsque la molécule absorbe de l'énergie, l'e- passera dans une orbitale moléculaire de niveau supérieur.

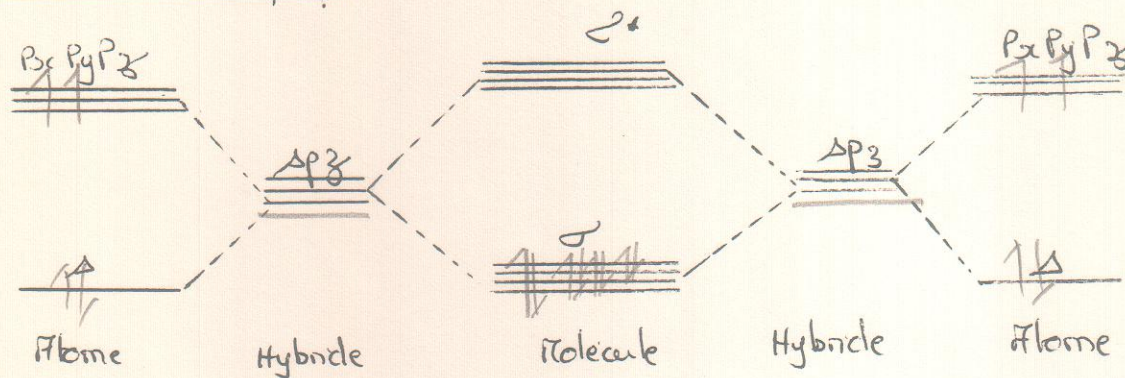
#### a) Molécules homonucléaires diatomiques



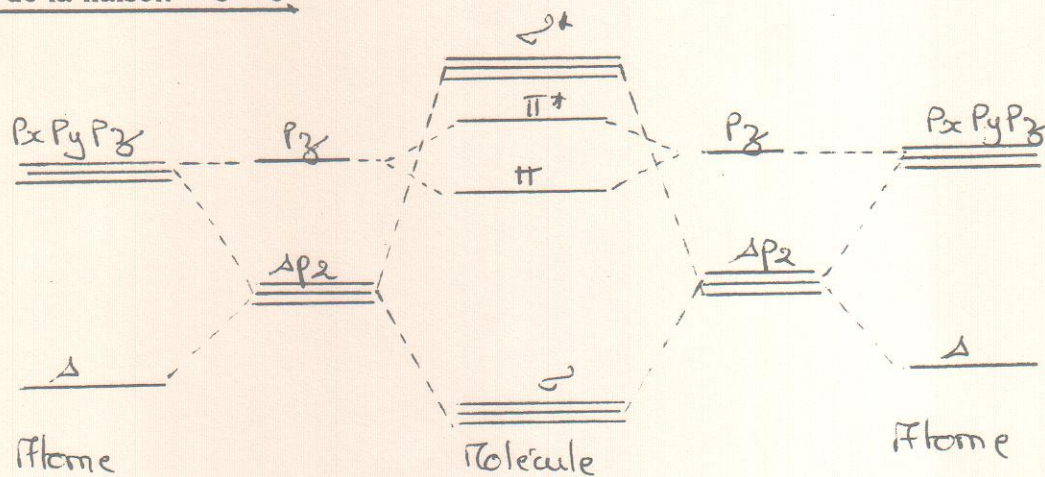
b) Molécules organiques :

Toutes les liaisons étant identiques, on doit hybridier les orbitales atomiques avant d'hybrider les orbitales moléculaires.

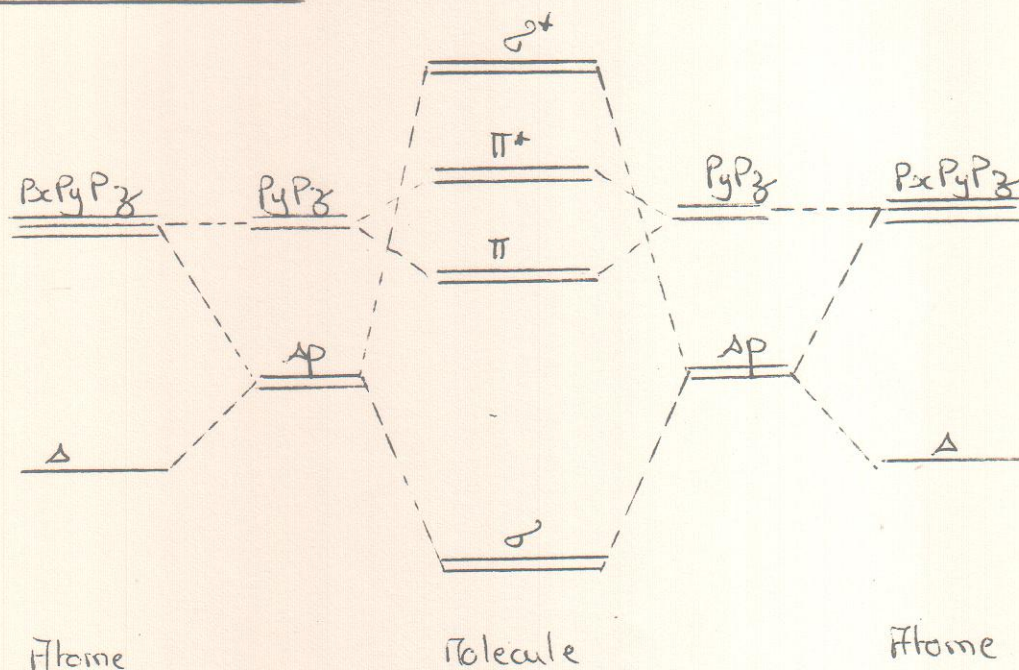
--> Cas de la liaison - C - C -



--> Cas de la liaison >C = C<



--> Cas de la liaison - C ≡ C -

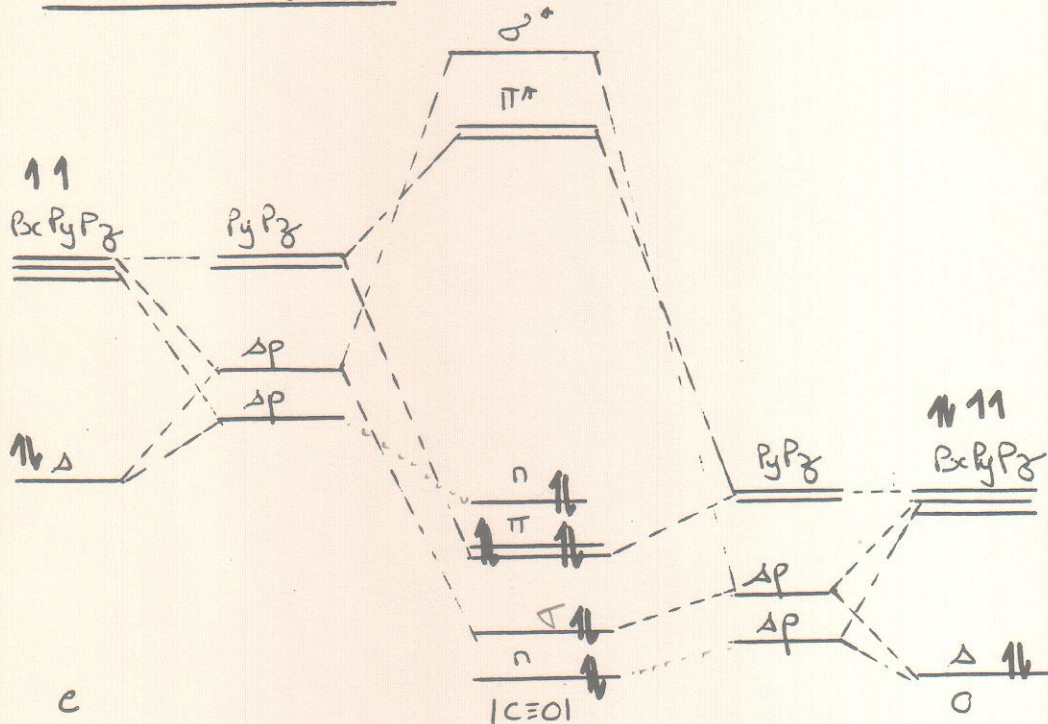


Dans les molécules organiques ne contenant que C et H, on rencontre 2 types d'orbitales moléculaire, liantes et anti-liantes ( $\sigma$  et  $\pi$ ).

c) Molécules hétéronucléaires

On constate que des atomes vont avoir des e- ne participant pas à la liaison : on aura une orbitale moléculaire non liante.

--> Présentation de [C≡O]

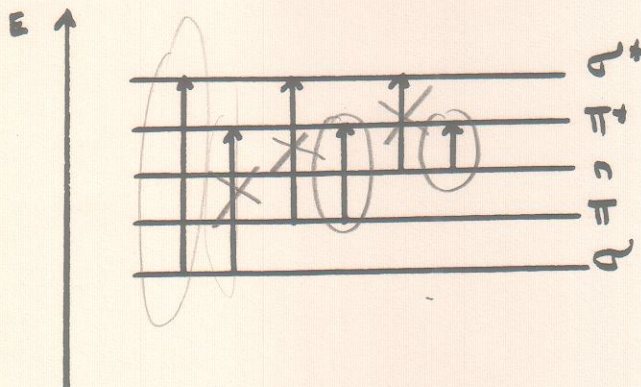


Mode de remplissage des e- : On commence par remplir les orbitales de moindre énergie.

Les e- appariés sont de spins opposés.

Toutes les orbitales liantes et non liantes sont occupées ( C≡O ) alors que les orbitales anti-liantes ne le sont pas. (A l'état fondamental). Lorsque l'on fournit de l'énergie à la molécule, les e- vont passer sur les orbitales anti-liantes.

2. Les transitions électroniques



--> Transition  $\pi \rightarrow \pi^*$  : elle existe à condition que l'on fournisse une énergie de basse longueur d'onde ( $< 200$  nm). Elle n'est pas visible en dessous de cette limite. Cette transition a lieu dans les composés saturés.

--> Transition  $\sigma \rightarrow \pi^*$ : elle est impossible du fait de la disposition de ces deux orbitales dans l'espace (axes différents).

--> Transition  $\pi \rightarrow \pi^*$ : elle existe, les orbitales étant de même nature et peut être observée. Elle est rencontrée chez les composés insaturés.

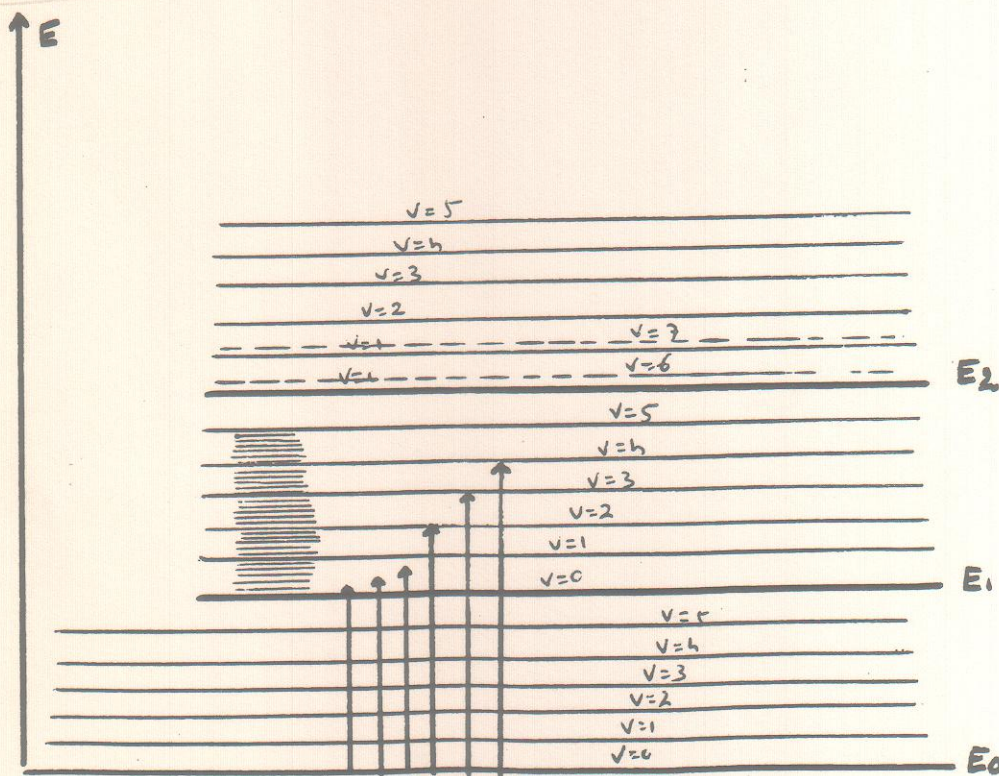
--> Transition  $n \rightarrow \sigma^*$ : elle peut être observée, mais la bande d'absorption est très souvent inférieure à 200 nm.

--> Transition  $n \rightarrow \pi^*$ : elle existe et peut être observée. Elle signe la présence d'hétéroatomes.

### 3. Energie dans les molécules : (cours du jeu 4 Novembre 1933)

On a affaire à des spectres de bandes car la molécule pourra se trouver dans différents états de vibration et de rotation.

Lorsque les e- se trouvent sur des orbitales liantes, la molécule est à son niveau d'énergie électronique le plus bas ( $E_0$ ). Si on fournit à cette molécule de l'énergie, elle occupera un niveau supérieur avec des niveaux de vibration et de rotation particuliers.



## II. LES SPECTRES

Ce sont des spectres de bandes, caractérisées par la position et l'intensité des bandes.

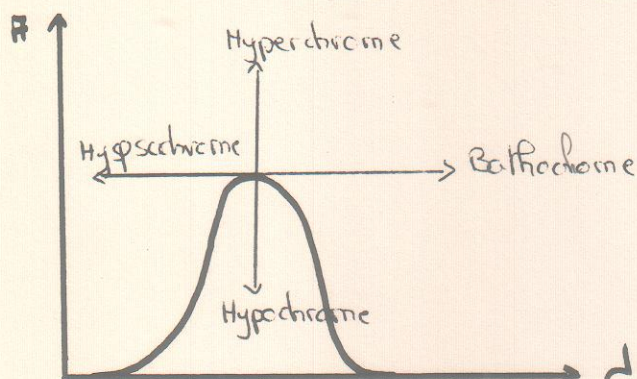
Ils sont dus aux groupements chromophores et auxochromes.

### 1. Groupements chromophores et auxochromes

- Les groupements chromophores sont des groupements susceptibles d'absorber dans l'uv-visible. "Chromophore" signifie "porter la couleur".

On les rencontre lors des transitions  $\pi \rightarrow \pi^*$  avec  $\text{C}=\text{C}$   
 $n \rightarrow \pi^*$  avec  $\text{C}=\text{O}$

- Les groupements auxochromes constituent des substituants des chromophores; ils vont modifier leur longueur d'onde et leur intensité.



Un substituant a un effet :

--> Bathochrome : lorsqu'il provoque un glissement de la bande d'absorption vers une bande plus longue.

--> Hypsochrome : lorsqu'il provoque un glissement de la bande d'absorption vers une bande plus courte.

--> Hyperchrome : lorsqu'il provoque une augmentation de l'intensité de la bande d'absorption.

--> Hypochrome : lorsqu'il provoque une diminution de l'intensité de la bande d'absorption.

## 2. Position des bandes

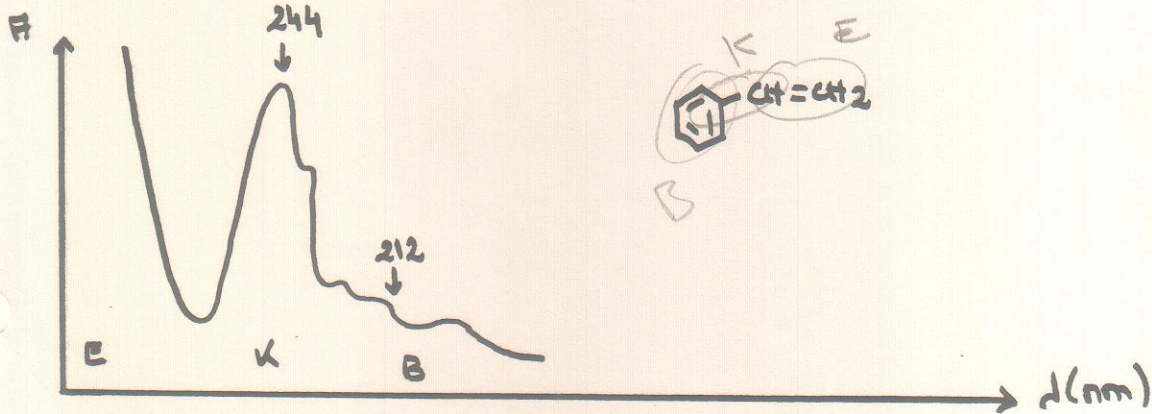
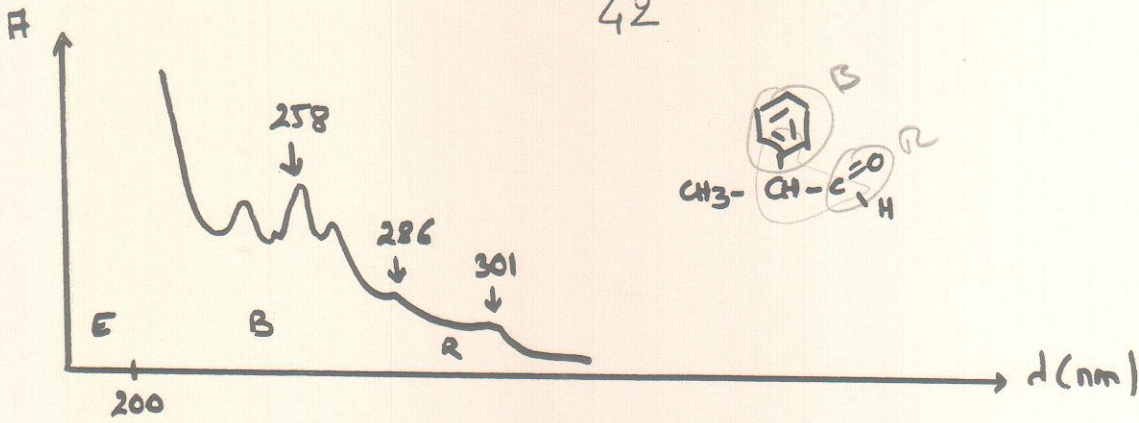
### a) Classement - description

- Bandes E : correspondant aux groupements "éthyléniques" concernent les transitions  $\pi \rightarrow \pi^*$ .  
Ce sont des bandes intenses avec  $\epsilon$  égal ou  $> 10.000$  ( $\epsilon$  = coef. d'absorbance moléculaire).  
 $\text{>C=C<}$  totalement isolé absorbe à 170 nm.

- Bandes K : "Konjugate", elles sont dues à des groupements conjugués, concernent les transitions  $\pi \rightarrow \pi^*$ .  
Ce sont des bandes intenses avec  $\epsilon$  égal ou  $> 10.000$  et qui absorbent à des longueurs d'ondes élevées.

- Bandes B : "Benzénoïde" correspondent aux doubles liaisons conjugues du noyau aromatique concernent des transitions  $\pi \rightarrow \pi^*$ .  
Elles sont d'intensité plus faible  $\epsilon > 1000$ .  
Pour le benzène, le maximum d'absorption s'effectue pour  $\lambda$  max. = 255 nm.

- Bandes R : "Radiculaires"  
Elles marquent la présence d'hétéroatomes.  
correspondent à des transitions  $n \rightarrow \pi^*$ .  
Leur intensité est faible  $\epsilon < 100$ .  
Elles ont lieu pour des  $\lambda$  max.  $> 250$  nm.



**b) Position des bandes**

On peut la préciser lorsqu'on connaît la structure de la molécule. L'inverse n'est pas vrai. On pourra ainsi, vérifier une hypothèse.

La position des bandes est déduite à partir de la structure de la molécule et des règles de Woodward - Fieser (basées sur les 3 chromophores suivants) :

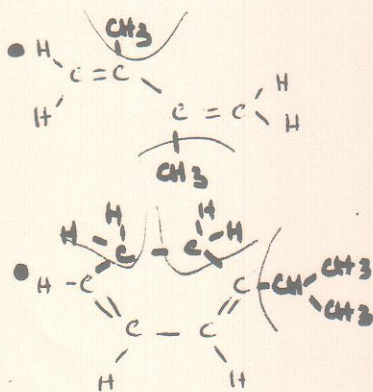
**a) Le chromophore éthylénique**

$\text{>C=C<}$  absorbe à 170 nm ( $\lambda$  du max. d'absorption lorsqu'ils sont isolés)

$\text{>C=C<}$  absorbe à 214 nm

$\text{>C=C<}$  absorbe à 253 nm

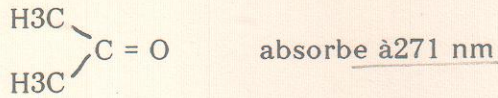
*↓ E plus rapprochés.*



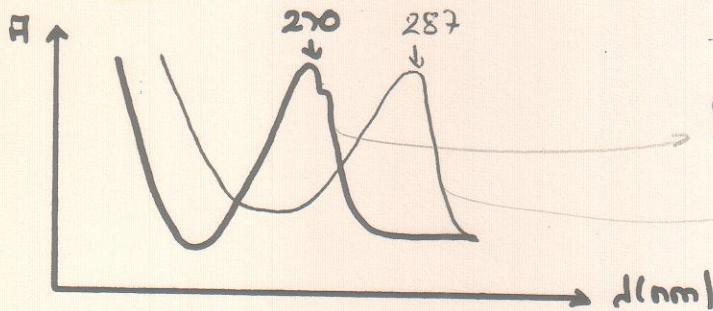
Lorsqu'on ajoute un CH<sub>3</sub>, on a un effet bathochrome qui ajoute 5 nm à  $\lambda$ . On aura alors :  
 $214 + 5 + 5 = 224$  nm (max. d'absorption de la molécule)

$253 + 5 + 5 + 5 = 268$  nm

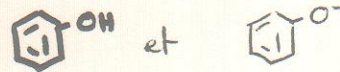


**B) Le chromophore carbonyle :****γ) Le chromophore benzénique**

absorbe à 255 nm

**c) Facteur modifiant la position****α) Le pH :**

ex: le phénol: il existe sous deux formes possibles.

**B) Le solvant**

Plus le solvant est polaire, plus l'espacement des niveaux d'énergie est grand et plus les bandes d'absorption se trouvent vers les courtes longueurs d'ondes.

L'acétone dissout dans l'eau	absorbe à	265 nm
le méthanol	absorbe à	270 nm
CHCl <sub>3</sub>	absorbe à	276 nm
CCl <sub>4</sub>	absorbe à	280 nm

**3. Intensité des bandes****a) Absolue :**

L'intensité des bandes dépend des transitions  $\pi \rightarrow \pi^*$  (E-K) et des substituants  
 $\pi \rightarrow \pi^*$  (B)  
 $n \rightarrow \pi^*$  (R)

(de leur répétition)

Elle dépend également du nombre de chromophores dans la même molécule.

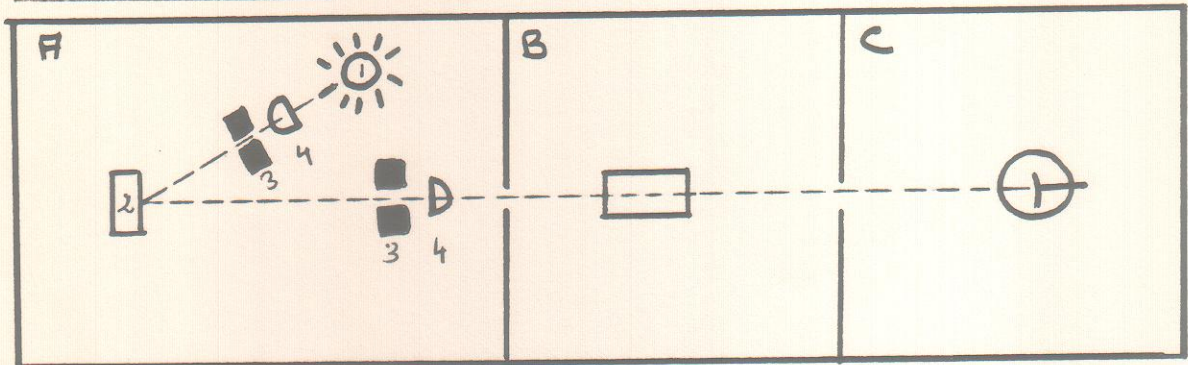
**b) Relative :**

L'intensité dépend de la concentration du composé : loi de Beer Lambert.

### III. MESURE

#### 1. Instrumentation

##### a) Appareil monofaisceau :



**Compartment A :** Dispositif d'émission d'un faisceau de radiations.

(1) Sources : elles sont en quartz et contiennent selon les domaines considérés :

- du deutérium ou de l'hydrogène: U V  $\left\{ \begin{array}{l} 200 \rightarrow 350 \text{ nm} \\ 350 \rightarrow 750 \text{ nm} \end{array} \right.$
- du tungstène halogène : visible  $\left\{ \begin{array}{l} 200 \rightarrow 350 \text{ nm} \\ 350 \rightarrow 750 \text{ nm} \end{array} \right.$

(2) Sélecteurs de radiations :

- Filtres interférentiels : on a alors affaire à un photomètre.
- Monochromateurs (à prisme - à réseau).

(3) (4) Dispositifs supplémentaires (fentes - lentilles) destinés à obtenir un faisceau à rayons parallèle.

**Compartment B :** dispositif de présentation de la solution (porte cuve et cuve).

La cuve est en :

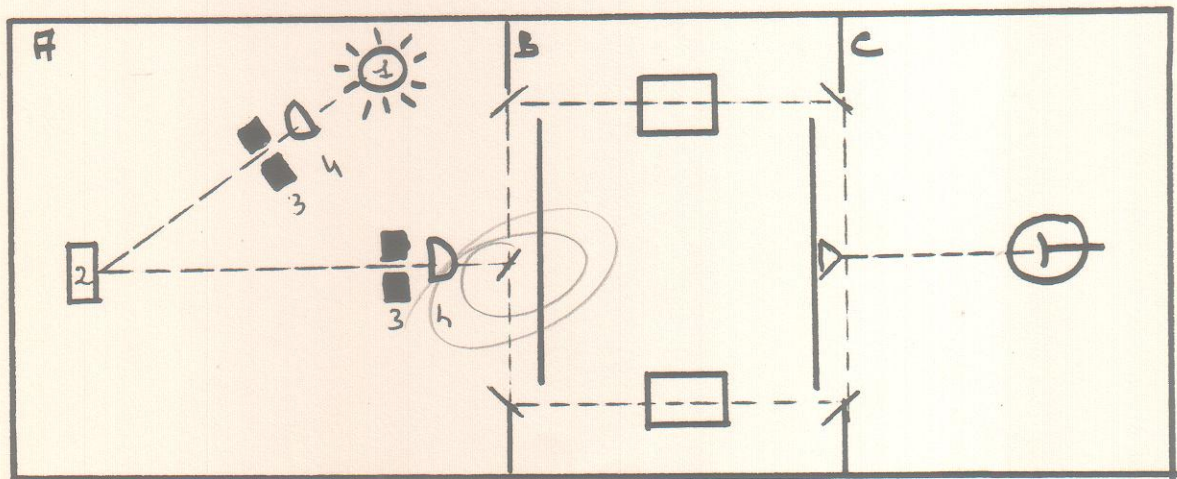
- quartz si  $\lambda = 200 - 750 \text{ nm}$
- verre si  $\lambda = 330 - 750 \text{ nm}$
- plastique si  $\lambda = 340 - 750 \text{ nm}$

Le trajet optique est généralement de 1 cm, mais il peut être de 0,2; 0,5; 2; 10 cm.

**Compartment C :** chaîne de mesure. On utilise :

- soit des détecteurs à vide : phototubes ou photomultiplicateurs,
- soit des détecteurs à semi-conducteurs (ex. : cellule photovoltaïque).

##### b) Appareil double faisceau



**Compartiment A** : Il permet la sélection de la radiation monochromatique selon un processus identique à celui de l'appareil monofaisceau. A la fin, il présente un dispositif permettant d'envoyer de la lumière alternativement sur les cuve de référence et sur la cuve de mesure, dans le compartiment B. On a :

- soit un miroir transparent : 50 % de la lumière traverse,
- soit un demi-miroir tournant (50 cycles/s).

**Compartiment B** : Il comporte une cuve de référence et une cuve de mesure.

**C. Autres appareils** : le spectro-photomètre à barette de diodes, utilisé comme détecteur de CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance).

- Source : lampe de déutérium
- Volet mobile qui hache le signal
- Cuve échantillon
- Système de lentilles + fentes
- Monochromateur : réseau ; la totalité de la lumière émise par la lampe traverse la cuve puis arrive sur le monochromateur qui la disperse. La lumière à une  $\lambda$  telle que :  $190 < \lambda < 510 \text{ nm}$ .

Cette lumière arrive sur une barette de diodes (il peut y en avoir jusqu'ici une centaine). Chaque diode est chargée de mesurer la radiation d'une certaine longueur d'onde ce qui permet d'avoir en permanence le spectre (autrement, avec les autres appareils, on effectue des balayages).

## 2. Echantillonnage

- Les mesures sont toujours effectuées sur des solutions.
- On utilise une cuve appropriée selon les longueurs d'onde auxquelles on travaille.

## 3. Conditions de mesure

a)  $\lambda$  fixe  $\implies A = f(c)$

--> Si on utilise un appareil monofaisceau, on effectue des mesures par substitution :

- on choisit la  $\lambda$
- réglage au zéro d'absorbance ( $A = 0$ )
- mesure de l'absorbance du blanc (solvant + cuve)  $A_0$
- mesure de l'absorbance de l'essai (solvant + cuve + composé)  $A_1$

L'absorbance due au composé est ( $A_1 - A_0$ ).

Si on travaille à une autre  $\lambda$ , il faut à nouveau régler le zéro d'absorbance.

--> Si on utilise un appareil double faisceau, on effectue des mesures par comparaison :

- réglage au zéro d'absorbance : on fait l'égalité entre le faisceau de référence et le faisceau de mesure,

- on choisit la  $\lambda$ ,

- on introduit le blanc dans le faisceau de référence et l'essai dans le faisceau de mesure.

On lit directement l'absorbance due à l'essai.

Ici, le zéro d'absorbance est valable pour toutes les  $\lambda$ .

## b) Spectre $A = f(\lambda)$

--> Si on utilise un appareil monofaisceau... en fait ce n'est pas vraiment possible. Imaginez, il faudrait sans arrêt effectuer le zéro d'absorbance.

--> Par conséquent, on utilise un appareil double faisceau.

## 4. Contrôle de l'appareillage

### a) Exactitude des longueurs d'onde

- Lorsqu'on effectue des mesures en valeur absolue :

$A = \epsilon \cdot l \cdot C$  avec  $\epsilon$  et  $l$  connus, on peut directement connaître la concentration. Mais ces mesures demandent certaines conditions, notamment de connaître exactement  $\lambda$ .

- Lorsqu'on effectue des mesures en valeur relative :

Le fait de travailler en dehors du maximum d'absorption entraîne une perte de linéarité.

Pour vérifier que les  $\lambda$  sont bien calées, on fait un spectre présentant des bandes d'absorption étroites (utilisation de terres rares : comme une solution de nitrate d'Holmium), utilisable pour les appareils double faisceau.

On utilise les bandes d'émission de lampes basses pressions si on travaille avec un appareil monofaisceau. (Cf spectre d'émission du mercure).

### b) Exactitude des absorbances

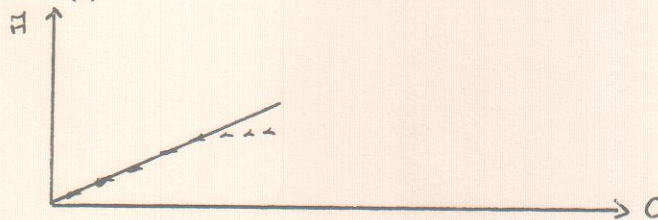
On utilise des composés présentant les bandes d'absorption les plus longues possibles. On vérifie les absorbances de composés dont on connaît  $A = f(c)$ .

Ex. : solutions de  $K_2CrO_7$  /  $Ni^{2+}$  /  $Co^{2+}$

### c) Vérification de la linéarité de réponse de l'appareil

On réalise des solutions de concentrations croissantes et on vérifie la linéarité de

$A = f(c)$ .



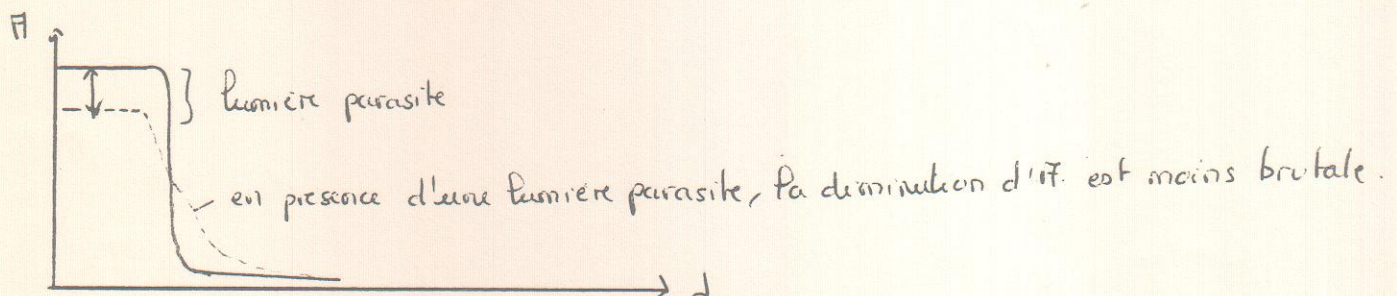
S'il y a perte de linéarité, on recherche la lumière parasite : lumière qui arrive directement sur le détecteur en ayant ou non traversé la cuve.

. Elle peut traverser la cuve mais on n'aura pas une  $\lambda$  appropriée pour être détectée.

. Elle ne la traverse pas mais aura une  $\lambda$  plus grande.

On introduit alors dans la cuve, des composés qui absorbent totalement cette lumière : ils constituent des filtres à flanc raide.

Exemple d'une lumière parasite avec l'Acétone.



Ce phénomène de lumière parasite se rencontre lorsque l'appareil est mal entretenu.

## IV. APPLICATIONS

### 1. Analyse qualitative

Elle est peu performante par rapport à l'IR et à la RMN nous précise Mr LATER.

On peut l'utiliser pour :

- L'identification d'un échantillon inconnu par rapport à des spectres connus.

Ainsi, la pharmacopée française se sert de cette méthode pour identifier la chloroquine (par recherche/mise en évidence des max. d'absorption à 342 - 328 - 356 - 235 - 220 nm).

- L'analyse fonctionnelle : elle permet d'identifier les groupements fixés sur les molécules par déplacement des  $\lambda$ .

Toutefois, il n'est pas très futé d'utiliser cette méthode pour une telle perspective.

### 2. Analyse qualitative

Elle est bien plus utilisée... mais elle "souffre d'un défaut" : elle manque de spécificité. Cette nouvelle vous envahira certainement d'une tristesse profonde, pourtant, on pourra effectuer :

--> des mesures directes :

- On cherche à déterminer la concentration de l'échantillon par mesure de son absorbance. Ceci est valable si on a une solution pure, un milieu simple. On peut faire.

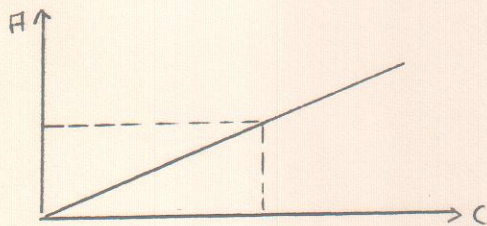
- Des mesures en valeur absolue : connaissant  $\epsilon$

Ex. : cyanocobalamine (= vit. B 12) dosée à 361 nm avec  $\epsilon = 267$ .

Il faut un calage de  $\lambda$  parfait et une bande passante suffisamment étroite.

(Ex. : bandes passantes différentes, spectre du NADH).

- Des mesures en valeur relative : elles nécessitent la construction d'une courbe d'étalonnage.



--> Des mesures indirectes :

On n'utilise pas les propriétés spectrales du composé à doser.

- On procède à une transformation chimique ou biochimique du composé.

Ex. : transformation de l'hémoglobine en cyanméthémoglobine (par ajout de cyanures) dont  $\lambda$  max. est bien déterminée.

- Il peut y avoir transformation des propriétés spectrales d'un réactif par le composé.

Ex. : complexation du  $\text{Ca}^{2+}$  par de l'ortho-crésol phtaléine. Le complexe formé absorbe à une  $\lambda$  différente du complexant. A cette  $\lambda$  on peut déterminer la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$ .

- On dose un composé suite à une chaîne de réactions.

Ex. : dosage du glucose.

Glucose  $\xrightarrow{\text{glucose oxydase}}$  ac. glucuronique + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dosée par utilisation de ses propriétés réductrices

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + chromogène réduit  $\xrightarrow{\text{péroxydase}}$  chromogène oxydé coloré)

### 3. Domaines :

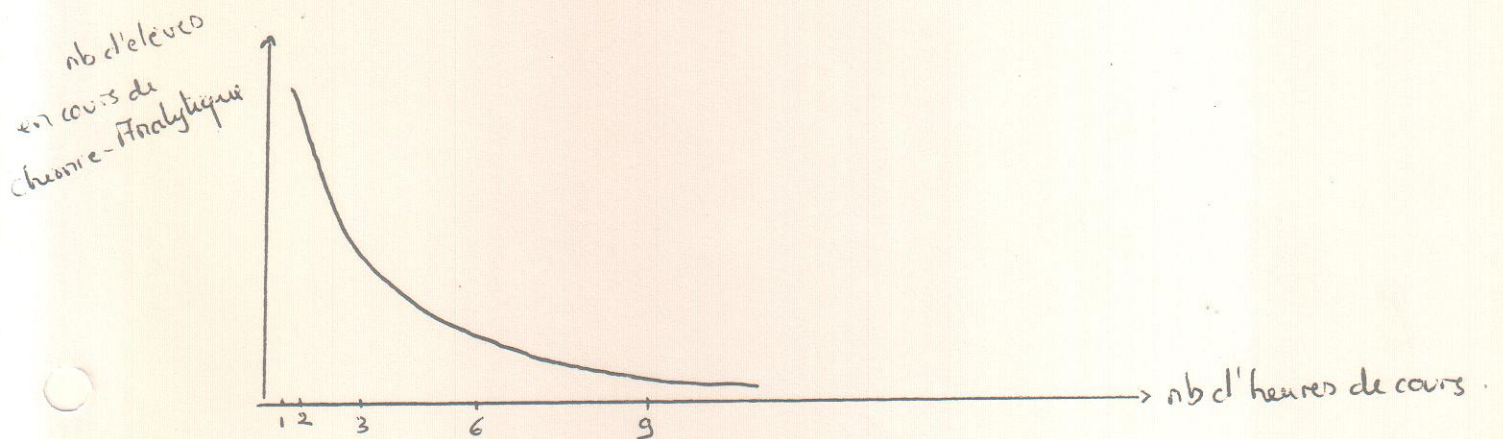
- du médicament
- de la Biologie : 95 % des composés biologiques sont dosés par des méthodes spectrométriques
- alimentaire
- environnement.

Au fait,... ce soir le moral de Mr LATER n'était pas génial (il frisait le zéro absolu).

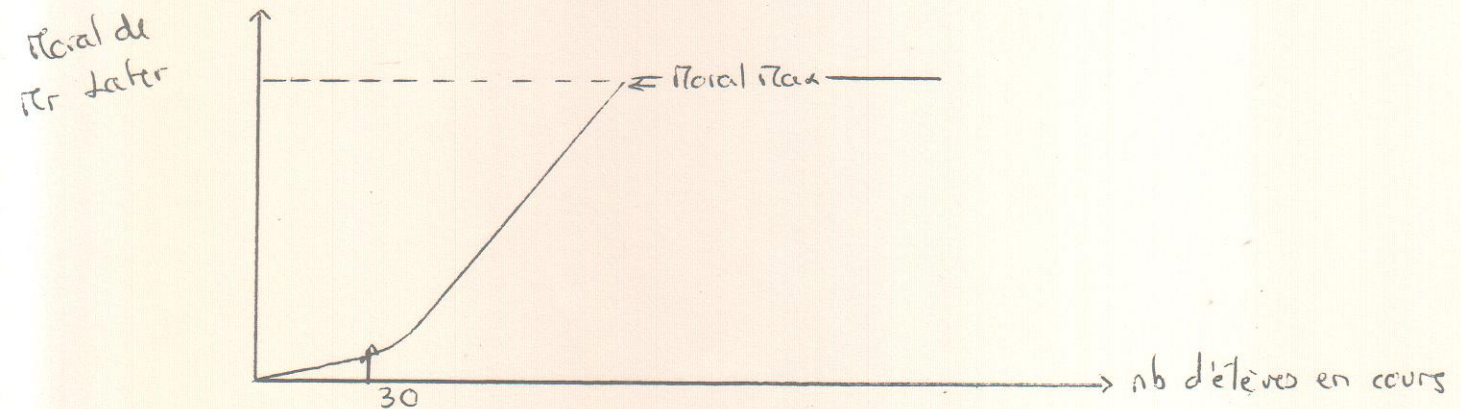
"La chimie - analytique" nous a-t-il dit... "ça n'intéresse plus personne !"

Bien sûr, nous ne pouvions pas le laisser dans un état aussi pitoyable et avons tenté de lui remonter le moral. Cette tâche s'avérait d'emblée difficile... nos arguments concernant la diminution de son taux d'écoute furent bien maigres en effet. Que faire alors ?... vous faire part de cette triste nouvelle et vous demander de l'aide.

Nous faisons paraître quelques chiffres et vous proposons de les méditer autant que le reste du cours :

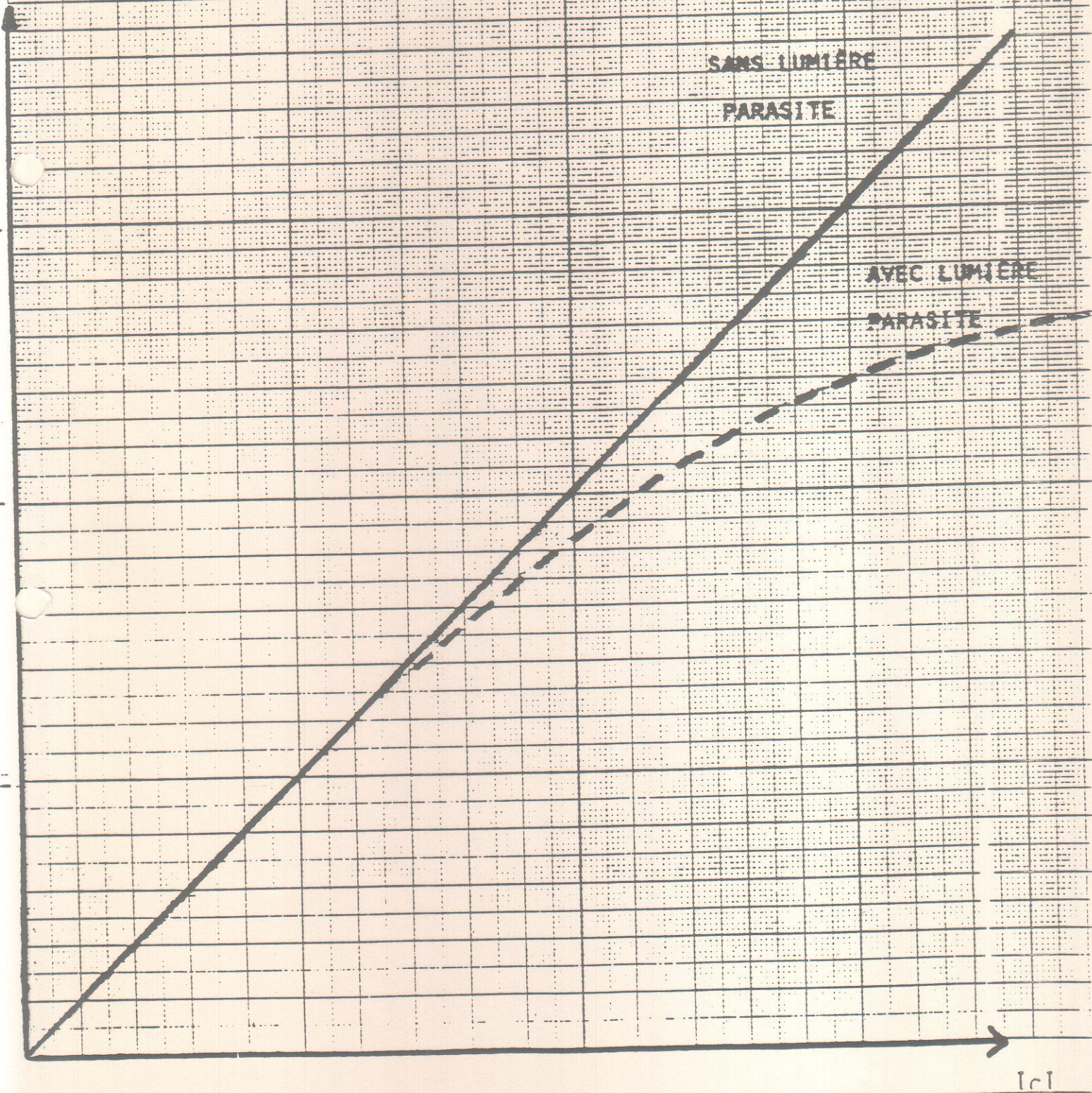


Des études poussées prouvent que :



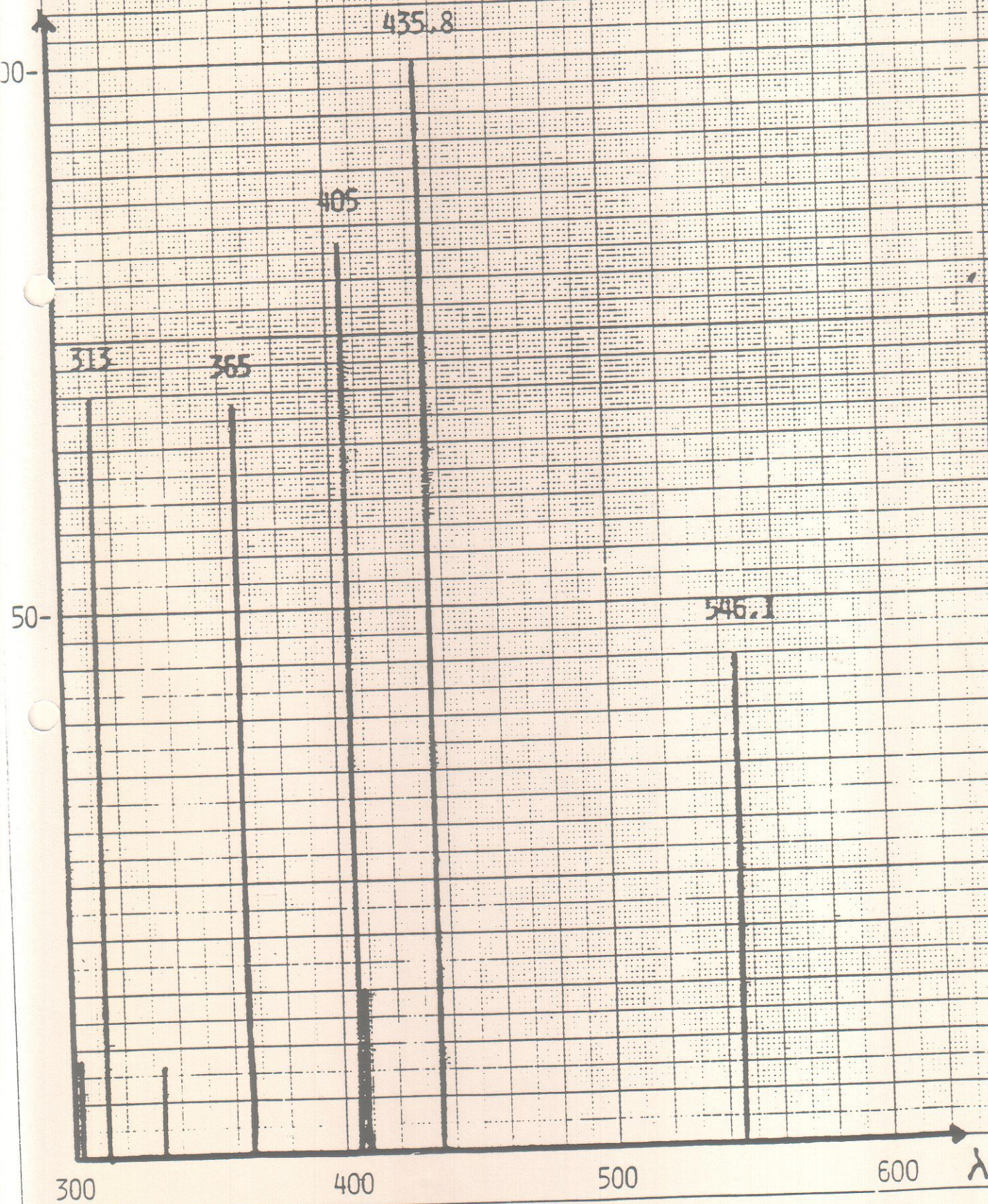
Faible élévation au début car il ne voulait pas, dans un premier temps à tant de devotion.

# INFLUENCE DE LA LUMIERE PARASITE SUR LA LINEARITE DE LA REponse



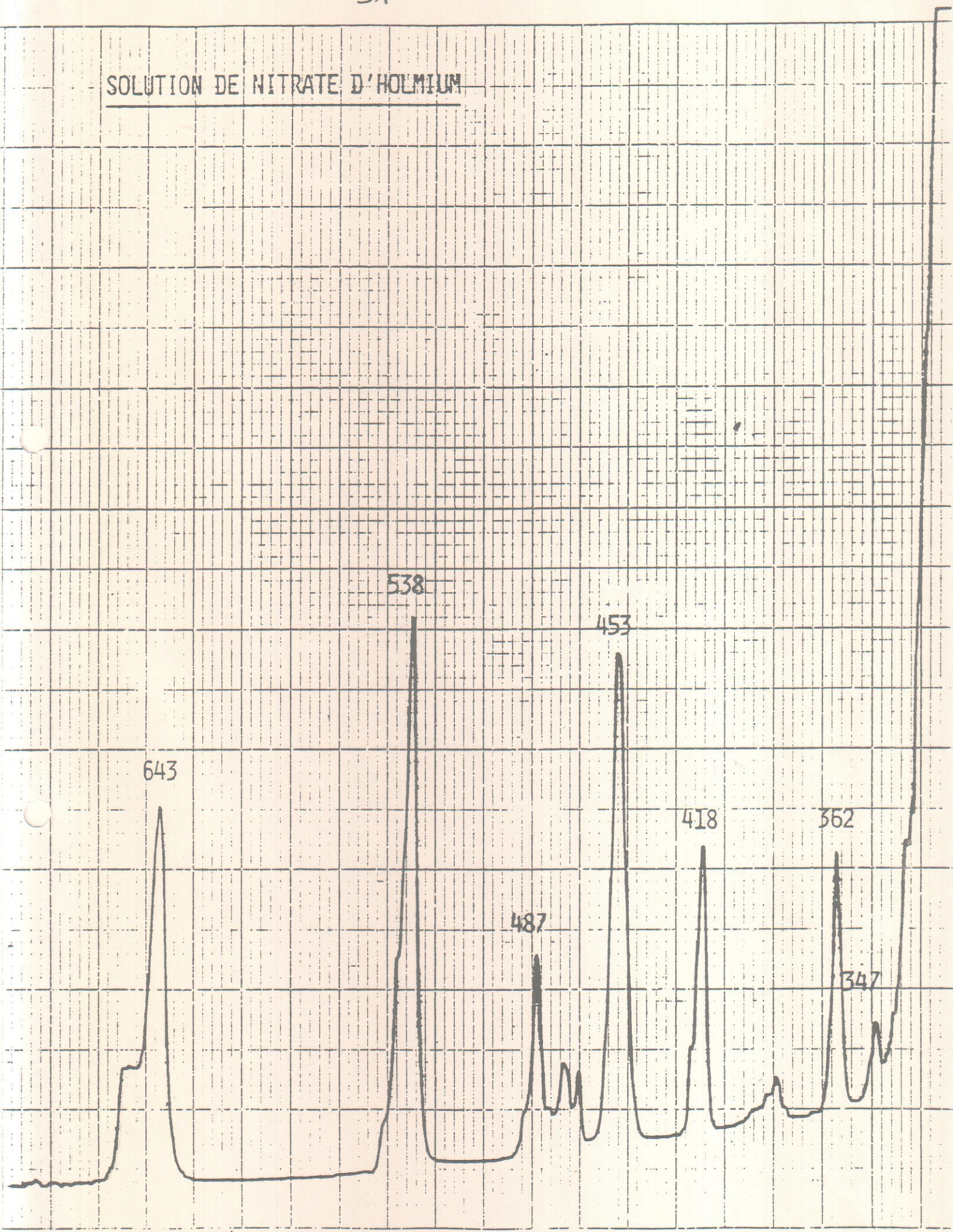
$IcI$

SPECTRE D'EMISSION DU MERCURE





SOLUTION DE NITRATE D'HOLMIUM



643

538

453

487

418

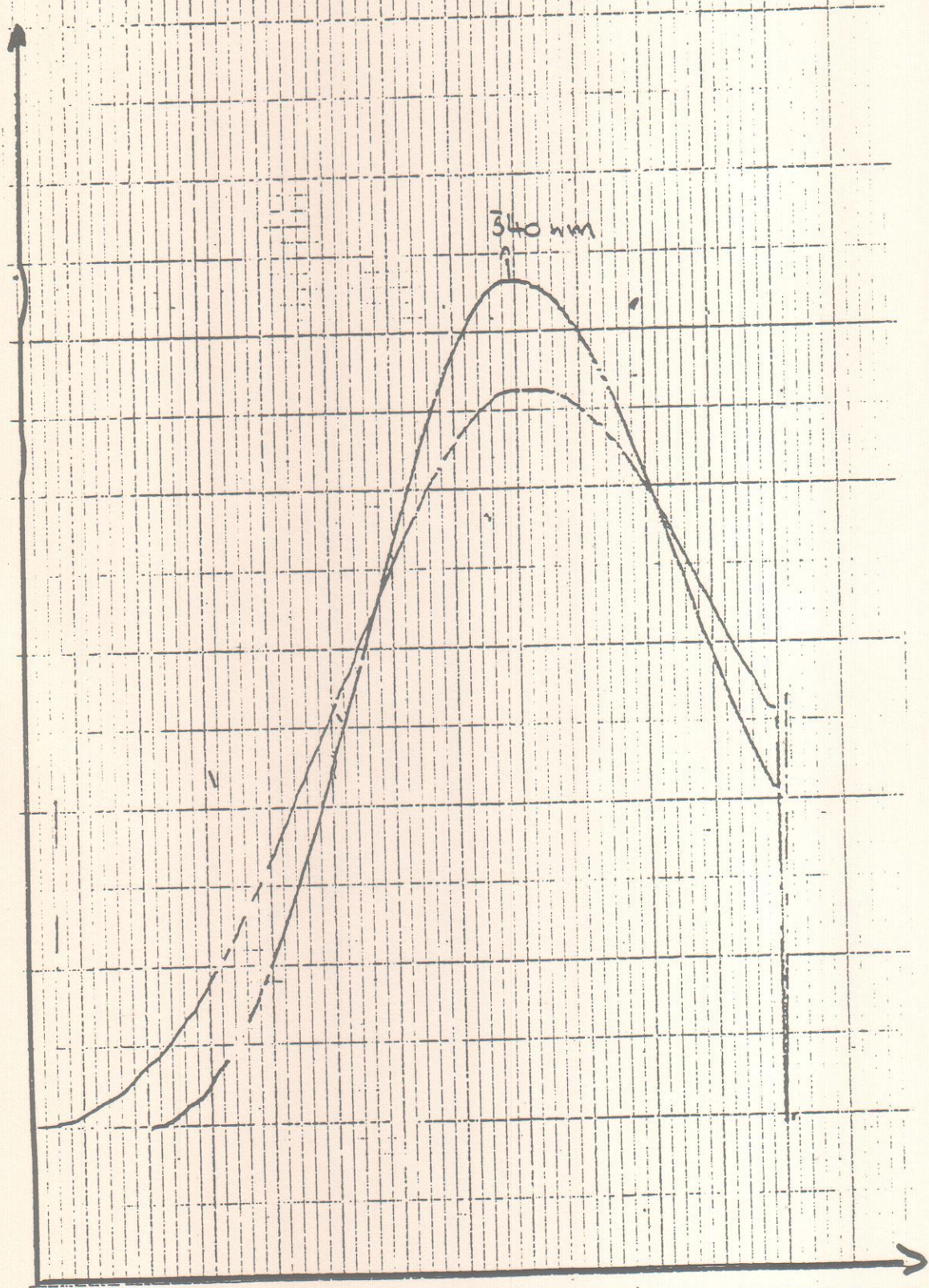
362

347

VAL

SANDES PASSEANTES DIFERENTES

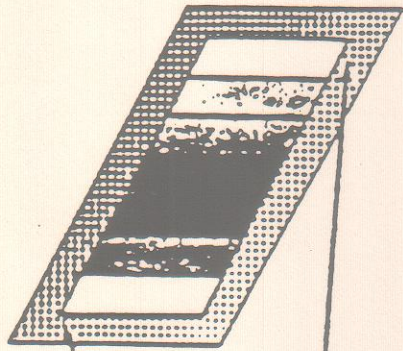
A



RUN/2047

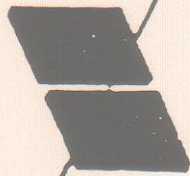
510 nm

190 nm

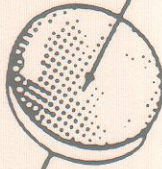


barrette de diodes

réseau



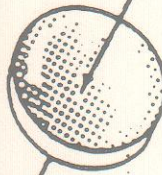
fente



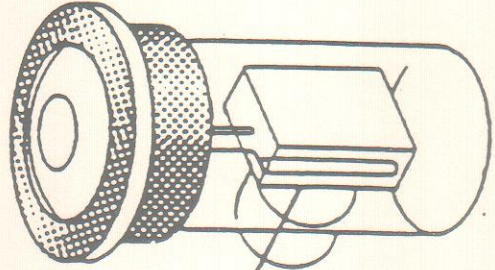
lentille



cuve échantillon



lampe deutérium



volet mobile



## SPECTROMETRIE INFRA-ROUGE

### INTRODUCTION

#### I. ASPECTS THEORIQUES

##### 1. Etude de la vibration

- a) Rappels sur le modèle mécanique
- b) Le modèle moléculaire

##### 2. Etude de la rotation

- a) Modèle mécanique
- b) Modèle moléculaire

##### 3. L'énergie de rotation-vibration

#### II. LES SPECTRES

##### 1. Multiplicité des bandes

- a) Degré de liberté
- b) Modes de vibration (d'allongement - de déformation)
- c) Moment dipolaire

##### 2. Position des bandes

- a) Facteurs internes
  - Ordre de liaison
  - Masse de l'oscillateur
  - Couplage vibrationnel
  - Facteurs divers
- b) Facteurs externes
  - Etat physique
  - Solvant

##### 3. Intensité des bandes

- a) Absolue
- b) Relative

##### 4. Exemple de spectre JR

### III. MESURES

#### 1. Instrumentation

- a) Schéma d'un spectrophotomètre IR
- b) Composantes

#### 2. Echantillonnage

- a) Travail avec un gaz
- b) On a affaire à un liquide
- c) En ce qui concerne les solides

#### 3. Erreurs

#### 4. Contrôles

### IV. APPLICATIONS

#### 1. Analyse fonctionnelle

#### 2. Identification

#### 3. Analyse quantitative

#### 4. Domaines

## SPECTROPHOTOMETRIE INFRA-ROUGE

### INTRODUCTION

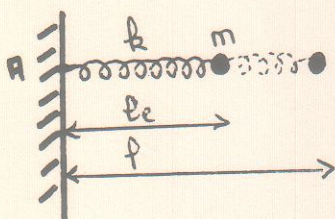
- On a ici affaire à des spectres de bande.
- Le domaine spectral va du proche IR (0,75  $\mu\text{m}$ ) à l'IR lointain (1000  $\mu\text{m}$ ).
- En fait, les études sont surtout faites pour des valeurs allant de 1 à 15  $\mu\text{m}$ .
- Par ailleurs, on ne travaille pas en  $\mu\text{m}$  mais en nombre d'ordre (10.000 à 650  $\text{cm}^{-1}$ ).

Nous nous intéresserons dans ce cours aux énergies de vibration et de rotation.

### I. ASPECTS THEORIQUES

#### 1. Etude de la vibration:

##### a) Rappels sur le modèle mécanique :



A : point fixe  
m : masse m  
le : à l'équilibre

A et m sont reliés par un ressort dont la force de rappel :  $k$   
Si on tire le ressort et qu'on le relâche, il y aura vibration et passage du ressort par son point d'équilibre. Le système est conservatif : l'énergie reste constante.

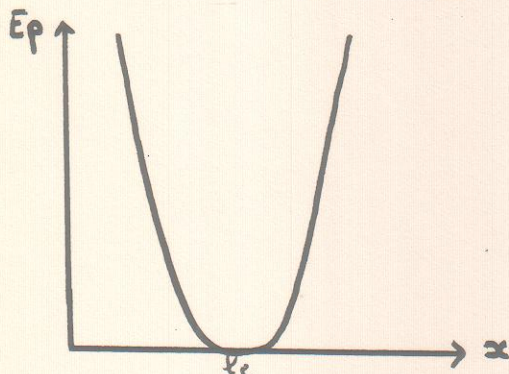
La fréquence de cette vibration est :

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}}$$

$$E_v = E_p + E_c$$

Au niveau de  $l_e$  :  $E_p$  est minimale  
 $E_c$  est maximale

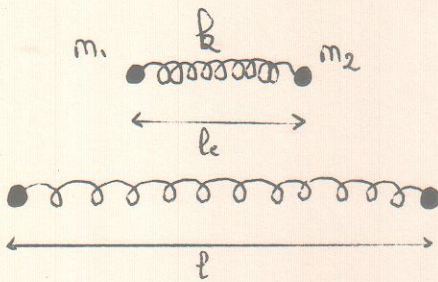
Au niveau de  $l$  :  $E_p$  est maximale  
 $E_c$  est minimale



$$E_p = \frac{1}{2} k (l - l_e)^2$$

$l$  = distance à laquelle se trouve la masse par rapport au point fixe A.  
 $l_e$  = distance de la masse à l'équilibre.

Cas de plusieurs masses (2) liées entre elles par un ressort dont la force de rappel est égale à  $k$ .



Alors la fréquence de la vibration est :

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

avec

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$

La représentation de  $E_p$  en fonction de  $x$  est la même que précédemment.

### b) Le modèle moléculaire

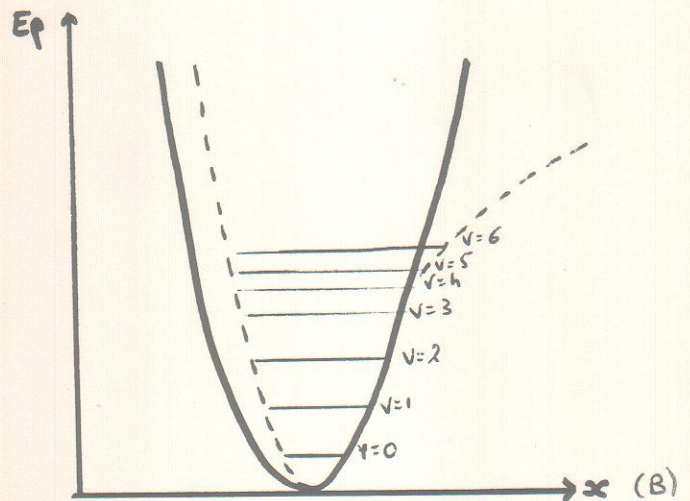
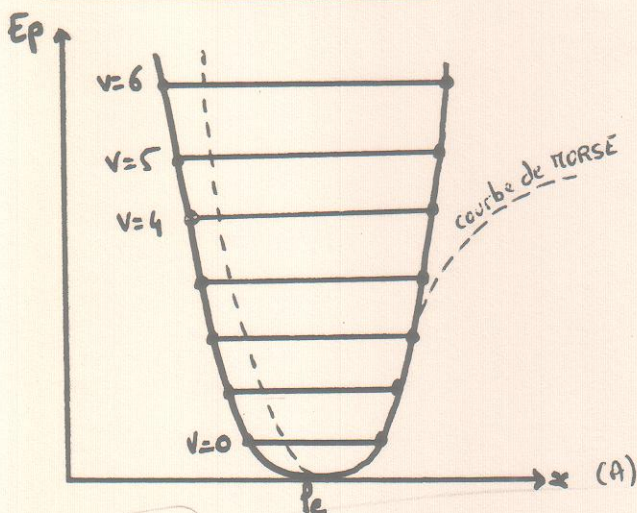


On sait que dans une molécule l'énergie de vibration est quantifiée. Les variations de l'énergie sont donc discontinues et les valeurs permises sont données par :

$$E_v = \left(v + \frac{1}{2}\right) h\nu$$

$$= \left(v + \frac{1}{2}\right) \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

$v$  = nombre quantique de vibration  
 $v = 0, 1, 2, 3, \dots$



Pour  $v = 0$  on a une vibration : même à l'état fondamental.

On a affaire à un oscillateur anharmonique pour deux raisons :

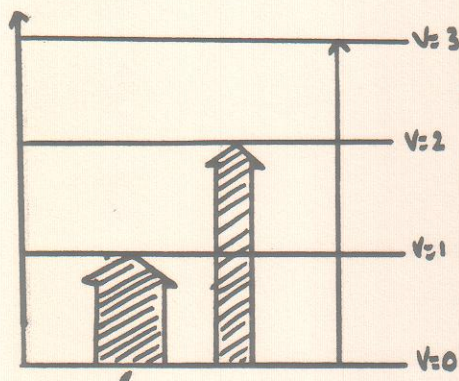
--> Si l'on cherche à éloigner l'atome d'Hydrogène de celui de Cl, on va casser la liaison = on ne peut aller au-delà d'une certaine valeur de l' $E_v$ .

--> On ne peut par ailleurs coller deux à deux les atomes.

Alors la courbe représentant  $E_p$  selon l'éloignement des masses sera une courbe vers la droite : c'est la courbe de MORSE.

Conséquences de cette courbe : les différences entre les niveaux d'énergie ne sont pas identiques comme précédemment. On observe une diminution de la différence entre les niveaux d'énergie. (B)

Dans le cas de la vibration, toutes les transitions sont possibles. Toutefois, elles sont de moins en moins probables au fur et à mesure que la différence entre les niveaux d'énergie augmente .



passage de  $V = 0$  à  $V=1$  correspond à la bande fondamentale ( $1400 \text{ cm}^{-1}$ )  
 $V = 0$  à  $V = 2$  correspond à la 1ère harmonique ( $2800 - \epsilon \text{ cm}^{-1}$ )  
 $V = 0$  à  $V = 3$  correspond à la 2ème harmonique

## 2. Etude de la rotation :

### a) Modèle mécanique :

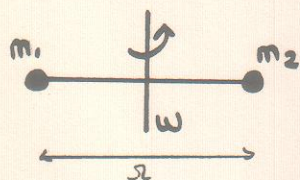
On considère deux masses tournant autour d'un axe perpendiculaire à la tige reliant les deux masses et passant par le centre de gravité du système.

$$E_r = \frac{1}{2} I \omega^2$$

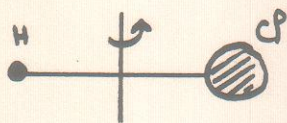
$$I = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} r^2$$

$r$  = distance entre les deux masses

$\omega$  = vitesse angulaire



### b) Modèle moléculaire :



Ici, l'E est quantifiée et seulement certaines vitesses angulaires sont autorisées :

$$\omega = \frac{h}{2\pi I} \sqrt{J(J+1)}$$

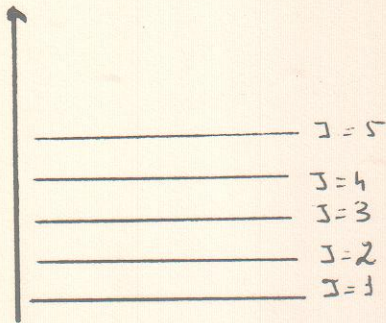
$J$  = nb quantique de rotation  
 $= 1, 2, 3, \dots$

$$E_r = \frac{h^2}{8\pi^2 I} J(J+1)$$

Il faut que  $\Delta J = \pm 1$



Représentation des niveaux d'énergie :

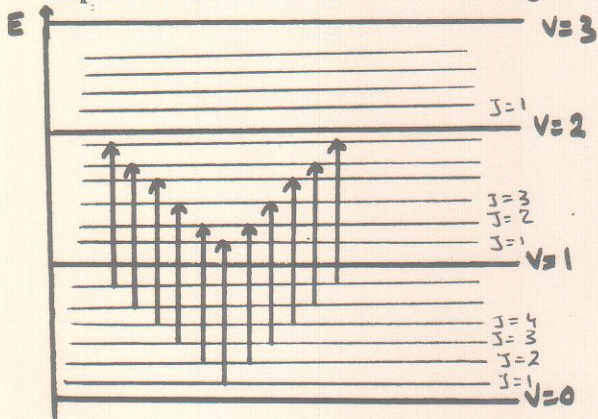


3. L'énergie de Rotation / Vibration :

$$E_{rv} = E_r + E_v$$

$$E_{rv} = \left(v + \frac{1}{2}\right) \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} + \frac{h^2}{8\pi^2 I} J(J+1)$$

Représentation des niveaux d'énergie dans la molécule :



En fait, la représentation de la bande fondamentale, illustrant le passage de  $V_0$  à  $V_1$  sera représentée par :

Spectre du Hbr à l'état gazeux *à regarder.*

## II. LES SPECTRES

### 1. Multiplicité des bandes

#### a) Degrés de liberté :

Le nombre de degrés de liberté est le nombre de paramètres qui permet de définir un système dans l'espace. Pour une molécule, ce nombre de paramètres nous permet de situer les atomes dans l'espace.

- Si on considère un atome seul : on le définira dans trois directions de l'espace et on dira qu'il a trois degrés de liberté.

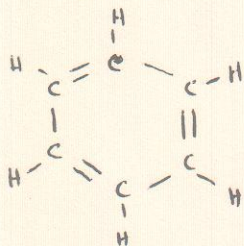
- Si on considère  $N$  atomes, on dira qu'ils ont  $3N$  degrés de liberté.

- Trois degrés de liberté sont nécessaires pour caractériser la localisation de la molécule entière.

- Trois degrés de liberté sont nécessaires pour noter la rotation de cette même molécule.

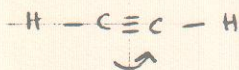
( $3N - 6$ ) degrés de liberté permettent de définir la vibration. Il y a théoriquement ( $3N - 6$ ) modes de vibration, donc ( $3N - 6$ ) bandes.

Considérons  $C_6H_6$  : 12 atomes  
36 degrés de liberté  
( $36 - 6$ ) = 30 bandes



Mais toutes les liaisons C-H sont identiques : elles donnent une même bande.

Lorsqu'on a affaire à des molécules linéaires, on aura ( $3N - 5$ ) bandes : car la rotation est définie par 2 degrés de rotation et non pas par 3.



### b) Modes de vibration

Il existe deux grands modes possibles de vibration :

--> d'allongement ( $\nu$ )

--> de déformation ( $\delta$ )

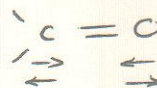
⇒ Vibrations d'allongement :

Les atomes oscillent entre eux avec variation de la longueur de liaison et sans modification de l'angle de valence.

Cette vibration est représentée par la lettre  $\nu$

On peut considérer des vibrations isolées :

Les atomes d'O et C vont tantôt s'éloigner et tantôt se rapprocher.

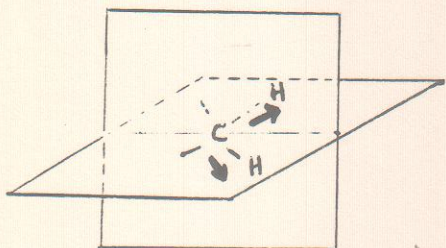


On peut avoir des vibrations couplées :

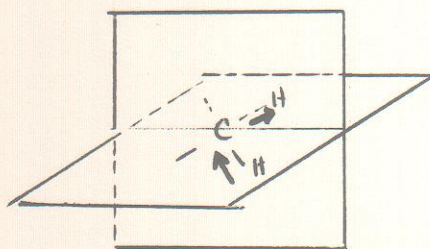
- symétriques  $\nu_s$

- asymétriques  $\nu_{as}$

Exemple : atome de carbone lié à deux atomes d'hydrogène :



Allongement symétrique ( $\nu_s$ )



Allongement asymétrique ( $\nu_{as}$ )

Ces vibrations d'allongement sont souvent les plus remarquées sur un spectre car elles sont les plus intenses.

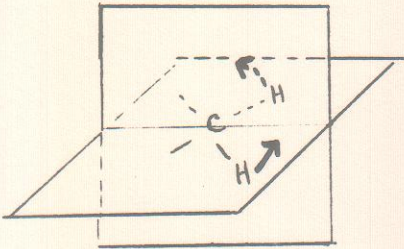
### ⇒ Vibrations de déformation :

Il y a modification de l'angle de valence. Il peut y avoir des vibrations de déformation :

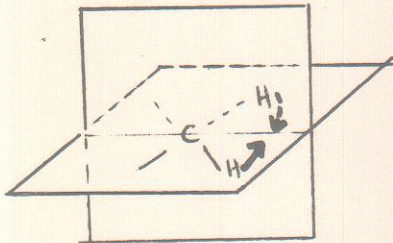
- dans le plan,
- hors du plan.

Elles pourront être symétriques ou anti symétriques.

#### Déformation dans le plan :

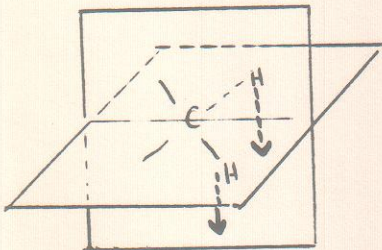


Déformation dans le plan symétrique ( $\rho$ )  
(Rotation plane - rocking) ( $\delta_s$ )



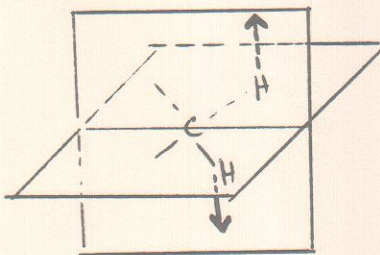
Déformation dans le plan antisymétrique ( $\sigma$ )  
(Cisaillement - scissoring) ( $\delta_{as}$ )

#### Déformations hors du plan :



Les 2 Hydrogènes passent simultanément, au dessus et au dessous du plan.

Déformation hors du plan symétrique ( $\omega$ )  
(Balancement - waggeng) ( $\delta_s$ )



Déformation hors du plan antisymétrique ( $\epsilon$ )  
(Torsion - twisting) ( $\delta_{as}$ )

### c) Moment dipolaire

Il est nécessaire à la vibration.

→ Il peut être permanent (molécules à caractère ionique) : il y a spontanément une vibration en lumière IR.

→ Il peut être non permanent : alors lorsque la vibration surviendra, il sera créé.

$O = X = O$  pas de vibration ( $V_s$ ) en IR

$O = C = O$

Toutes les molécules atomiques homonudaires ne vibreront pas ( $H_2$ )

## 2. Position des bandes

### α) Facteurs internes

On trouve, d'une manière générale, par ordre d'énergie décroissante, donc par nombre d'onde décroissant :

- > les vibrations d'allongement,
- > les vibrations de déformation dans le plan,
- > les vibrations de déformation hors du plan.

Lorsqu'on a des modes de vibrations symétriques et antisymétriques, le mode antisymétrique absorbe à des nombres d'onde supérieurs.

	$\nu_{as}$	>	$\nu_s$	>	$\delta_{as}$	>	$\delta_s$	>	$\delta_{as}$	>	$\delta_s$
/ H C - H   H	2962		2872		1450		1365				

### α) Ordre de liaison

Plus il sera grand, plus la force de rappel sera grande et plus la fréquence et le nombre d'onde seront grands.

- . C=O absorbe à 2150  $\text{cm}^{-1}$
- . C=O absorbe à 1715  $\text{cm}^{-1}$
- . C-O absorbe à 1050 - 1100 - 1150 - 1200  
alcool I II III phénol

$$E_v = \left(v + \frac{1}{2}\right) \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

### β) Masse de l'oscillateur

$\frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$   $m_1$  et  $m_2$  = masses séparées par une liaison

Plus la masse des atomes est grande, plus la fréquence de vibration est faible, donc plus le nombre d'onde est faible.

- . HBr absorbe à 2564  $\text{cm}^{-1}$
- .  $\sqrt{\text{C}}$  absorbe à 2886  $\text{cm}^{-1}$  (Vibration d'allongement)
- . HF absorbe à 2968  $\text{cm}^{-1}$

### γ) Couplage vibrationnel

Lorsque des vibrations de fréquence très voisine intéressent des groupements rapprochés d'une même molécule, il peut se produire un couplage entre ces vibrations, de sorte que l'on obtient une seule bande au lieu de plusieurs : ici les différents groupements participent.

- . C=C absorbe à 1620  $\text{cm}^{-1}$ 

$\left\{ \begin{array}{l} 60\% \text{ C=C } (\nu) \\ 40\% \text{ C-H } (\delta) \end{array} \right.$

Cas particuliers : la bande de fermi : résonance de FERMI : il s'agit d'une interaction entre une bande fondamentale (à 2800  $\text{cm}^{-1}$ ) qui correspond à la vibration d'allongement d'un C-H dans un aldéhyde et une harmonique (à 2800  $\text{cm}^{-1}$ ) qui correspond à la vibration de déformation d'un C-H du même aldéhyde.

La bande de fermi se rencontre surtout sous forme d'un pic dédoublé :



### δ) Facteurs divers

- Effet inducteur d'un atome qui pourra modifier la longueur d'une liaison.
- Présence de liaisons hydrogènes.

### b) Facteurs externes

#### α) Etat physique

- Cas d'un gaz : on a des bandes très fines où on voit les variations dans les niveaux de rotation.
- Pour les liquides et les solides : on perd ces structures fines.
- Le fait de passer de l'état liquide à l'état solide entraîne une modification du nombre d'ordre où absorbe le corps (diminution de 40 à 50  $\text{cm}^{-1}$ ).

#### β) Solvant

En fonction du solvant utilisé, de petites variations vont se produire sur le nombre d'onde.

### 3. Intensité des bandes

#### a) Absolute

- Les bandes peuvent avoir des intensités très variables. Les bandes les plus intenses sont en général des bandes de vibrations d'allongement des liaisons O-H; C-H; N-H, puis viennent les bandes des vibrations de déformation.
- L'intensité dépend du moment dipolaire : plus ce dernier est important, plus I augmente.
- L'intensité dépend de la symétrie de la molécule + I diminue plus la molécule est symétrique.
- La bande sera d'autant plus intense qu'un motif se répètera dans la molécule.

#### b) Relative

- La loi de Beer Lambert s'applique :  $A = \epsilon lc$
- l = trajet optique
- c = concentration de la molécule.

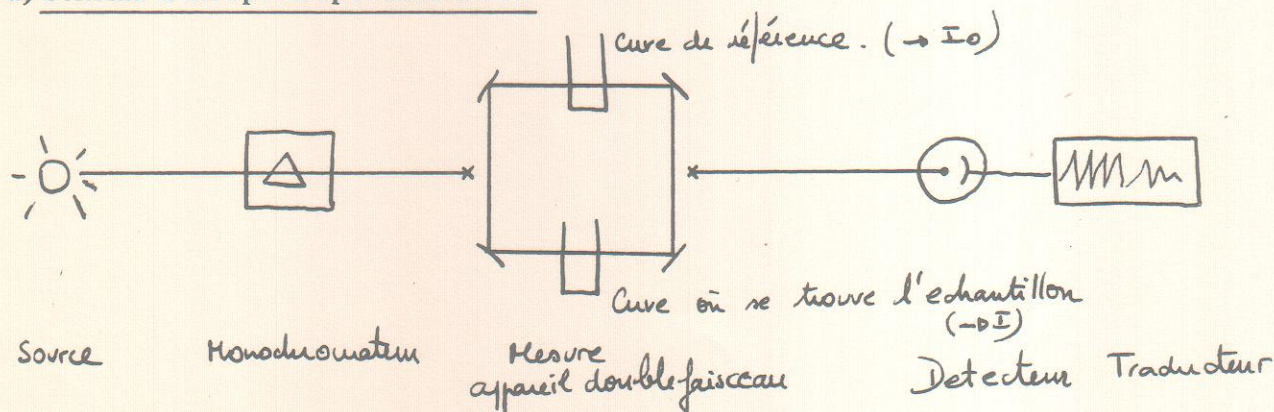
### 4. Exemple de spectre IR

NB : Les molécules d'eau vibrent très intensément --> impuretés sur le spectre. Lorsqu'on manipule, il faut donc travailler en milieu anhydre.

## III. MESURES

### 1. Instrumentation

#### a) Schéma d'un spectrophotomètre IR



## b) Composants

### → Sources :

- On obtient un rayonnement IR en portant des filaments divers à incandescence. Ces matériaux sont des corps réfractaires (sinon ils brûleraient à l'air) : ils sont chauffés par effet joule (1500 → 2000° C). On utilise surtout :

- . l'oxyde de cerium → on parle de filament de NERNSI,
- . le carbure de silicium → on parle de filament de GLOBALAR.

### → Monochromateur :

C'est en général un prisme. Le verre absorbe le rayonnement IR; seuls les composés ioniques sont transparents aux rayonnements IR :  $\text{KCl} - \text{NaCl} - \text{KBr} - \text{CoI}$  (utilisation de sels d'alcalins).

Ces composés sont très solubles dans l'eau : on les protège donc de l'humidité (pour éviter la détérioration).

### → Cellule de mesure :

Il se pose le même problème de transparence aux IR. On utilise des cuves dont les fenêtres sont en :  $\text{NaCl} - \text{KBr} - \text{CsI} - \text{KCl}$ . Le reste est en métal ou autre composé.

**NB :** En TP ne lavez pas les cuves à l'eau... sinon elles fondront !  
Ce serait dommage... très dommage !

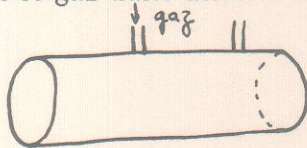
### → Détecteurs :

On utilise un bolomètre. Il comporte une résistance électrique; résistance qui varie avec la température. Le faisceau arrive sur la résistance avec une intensité plus ou moins importante, on mesure les variations.

## 2. Echantillonnage

### a) Travail avec un gaz

On incorpore le gaz dans une cellule présentant deux fenêtres en NaCl.



### b) On a affaire à un liquide

- On fait un film de ce composé liquide : on le dépose sur la plaque transparente au rayonnement IR (NaCl).

- On peut aussi travailler en solution : mais on obtient des bandes correspondant au solvant s'il s'agit d'eau ou d'alcool, c'est pourquoi on utilisera  $\text{CCl}_4$  qui est transparent de 4000 à 1300  $\text{cm}^{-1}$  (substance symétrique) ou  $\text{CS}_2$  qui est transparent de 1350 à 400  $\text{cm}^{-1}$ .

### c) En ce qui concerne les solides

- On pourra utiliser des suspensions (huile de paraffine = NUJOL).

- On pourra réaliser une pastille dans KBr (mélange du composé + KBr → poudre très fine → pastille du mélange qui est comme une cuve à faces parallèles et placée dans le faisceau IR).

### 3. Erreurs

- Les absorptions en IR sont relativement faibles c'est pourquoi on utilise des concentrations importantes : ce ne sont pas de bonnes conditions pour appliquer la loi de Beer Lambert (perte de linéarité).

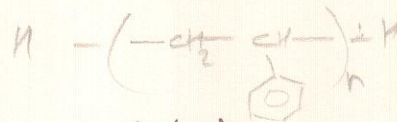
- Si on fait des pastilles, on est plus dans un milieu isotope. Là encore, ce ne sont pas de bonnes conditions pour la loi de Beer Lambert.

### 4. Contrôles

On vérifie surtout 2 paramètres :

- le calage du monochromateur

la pharmacopée recommande d'utiliser des fibres de polystyrène :  
↳ des bandes d'absorption caractéristiques, le nombre d'onde doit correspondre à l'élément donné.



- On vérifie le pouvoir de résolution : utilisation d'un film de polystyrène avec des bandes très proches. On doit obtenir deux pics correctement séparés.

## IV. APPLICATIONS

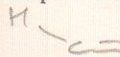
### 1. Analyse fonctionnelle

- On recherche la position, l'intensité et la largeur des bandes : on peut alors trouver à quel groupement fonctionnel appartient cette bande.

- On décompose le spectre en un certain nombre de zones :

--> **Zone A** :  $3200 \text{ cm}^{-1}$  : les bandes sont intenses et larges et correspondent aux vibrations d'allongement des liaisons O-H et N-H.

--> **Zone B** :  $3100 \text{ à } 3000 \text{ cm}^{-1}$  : les bandes sont intenses et fines et correspondent aux vibrations d'allongement de la liaison C-H lorsque cette dernière est proche d'une double liaison.



--> **Zone C** :  $3000 \text{ à } 2700 \text{ cm}^{-1}$  : les bandes correspondent aux vibrations d'allongement des liaisons C-H ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ).

--> **Zone D** :  $1800 \text{ à } 1600 \text{ cm}^{-1}$  : les bandes correspondent aux vibrations des liaisons C=O (bandes intenses et caractéristiques).

--> **Zone E** :  $1600 \text{ à } 1400 \text{ cm}^{-1}$  : correspond à  $\nu$  des liaisons C=C - leur intensité est faible.

--> **Zone F** :  $1200 \text{ à } 1000 \text{ cm}^{-1}$  : correspond à  $\nu$  C-O et C-N. Ce sont des bandes intenses.

Il faudra des méthodes complémentaires pour connaître parfaitement la molécule. On a ici de bonnes informations quand aux groupements fonctionnels.

### 2. Identification

- Soit on dispose de la même substance que celle à étudier : on étudie le spectre de l'échantillon de référence et celui nous intéressant.

- On compare un spectre de référence à celui du composé que l'on veut identifier.

--> Travail avec le même solvant + contrôle de l'appareil.

### 3. Analyse quantitative (peu)

#### 4. Domaines

- Du médicament : caractérisation par son spectre IR.
- De la biologie : lorsqu'on veut utiliser la teneur en CO dans le sang (mesure par IR); pour l'étude des calculs rénaux, biliaires (pour connaître leur composition : alors on adaptera une thérapeutique).

Commentaire du schéma n° ①

Zone A : Bandes des  $\begin{matrix} \text{O} - \text{H} \\ \text{N} - \text{H} \end{matrix}$  Si pic vers  $1600 \text{ cm}^{-1}$  donc ici on en a pas.

Zone C : C - H : donc dans la molécule on a des - CH<sub>2</sub> - CH<sub>3</sub>

Zone B : C - H associés à une double liaison : on a ici un composé insaturé car dans la zone B on n'a pas de bandes.

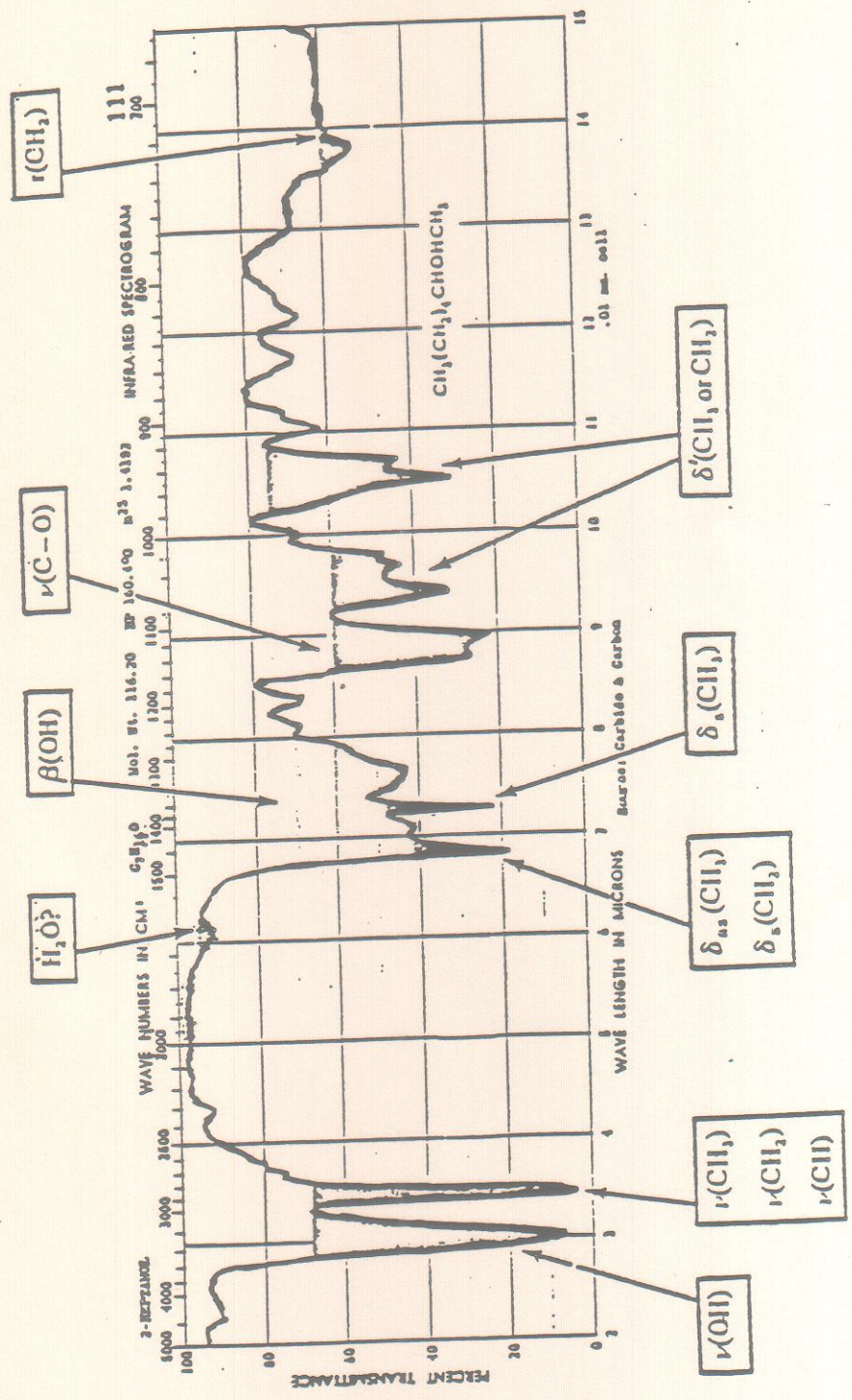
Zone D : il n'y a pas de  $\text{C}=\text{O}$  car sinon on aurait une bande intense.

Zone E : on a une bande qui pourrait correspondre à C = C, mais elle est due à autre chose (vibration dans le plan des - CH<sub>2</sub> - CH<sub>3</sub>) car on aurait eu une bande dans la zone B.

Zone F : C - O : le O - H de la zone A est lié à un carbone isolé dans cette zone.

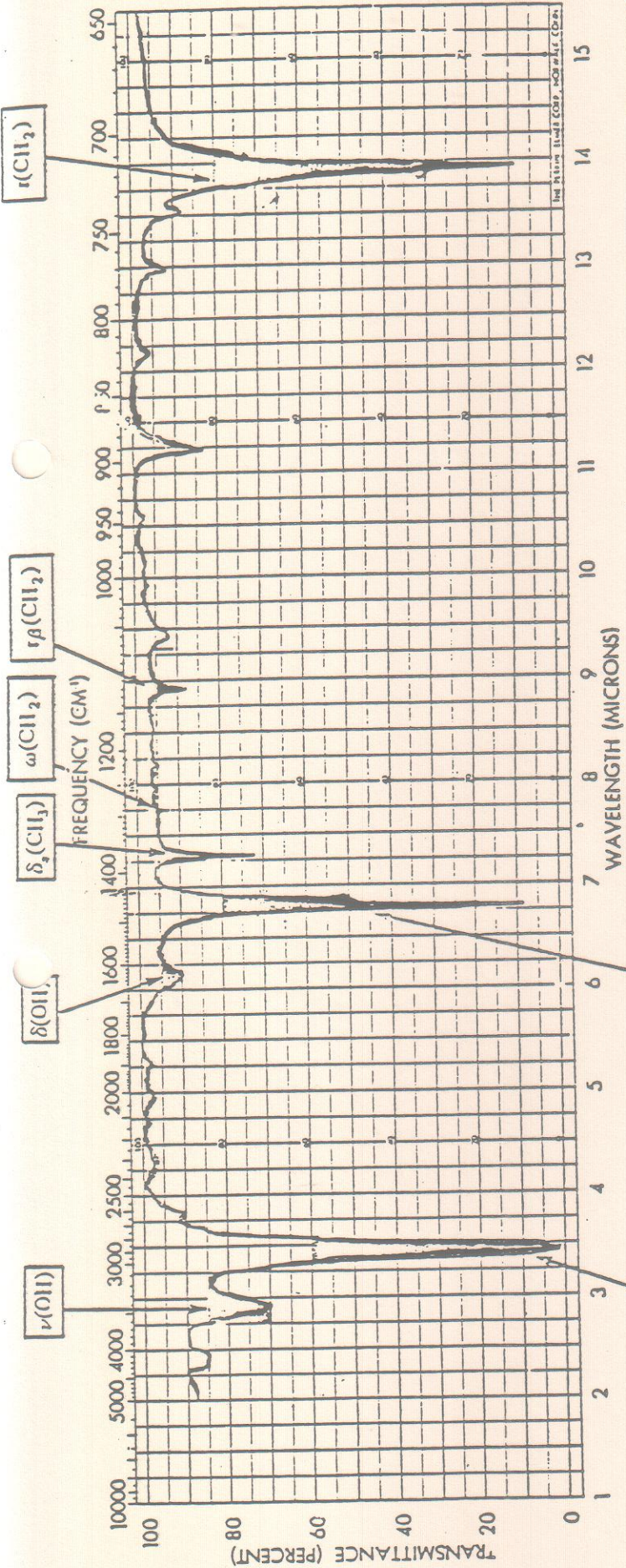
Nous sommes en présence d'un alcool avec des liaisons CH<sub>2</sub> - CH<sub>3</sub>.  
Il est saturé.





Zone A = bande des OH  
 Zone B = rien  
 Zone C = bandes des CH<sub>3</sub> et CH<sub>2</sub>.  
 Zone D et E = rien car pas de C=O et C=C  
 Zone F = bande de C-O-

ALKANES



COMPOUND n-Eicosane C <sub>20</sub> H <sub>42</sub>
SOURCE AND PURITY API Research Project 42 PSU No. 540 Pennsylvania State University University Park, Pennsylvania
STATE: Solid in KBr pelle-
THICKNESS: 1.0 mm
CELL LENGTH:
CONCENTRATION: 0.62 percent by weight in KBr
INSTRUMENT: Perkin-Elmer 21
LABORATORY: Fuels Division, Canadian Department of Mines and Technical Surveys Ottawa, Ontario, Canada

Serial No. 2335

CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>-CH<sub>3</sub>

## SPECTROFLUORIMETRIE

### I. ASPECTS THEORIQUES

1. Transitions électroniques
2. L'énergie dans les molécules
  - a) Excitation de la molécule
  - b) Dissipation

### II. LES SPECTRES

1. Position des bandes
  - a) Spectre d'excitation
  - b) Spectre d'émission
2. Intensité de fluorescence
  - a) Absolue
    - $\alpha$ ) Conditions
    - $\beta$ ) Molécules fluorescentes
  - b) Relative
  - c) Facteurs modifiant l'intensité

### III. LES MESURES

1. Instrumentation
  - a) Schéma du principe
  - b) Composants
2. Echantillonnage
3. Conditions de mesure et erreurs
4. Contrôles
  - a) Contrôle d'exactitude des longueurs d'onde
  - b) Contrôle de la largeur de la bande passante
  - c) Contrôle de la sensibilité de l'appareil

### IV. APPLICATIONS

1. Analyse qualitative
2. Analyse quantitative
  - a) Méthodes directes
  - b) Méthodes indirectes

## SPECTROFLUORIMETRIE

C'est une spectrométrie d'émission moléculaire où c'est l'énergie de transition électronique qui est concernée. C'est une méthode basée sur la luminescence. Pour exciter les molécules on peut avoir recours :

- > à la chimie ==> chimiluminescence
- > à la biologie ==> bioluminescence
- > à des photons ==> photoluminescence (Phosphorescence - Fluorescence)

### I. ASPECTS THEORIQUES :

#### 1. Transitions électroniques

- Entre les orbitales liantes et antiliantes  $\pi$  et  $\pi^*$
  - Entre les orbitales  $n$  et  $\pi^*$
  - Entre les orbitales  $n$  et  $\sigma^*$
- } Absorption par la molécule

A l'émission, la molécule va revenir à des orbitales liantes.

- passage de  $\pi^* \rightarrow \pi$   
 $\pi^* \rightarrow n$
- la transition  $\sigma^* \rightarrow n$  n'est pas possible.

#### 2. L'énergie dans les molécules

(Voir schéma)

a) Excitation de la molécule :  $E_0 \rightarrow E^*$

La molécule passe à différents niveaux d'énergie de vibration et de rotation.

b) Dissipation :  $E^* \rightarrow E_0$  et émission.

Il correspond au passage de l'état excité à l'état fondamental. Elle se fait en deux temps :

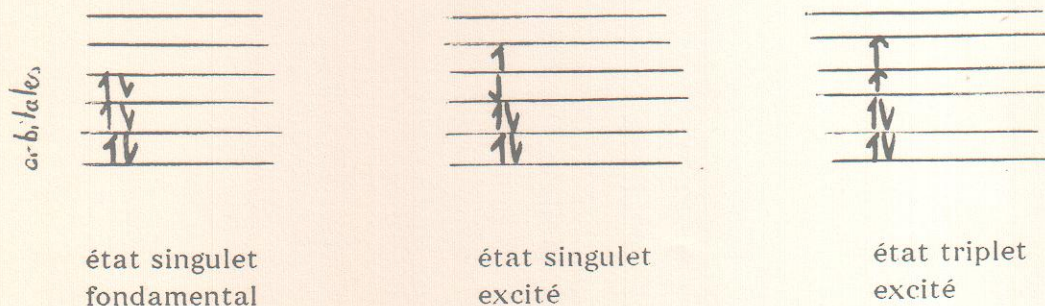
- Passage au niveau de vibration  $V = 0$  de l'état excité.

. Par RV = relaxation vibrationnelle : il y a choc entre les molécules et transfert de l'énergie de vibration aux molécules environnantes. Il y a perte d'énergie sans émission.

. Par CI = conversion interne : le transfert d'énergie aux molécules environnantes se fait pas passage à un niveau de vibration inférieur de l'état excité supérieur ( $E_2$ ) à un niveau de vibration supérieur de l'état de vibration inférieur ( $E_1$ ).

Puis par relaxation vibrationnelle, la molécule passe à  $E_0$ .

. Par CIC = conversion interne croisée : on passe d'un état singulet à un état triplet.



**NB** : Le niveau d'énergie d'un état triplet est toujours inférieur à celui d'un état singulet.

- Passage.

. En émettant un rayonnement : à l'émission on obtient un spectre de bandes.

Si l'on se trouve à l'état triplet : lorsque la molécule revient à l'état fondamental, on a un phénomène de phosphorescence.

La différence entre les niveaux d'énergie fondamentaux est plus importante pour la fluorescence que pour la phosphorescence. Les  $\lambda$  sont plus importantes pour le phénomène de phosphorescence.

La durée de vie est plus importante en phosphorescence ( $10^{-4}$ s) qu'en fluorescence ( $10^{-8}$ s).

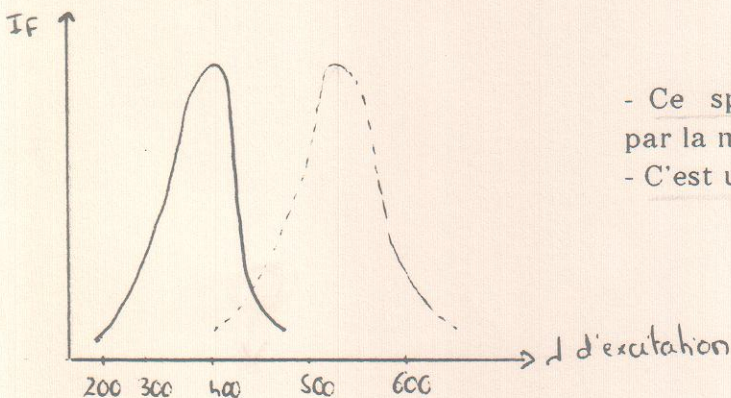
## II. LES SPECTRES :

### 1. Position des bandes

#### a) Spectre d'excitation

Il est obtenu lorsque l'on mesure l'intensité de la lumière de fluorescence en se plaçant à une longueur d'onde fixe (généralement elle correspond au maximum d'émission).

On observe la lumière émise à  $\lambda$  fixe et on fait varier la lumière d'excitation, c'est-à-dire la longueur d'onde de cette lumière.



- Ce spectre est le reflet de la lumière absorbée par la molécule.

- C'est un reflet indirect.

#### b) Spectre d'émission

L'excitation de la molécule se fait à longueur d'onde fixe (habituellement au maximum du spectre d'excitation). On observe la longueur d'onde de la lumière émise. On obtient le spectre de fluorescence.

Le spectre d'émission à des longueurs d'onde plus grandes que celui du spectre d'excitation ==> loi de Stokes.

Il y a une longueur d'onde pour laquelle les deux spectres se recoupent : ceci correspond : quantité d'énergie absorbée = quantité d'énergie émise.

Il y a un chevauchement des spectres ==> loi anti-stokes. Au moment où la molécule est excitée, certaines molécules peuvent se retrouver à des niveaux de vibration différents de  $V=0$ . Elles reviendront à  $V=0$  pour aller jusqu'en bas. La différence d'énergie émise sera plus importante qu'à l'émission : ceci explique le chevauchement.

**NB** : Très souvent on considère que le spectre d'émission est le reflet (non fidèle !) du spectre d'excitation dans un miroir.

## 2. Intensité de fluorescence

### a) Absolue

#### α) Conditions

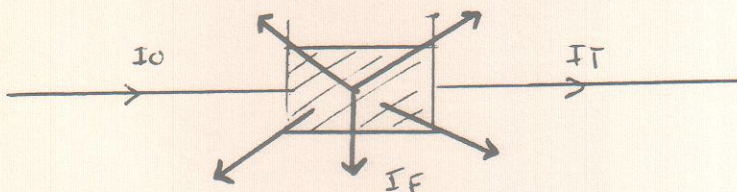
- Les molécules présentant les transitions  $\pi \rightarrow \pi^*$  sont susceptibles de fluorescence. La transition  $n \rightarrow \pi^*$  donne plus volontiers lieu à un phénomène de phosphorescence.
- La durée de vie de l'état singulet doit être brève ( $10^{-8}$ s), sinon il y a des phénomènes de conversion interne.
- Etats singulet et triplet doivent être bien séparés.

#### β) Molécules fluorescentes

- Composés aliphatiques.
- Composés aromatiques: sont d'autant plus fluorescents qu'il y a de noyaux aromatiques. Les substituants sont susceptibles de modifier la fluorescence. NH<sub>2</sub> et OH augmentent la fluorescence. Les méthyl ont peu d'effet. Les halogènes baissent la fluorescence. NO<sub>2</sub> supprime la fluorescence. Les composés présentant le groupement C=O ne sont pas aromatiques.
- Les composés hétérocycliques (sauf hétérocycles à 5 atomes possédant O et H). - furane. S'ils sont accolés à un cycle benzénique, ils ont une fluorescence importante.

#### b) Relative

On travaille en solution : cuve contenant un composé fluorescent. Sur cette cuve on dirige un faisceau monochromatique d'intensité  $I_0$ . Une partie de la lumière est transmise. Certaines molécules sont passées d'un état fondamental à un état excité : il y a fluorescence dans toutes les directions. On mesure généralement cette dernière pour un angle de  $90^\circ$ .



$$I_F = f(I_A)$$

$$I_F = \theta I_A$$

$\theta$  = rendement quantique.

$\theta$  = rapport entre le nombre de molécules émettant une radiation de fluorescence et le nombre de molécules excitées.

$\theta$  environ:1 pour une molécule très fluorescente.

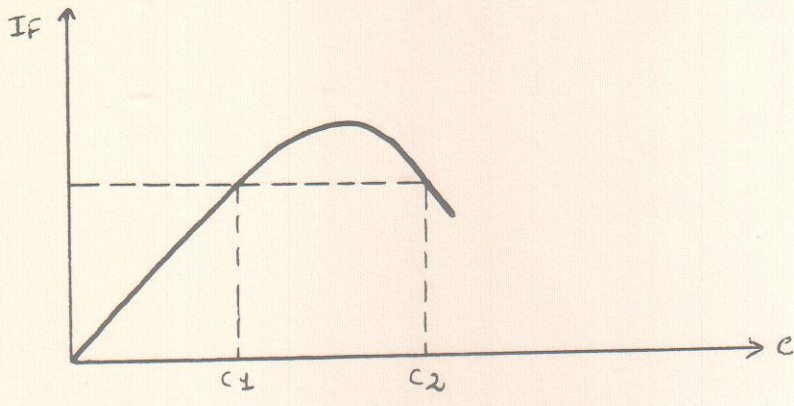
$\theta$  environ:0 pour une molécule non fluorescente.

$$I_R = I_0 - I_T$$

$$= I_0 - I_0 e^{-\epsilon l c} = I_0 (1 - e^{-\epsilon l c})$$

$$I_F = I_0 (1 - e^{-\epsilon l c}) \theta$$

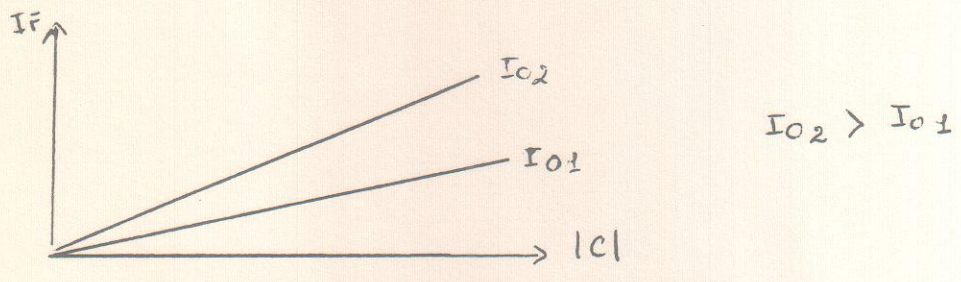
Représentation graphique de  $I_F = f(c)$



Lorsque l'on est à faible concentration  $I_F \approx I_0 \epsilon l c \theta$  (proportionnalité)

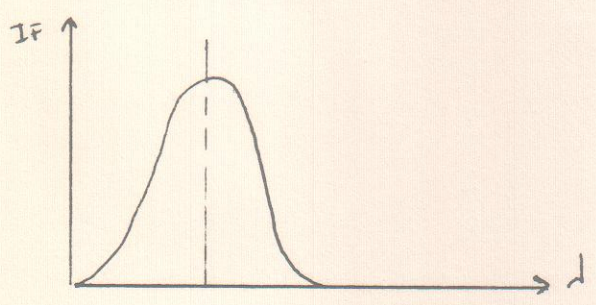
c) Facteurs modifiant l'intensité :

L'intensité de la lumière incidente : plus elle est grande, plus  $I_F$  est grande.



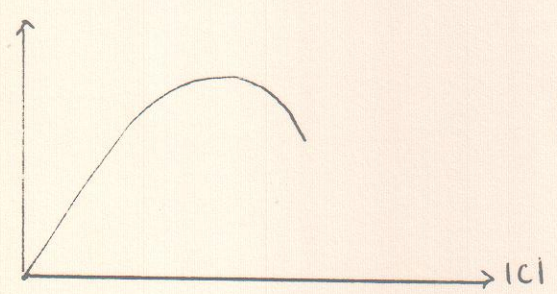
On pourra augmenter la pente de la courbe d'étalonnage, donc la sensibilité de la méthode.

- La de la lumière d'excitation



- Le parcours optique l : lorsqu'il augmente, la sensibilité de la méthode est meilleure.

- La concentration du composé à doser :



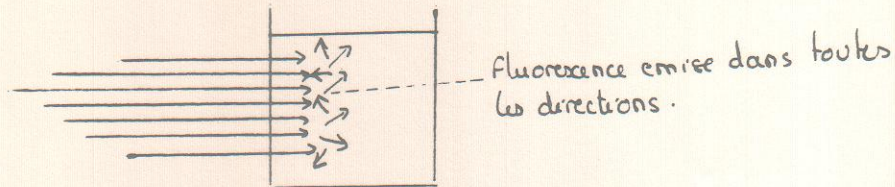
NB : la relation s'applique pour des concentrations faibles

Dans la partie descendante de la courbe.

--> Phénomène d'auto-inhibition : lorsqu'on augmente  $/C/$  dans le milieu, on augmente les chocs entre molécules et on a une dissipation d'énergie sous forme de chaleur au lieu de l'avoir sous forme de rayonnement.

--> Effet de filtre interne : si on considère la cuve où on a placé les éléments fluorescents, le rayonnement incident au lieu de traverser complètement la cuve est totalement absorbé par les premiers éléments. Il n'y a aucun rayonnement transmis. Par ailleurs, la fluorescence émise par ces premiers éléments est réabsorbée par les éléments qui suivent.

On parle de self absorption.



- Le pH de la solution où se trouve le composé : il intervient seulement si le composé comporte des éléments acido-basiques. Alors si on modifie le pH, le composé changera de "conformation".

- Les substances environnantes : généralement elles diminuent la fluorescence. On parle alors de "quenching" de fluorescence. Toutefois, elles peuvent aussi l'augmenter.

La diminution de fluorescence s'explique par un transfert d'énergie de la molécule fluorescente à une autre substance. Ce phénomène n'est pas prévisible. On connaît l'activité inhibitrice des chlorures sur la quinine, des iodures, des bromures, de l'O<sub>2</sub> (dissout dans la solution).

Exemple : pour l'anthracine :

Sans O<sub>2</sub> --> 100 % de fluorescence

Si saturation par air --> 86 %

Si saturation par O<sub>2</sub> --> 50 %.

Pour avoir un dosage juste il faut tenir compte de ce phénomène d'inhibition.

- Le solvant : la fluorescence d'un composé varie d'un solvant à l'autre.

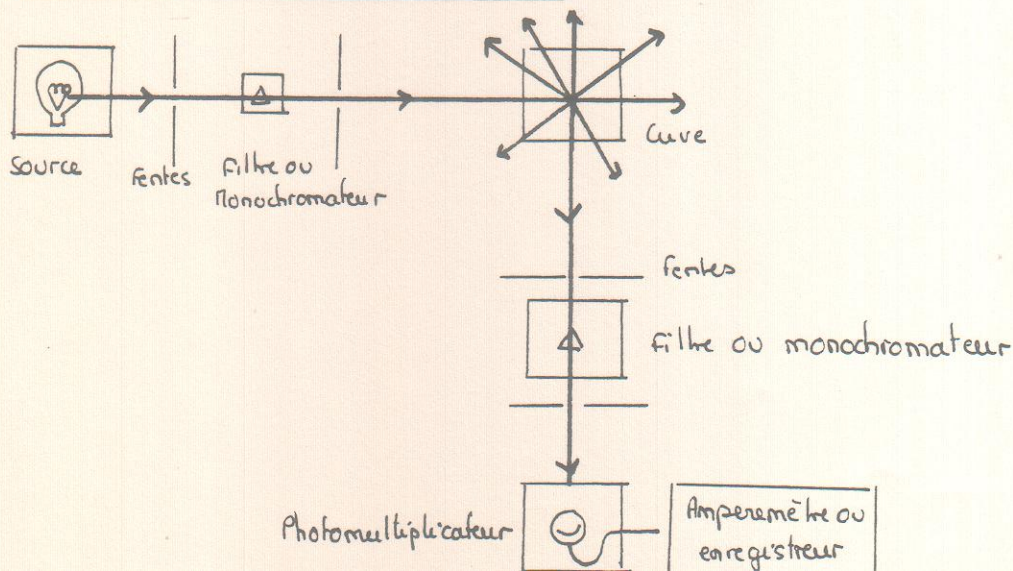
- La température : lorsque la température augmente, la fluorescence diminue.

La diminution est de 1 % par degré.

### III. MESURES

#### A. Instrumentation

##### a) Schéma de principe (Spectrofluorimétrie)

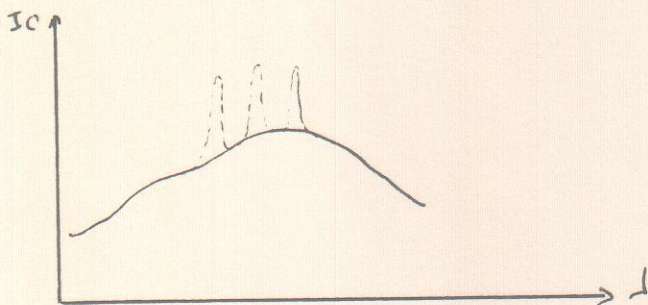




**b) Composants**

Source lumineuse --> système de sélection d'un rayonnement monochromatique --> cuve plus porte cuve --> système de sélection du rayonnement --> système enregistreur.

- **Source** : On utilise des lampes capables de fournir une intensité très importante. Ce sont généralement des lampes en xénon : elles donnent un "continuum", c'est-à-dire une intensité importante sur tout le spectre.



Parfois on utilise des lampes encore plus puissantes (Xe + Hg); on a alors les raies fondamentales de Hg qui s'ajoutent au continuum du Xe.

On se place sur une raie d'émission du Hg pour obtenir une intensité très importante.

Dans les appareils bas de gamme, on trouve des lampes à Hg seulement.

- **Sélecteur de radiation** : qui sélectionne la lumière d'excitation :

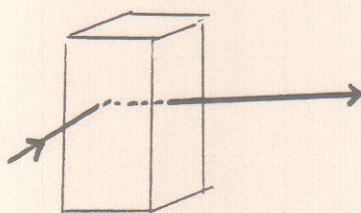
- . grâce à des filtres interférentiels,
- . grâce à un monochromateur à réseau (généralement).

Il s'ajoute tout un jeu de fentes plus ou moins larges : plus la fente est large, plus la lumière incidente est importante, mais on augmente aussi la bande passante; on est alors moins sélectif.

- **Système de présentation de l'échantillon** :

Les cuves les plus utilisées ont un cm de trajet optique, présentant au minimum deux faces contiguës transparentes au rayonnement.

On étudie la lumière fluorescente à 90°.



On utilise généralement des cuves en quartz dans la mesure où la lumière d'excitation est telle que  $\lambda < 350 \text{ nm}$ .

- **Second sélecteur de radiation** : Il est identique au précédent. Il permet de sélectionner la  $\lambda$  du maximum d'émission du composé fluorescent.

- **Système de détection** : C'est habituellement un photomultiplicateur; il permet d'amplifier le signal.

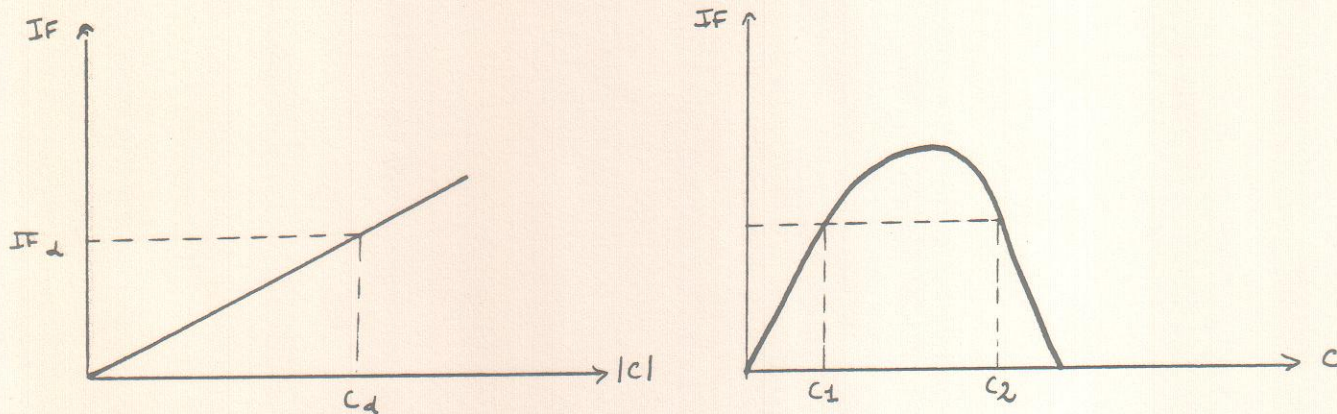
**2. Echantillonnage**

On travaille en solution, dans des solvants variés.

Les solvants utilisés ne doivent pas comporter de composés fluorescents (qui seraient des sources d'erreurs conséquentes).

### 3. Conditions de mesure et erreurs

On effectue toujours les mesures en valeur relative : on est donc amené à utiliser une fonction d'étalonnage.



- Pour une même intensité de fluorescence on a en fait deux concentrations possibles : il ne faut jamais l'oublier ! On s'assure toujours, lors d'un prélèvement, que l'on est dans la partie linéaire (faibles concentrations) et non dans l'autre partie. On fait alors deux dosages :

- . à concentration normale,
- . à concentration diluée.

- Si la concentration est élevée, on a un effet de filtre interne et effet d'autoinhibition.

Il faut se méfier de la photodécomposition : on casse la molécule par le rayonnement.

Exemple : dosage de NaDH que l'on laisse trop longtemps dans la cuve et qui se décompose.

- Il faut faire attention au phénomène de Quenching : se placer dans un environnement semblable pour l'étalon et l'échantillon.

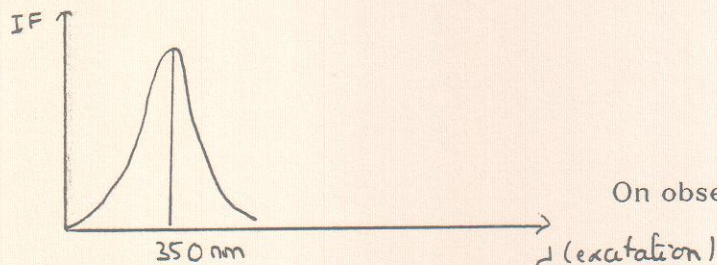
- Avant de mettre en route le dosage, on utilise un blanc réactif pour vérifier que le solvant ne comporte pas d'impuretés fluorescentes.

### 4. Contrôles :

#### a) Contrôle d'exactitude des $\lambda$ (des monochromateurs d'excitation et d'émission)

- On contrôle d'abord le monochromateur d'émission en plaçant à l'intérieur de la porte cuve avec une petite lampe à vapeur de Hg. On fait défiler sur le monochromateur d'émission et on étudie  $IF$  en fonction de  $\lambda$ . On note les valeurs des pics trouvés et on les compare aux longueurs d'onde théoriques des raies d'émission du Hg. On vérifie ainsi que le monochromateur est bien calé.

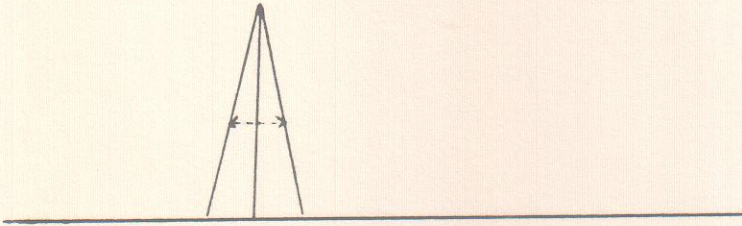
- On contrôle alors le monochromateur d'excitation : on place à l'intérieur de la cuve une solution trouble et on allume la lampe. Il se produit un phénomène de diffusion de la lumière (à 350 nm par exemple). On retrouvera donc  $\lambda = 350$  nm au niveau du monochromateur d'émission (dont on est sûr qu'il est bien calé).



On observe un pic de diffusion à 350nm.

b) Contrôle de la largeur de la bande passante :

On utilise le spectre des vapeurs de Hg. On prend un des pics et on l'élargit. On note la largeur de cette bande à mi-hauteur (= largeur de la bande passante).

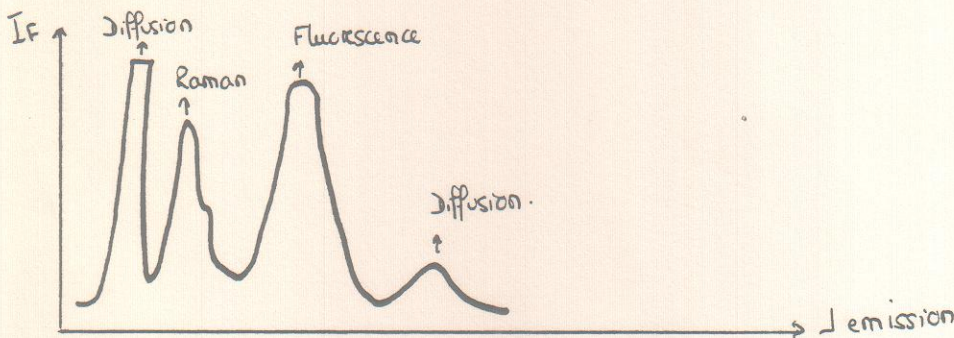


c) Contrôle de la sensibilité de l'appareil :

Pour réaliser ce contrôle, on utilise des composés comme :

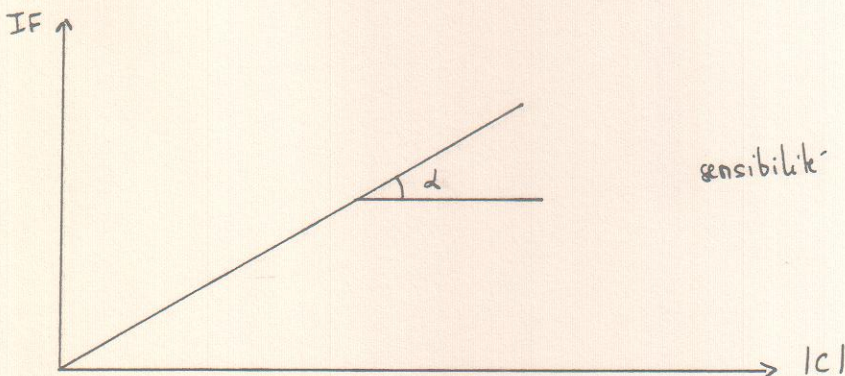
- le sulfate de quinine : on note la variation du signal en fonction de la variation de concentration.

NB : La sensibilité se définit comme la pente de la fonction d'étalonnage.



- On peut aussi utiliser la bande RAMAN du solvant.

Exemple : spectre d'émission à haute sensibilité du sulfate de quinine.

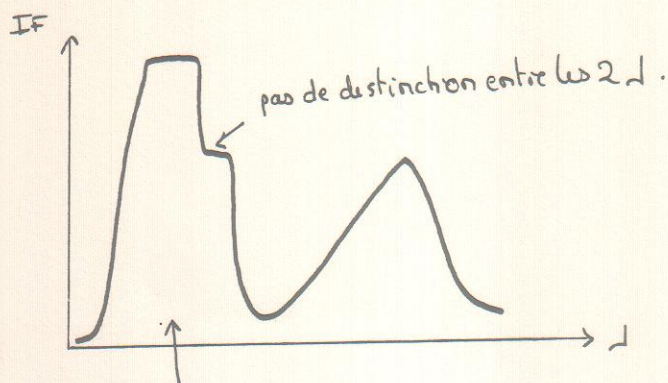
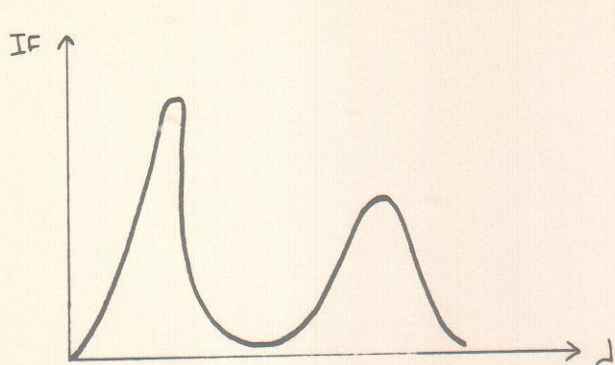


$$\text{sensibilité} \quad \alpha = \frac{\Delta IF}{\Delta c}$$

On commence à enregistrer le spectre pour  $\lambda < \lambda_{\text{excitation}}$  : on obtient un phénomène de diffusion.

Puis on obtient un pic correspondant à la bande Raman du solvant, situé généralement après le pic de diffusion. Il est uniquement dû au solvant. La différence entre les maximums de ces deux premières bandes est caractéristique du solvant et  $< 20$  ou  $30$  nm. La bande Raman est due à une différence des énergies de vibration des molécules du solvant. Ici, des molécules de solvant ont absorbé de l'énergie (de la radiation à  $250$  nm) et leur énergie de vibration est plus importante.

Pour avoir une bande Raman, il faut que la sensibilité de l'appareil soit élevée. Sinon on a :



non séparation de la bande de diffusion et de la Bande Raman dans le cas d'une faible résolution (même si la sensibilité est importante)

#### IV. APPLICATIONS

##### 1. Analyse qualitative

Cette méthode est peu performante pour une telle analyse.

Lorsqu'on a un composé de référence et un composé à étudier, on peut comparer les spectres.

##### 2. Analyse quantitative

Ici la méthode est très sensible.

a) Méthodes directes : le composé est lui-même fluorescent.

- Médicaments : . sulfate de quinine,  
. tétracyclines.

- Biologie : . cortisone,  
. corticostérone,  
. Vit B2, B6.

b) Méthodes indirectes : lorsque le composé n'est pas fluorescent.

On profite d'une réaction entre le composé à doser et une autre molécule donnant un composé fluorescent.

- Pour doser le  $\text{Ca}^{2+}$  on utilise la caléine (non fluorescente) mais qui donne un complexe fluorescent.

- Les acides aminés ne sont pas fluorescents mais par exemple ils réagissent avec :  
. le chlorure de dansyl } ==> et donnent des composés fluorescents  
. l'O phtaldialdéhyde }

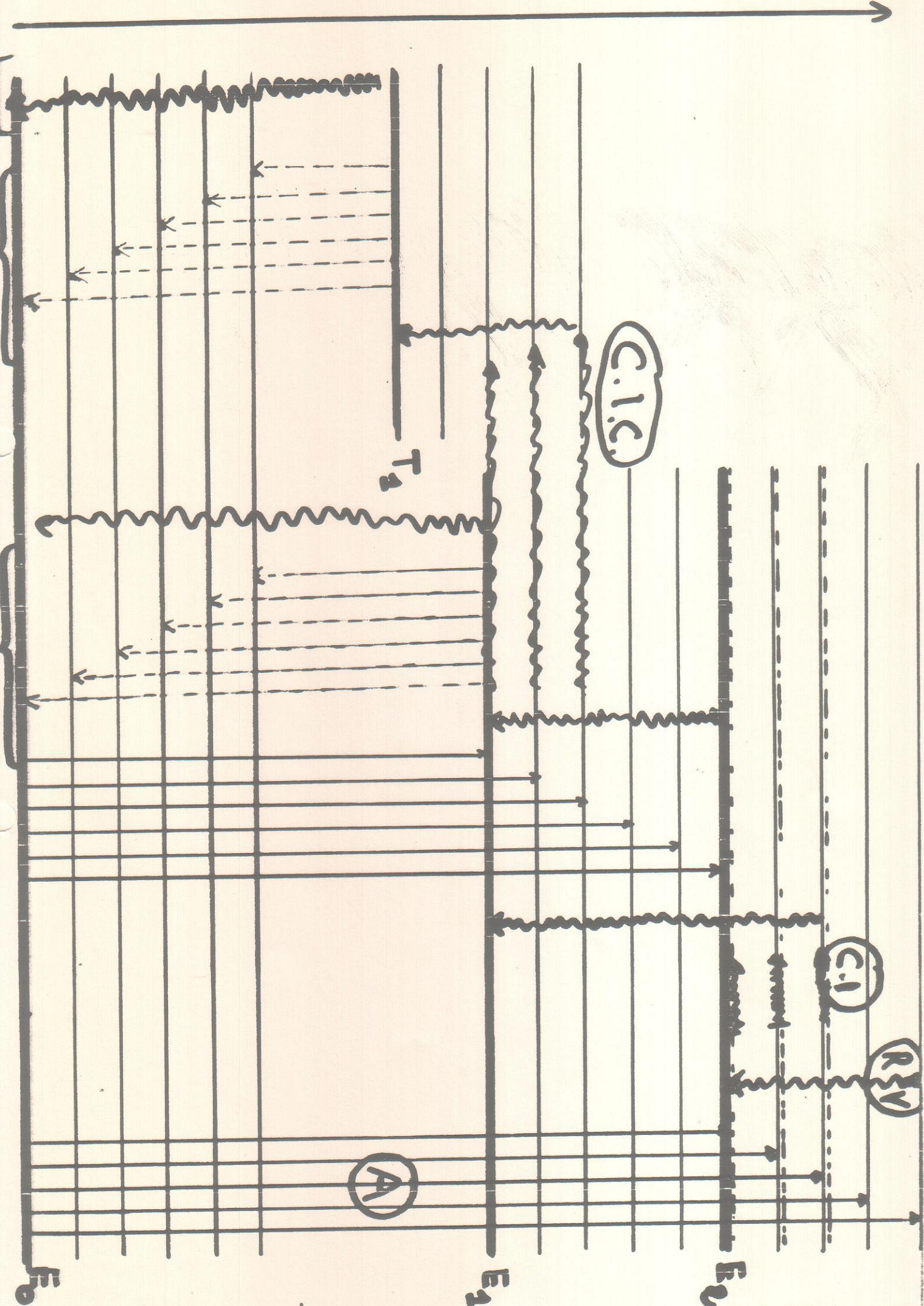
- Les catécholamines (Adrénaline - Noradrénaline) peuvent devenir fluorescentes.  
- La vit B1, lorsqu'elle est oxydée donne un composé fluorescent.

c) Méthode utilisée pour la détection en chromatographie.

PAS DIEMISSION

PHOSPHORESCENCE

FLUORESCENCE



## **NEPHELOMETRIE - TURBIDIMETRIE**

### **I. ASPECTS THEORIQUES**

#### **1. Diffusion de la lumière**

- a) Diffusion Rayleigh
- b) Diffusion Rayleigh-Gans
- c) Diffusion Mie

#### **2. Equation de Rayleigh**

### **II. LA LUMIERE DIFFUSEE**

#### **1. Différents paramètres de $I_d$**

- a) La particule
- b) La lumière
- c) Observateur

#### **2. Principes de mesure**

- a) En néphélogétrie
- b) En turbidimétrie

### **III. MESURES**

#### **1. Instrumentation**

- a) Néphélogétrie
- b) Turbidimétrie

#### **2. Echantillonnage**

#### **3. Conditions de mesure et erreurs**

### **IV. APPLICATIONS**

## NEPHELOMETRIE - TURBIDIMETRIE

Ce sont deux méthodes d'analyse quantitative basées sur l'intensité de la lumière diffusée par des particules en suspension.

### I. ASPECTS THEORIQUES

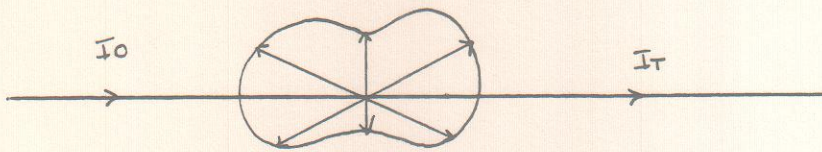
#### 1. Diffusion de la lumière

Elle est due à des particules de taille variable. On distinguera plusieurs types de diffusion, selon la taille de ces particules.

##### a) Diffusion Rayleigh :

Elle s'adresse à des particules dont le diamètre  $\begin{cases} L < 50 \text{ nm} \\ L < \lambda / 10 \end{cases}$

Il s'agit d'un phénomène de diffraction. Une partie de la lumière est transmise, l'autre partie est diffusée avec une longueur d'onde proche de celle du rayonnement incident.

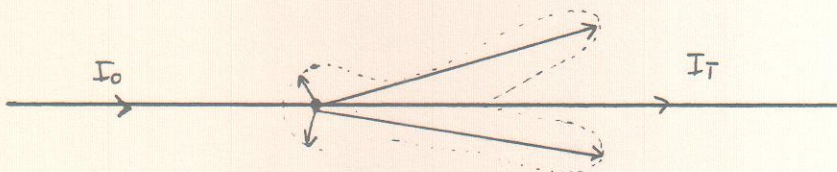


##### b) Diffusion Rayleigh-Gans $\begin{cases} L < 500 \text{ nm} \\ L < \lambda \end{cases}$

Il y a des phénomènes de diffraction et réfraction. Une partie de la lumière est transmise. Pour l'autre partie, une direction de diffusion est privilégiée : il s'agit de celle du rayonnement incident.

##### c) Diffusion de Mie $\begin{cases} L < \lambda \\ L > 500 \text{ à } 2500 \text{ nm} \end{cases}$

L'intensité de la lumière diffusée est très variable selon l'angle sous lequel on l'observe : elle sera plus importante pour un angle d'observation faible par rapport au rayonnement incident.



### 2. Equation de Rayleigh : (dans le cadre de la diffusion de Mie)

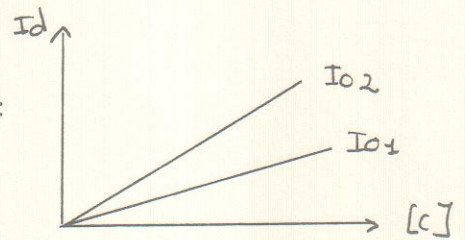
Pour une particule sur laquelle arrive un faisceau incident monochromatique ( $I_0, \lambda, \theta$ )

### a) En néphélométrie

On constate que  $I_d$  est proportionnelle à

$$I_d = k \cdot \frac{N}{\Delta V} \cdot I_0 \cdot l = k' \cdot c \cdot I_0 \cdot l$$

$\frac{N}{\Delta V}$ ,  $I_0$  et  $l$ :

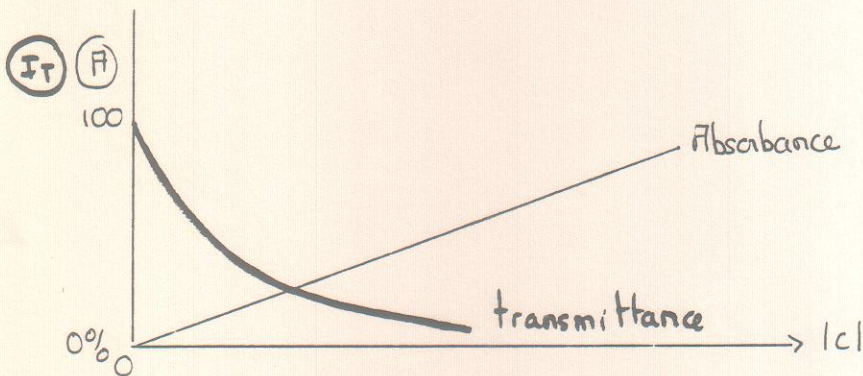


Les autres conditions sont constantes (diamètre, rapport des indices de réfraction,  $\lambda$  de la lumière, appareil déterminé nous permettant de dire que  $r$  et  $\theta$  sont constants).  
On peut facilement augmenter la sensibilité de la méthode en augmentant l'intensité de la lumière incidente.

### b) En turbidimétrie

$$I_T = I_0 e^{-k'l} = I_0 e^{-k'lc}$$

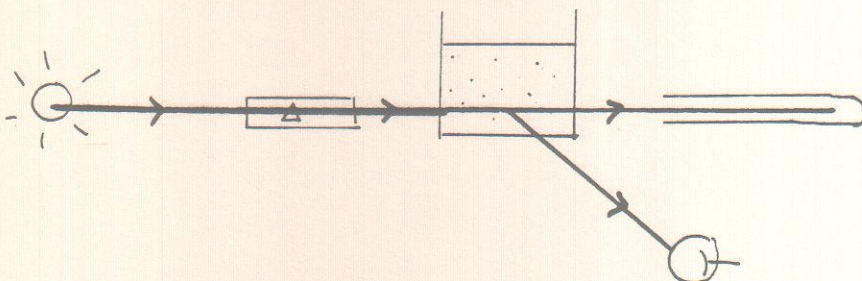
$$A = \log \frac{I_0}{I_T} = \frac{k'lc}{2,3}$$



## III. MESURES

### 1. Instrumentation

#### a) Néphélomètre : schéma de principe et composants



#### - Source :

- Lampe tungstène-halogène : son inconvénient est qu'elle n'est pas très puissante.
- Rayonnement laser : il est parfaitement monochromatique (bien que dans le cas présent ça ne serve à rien) et il est puissant.
- Diode électroluminescente.



- Sélecteur de  $\lambda$  :

- Il est seulement nécessaire lorsqu'on a affaire à une lampe tungstène-halogène (Filtre-Monocromateur).

- Cuve en verre ou en plastique :

- Car on travaille rarement en-dessous de 350 nm.

- Système de piège pour la lumière transmise

- Détecteur :

- Photomultiplicateur tel que l'angle entre la lumière incidente et la lumière transmise soit faible (de 7 à 30°).

b) Turbidimètre

C'est un photomètre à filtre ou un spectrophotomètre.

NB : Si on ne dispose pas de néphélomètre, on peut utiliser un spectrofluorimètre.

2. Echantillonnage

Ce sont des particules en suspension : il faut une bonne homogénéité du milieu.

Elle dépend de la taille des particules (ne doivent pas être trop grosses).

Afin d'obtenir un maintien correct des particules en suspension, on peut :

- ajouter au milieu des tensioactifs,
- augmenter la viscosité en ajoutant du glucose.

3. Conditions de mesure et erreurs

On effectue toujours des mesures en valeur relative.

Les causes d'erreurs :

- effet de filtre interne : où toutes les particules ne participent pas à la diffusion (perte de linéarité). Ceci est dû à des solutions trop concentrées,
- une  $\lambda$  à laquelle le milieu absorbe .

IV. APPLICATIONS :

Surtout dans le domaine de la biologie.

--> Pour le dosage des protéines totales : par précipitation à l'aide de différents agents (dosage des protéines dans les urines).

--> Pour le dosage des protéines spécifiques (essentiellement) : dosage des IgG, de la transferrine. On réalise ici une immunoprécipitation.

La protéine se comporte comme l'Ag sur lequel on utilise un réactif qui n'est autre que l'Ac (obtenu par immunisation d'un animal).

Il se produit la classique réaction Ag-Ac : on se retrouve ainsi avec un milieu contenant des particules en suspension.

**RONEO III  
CHIMIE - ANALYTIQUE  
Mr Roger LATER**

**18 Novembre 1993  
17H30 - 18H30  
Corinne ARTHAUD  
M.Christine BELIN**

## **RESONNANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE**

### **I. ASPECTS THEORIQUES**

- 1. Moment angulaire du noyau**
- 2. Moment magnétique du noyau**
- 3. Mouvement de précision**
- 4. Energie**

### **II. LES SPECTRES**

- 1. Principe de leur détermination**
- 2. Position des raies**
- 3. Facteurs modifiant la position des raies**
  - a) Environnement électronique de l'atome**
  - b) Environnement nucléaire**
- 4. Intensité des raies**

### **III. MESURES**

- 1. Instrumentation**
- 2. Echantillonnage**

### **IV. APPLICATIONS**

## SPECTROMETRIE DE RESONNANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN)

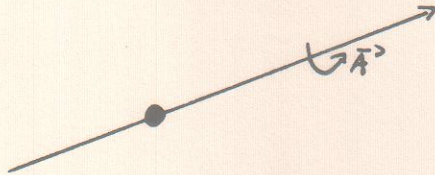
- Elle est basée sur les propriétés des noyaux de l'atome.
- Elle concerne les variations d'énergie de ces noyaux provoqués par l'absorption de rayonnements dans le domaine des radiofréquences (sont donc de faible énergie).

### I. ASPECTS THEORIQUES

#### 1. Moment angulaire du noyau

Z = numéro atomique = nombre de protons = nombre des e-  
P + N = nombre de masse.

Le noyau, chargé positivement peut tourner sur lui-même : il possède un spin.



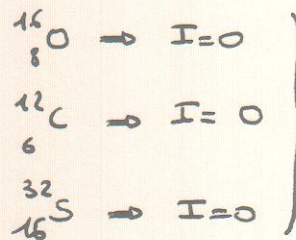
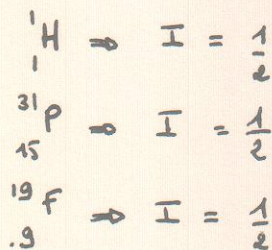
Le moment angulaire est caractérisé par  $\vec{A}$ .

Dans le cas du noyau, le spin est caractérisé par le nombre quantique de spin (I) tel que  $I = 0 \rightarrow$  par demi entiers (0 - 0,5 - 1...).

La valeur de I dépend du nombre de masse et du numéro atomique de l'atome.

Soit un élément	X	nbre masse
		numéro atome
Impair		
X	==>	I prendra les valeurs 1/2, 3/2, 5/2
Pair		
X	==>	I = 0
Pair		
Pair		
X	==>	I = 1, 2, 3, 4, 5, 6
Impair		

Exemples :



ces éléments ne donnent pas lieu au phénomène de RMN.



${}^{13}_6\text{C} \Rightarrow I = +\frac{1}{2}$  est fréquemment utilisé pour les études en RMN

## 2. Moment magnétique du noyau :

Dans le cas d'un élément dont  $I \neq 0$ , il y a création d'un moment magnétique caractérisé par un vecteur  $\vec{\mu}$ . Ce moment présente deux caractéristiques essentielles :

- il est colinéaire de l'axe de rotation, donc du vecteur moment angulaire du noyau  
 -  $\vec{\mu} = \gamma \vec{A}$ ; est la constante gyromagnétique : elle est caractéristique d'un atome donné (constante ou rapport),

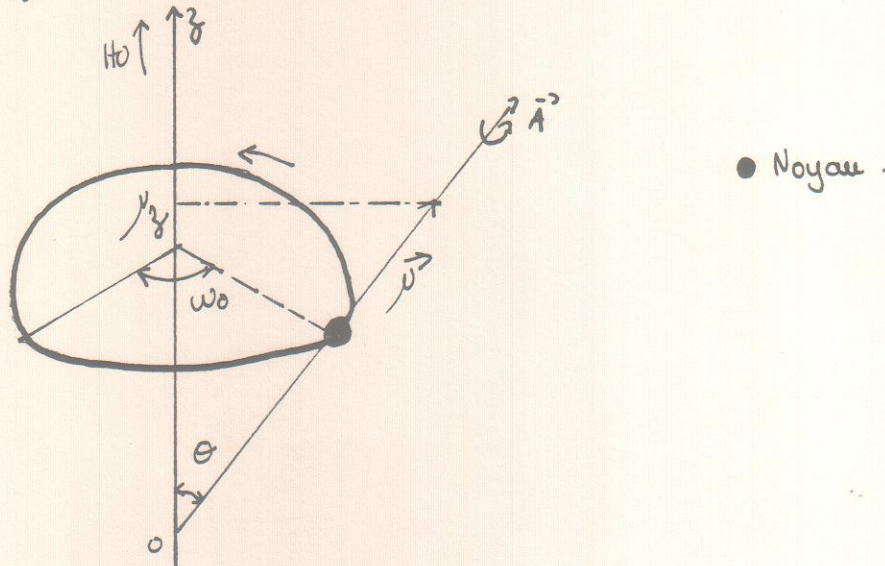
- lorsque le noyau est placé dans un champ magnétique,  $\vec{\mu}$  ne peut prendre qu'un certain nombre d'orientations. C'est une restriction quantique. Ce nombre d'orientations est caractérisé par le nombre quantique magnétique qui pourra prendre  $(2I + 1)$  valeurs.

Si  $I = 1/2$   $m = -1/2$  ou  $m = +1/2$ . Ces deux valeurs déterminent ici deux orientations (parallèle et anti-parallèle).

A chaque orientation du moment magnétique correspond une énergie déterminée du noyau.

## 3. Mouvement de précision

On place le noyau de l'atome en rotation, dans un champ magnétique  $H_0$ .



Ce système se comporte en fait comme une toupie (mouvement gyroscopique). On dit que le noyau entreprend un mouvement de précision de LARMOR.

Ce mouvement peut définir une vitesse angulaire  $\omega_0$  : elle est proportionnelle à  $H_0$  et la constante correspond au rapport gyroscopique.

$$\vec{\omega}_0 = \gamma \vec{H}_0.$$

Si on modifie  $H_0$ , on change  $\omega_0$  sans jouer sur  $\theta$ . Cet angle ne peut prendre qu'un certain nombre de valeurs : il y a encore une restriction quantique (on ne s'en lasse pas ?)

$$\vec{A} \cos \theta = \frac{h}{2\pi} m$$

$$\vec{\mu} \cos \theta = \frac{h}{2\pi} m \gamma = \mu_z.$$

Si  $I = 1/2$   $m$  prendra deux valeurs... de même  $\theta$ .

#### 4. L'énergie

L'énergie d'une particule possédant un moment magnétique, lorsqu'elle est placée dans un champ magnétique est donnée par la relation.

$$E = \mu_z H_0$$

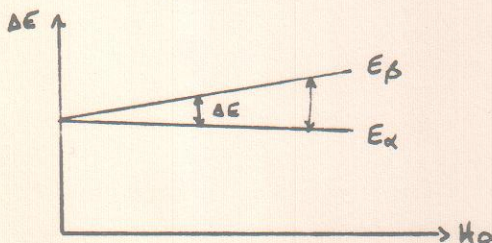
Si on considère un noyau de spin égal à  $1/2 \rightarrow m = \pm 1/2$ .

$$I = \frac{1}{2} \quad \left\{ \begin{array}{ll} m = -\frac{1}{2} & \mu_z = -\frac{h}{4\pi} \gamma \\ m = +\frac{1}{2} & \mu_z = +\frac{h}{4\pi} \gamma \end{array} \right. \quad \begin{array}{l} E_\beta = \frac{h}{4\pi} \gamma H_0 \\ E_\alpha = -\frac{h}{4\pi} \gamma H_0 \end{array}$$

Il apparaît deux niveaux d'énergie :

$$\Delta E = E_\beta - E_\alpha = \frac{h}{2\pi} \gamma H_0$$

- On voit que la différence entre les niveaux d'énergie varie en fonction de  $H_0$ .



plus le champ est grand, plus la différence d'énergie est importante.

En plaçant l'atome dans un champ magnétique, on a séparé les niveaux d'énergie. On peut passer de  $E_\alpha$  à  $E_\beta$  en lui fournissant de l'énergie sous forme d'énergie électromagnétique.

$$\Delta E = h\nu_0 \quad \text{et} \quad \nu_0 = \frac{\gamma}{2\pi} H_0$$

- La fréquence à fournir pour obtenir le passage de la transition  $\alpha \rightarrow \beta$  dépend de la valeur du champ magnétique appliqué à l'atome.

Soit on place l'atome dans un champ  $H_0$  constant et on fait varier la fréquence du rayonnement que l'on envoie sur l'atome ( $\nu_0$ ) : on obtiendra le passage de  $E_\alpha$  à  $E_\beta$ .

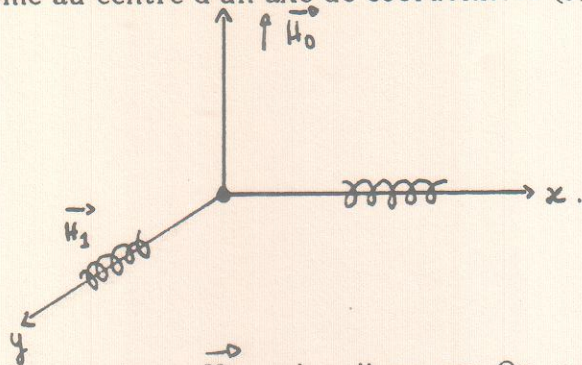
Soit on fixe la radiofréquence et on fait varier  $H_0$ . Pour une certaine valeur de  $H_0$  on obtiendra le passage de  $E_\alpha$  à  $E_\beta$ .

#### II. LES SPECTRES

Les spectres sont généralement des spectres de raies, d'absorption ou d'émission.

## 1. Principe de leur détermination

On place l'atome au centre d'un axe de coordonnées (O, x,y,z).



On applique à cet atome  $H_0$ , selon l'axe  $oz$ ; On a une séparation des niveaux d'énergie de l'atome. Il faut fournir de l'énergie pour obtenir la transition  $E_\alpha \rightarrow E_\beta$  : elle est donnée par un champ sinusoïdal de radiofréquence orienté selon  $Oy$  et de valeur  $H_1$ . C'est une bobine de radiofréquence parcourue par un champ alternatif = bobine émettrice.

La bobine réceptrice est constituée par  $\rightarrow$  un système récepteur, sur l'axe  $Ox$ , qui permet d'enregistrer le changement de magnétisation de l'échantillon. (Il entraîne une différence de courant lorsqu'il détecte la radiofréquence).

On a deux possibilités :

- Si  $H_0 = \text{constant}$ , on note pour quelle valeur de  $H_1$  on a la transition.
- Si  $H_1 = \text{constant}$  (fréquence constante), on fait varier  $H_0$  jusqu'à ce qu'il y ait la transition. C'est plutôt cette méthode qui est appliquée.

## 2. Position des raies

Elle varie selon la nature de l'atome : de  $\delta$

Si on se place dans un champ constant  $H_0 = 23500$  gauss : pour :

1 H, la résonance est obtenue pour une fréquence de 100,1 MégaHertz

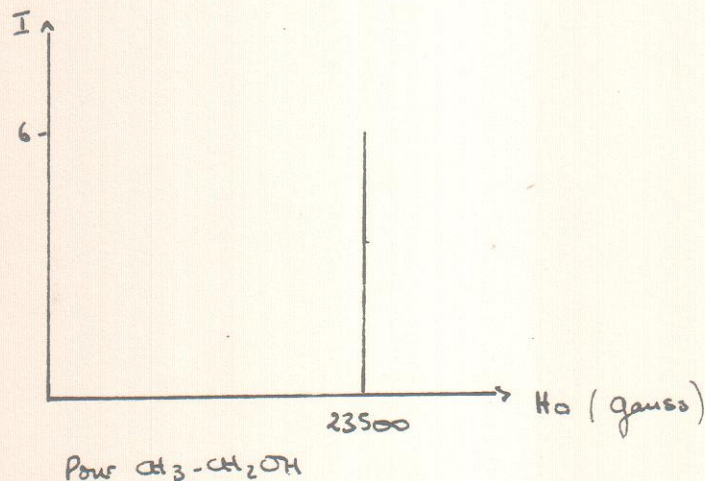
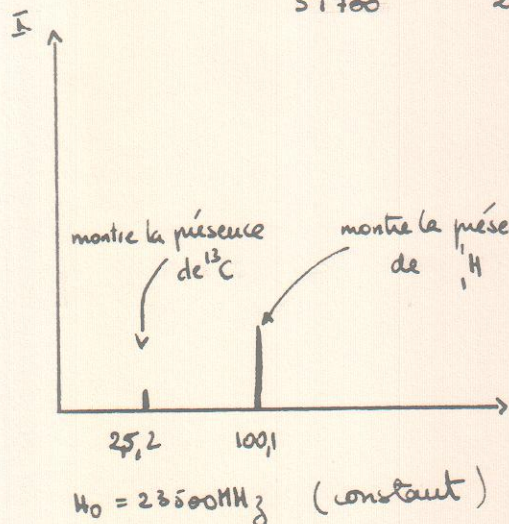
19F, la résonance est obtenue pour une fréquence de 94,1

31P, la résonance est obtenue pour une fréquence de 40,5

13C, la résonance est obtenue pour une fréquence de 25,2

Si on fait varier le champ magnétique pour un élément donné, il y a résonance pour des fréquences différentes.

$^1\text{H}$	champ	$\delta$
	14 100	60
	23 500	100
	51 700	220



### 3. Facteurs modifiant la position des raies

#### a) Environnement électronique de l'atome

Les  $e^-$  créent un champ magnétique  $\vec{h}$ , de sorte que le noyau n'est plus soumis à  $\vec{H}_0$  mais à un champ local :  $\vec{H}_{loc} = \vec{H}_0 - \vec{h}$ .

$\vec{H}_{loc}$  = champ magnétique efficace.

C'est pour la valeur de ce champ que se produit la résonance et non pour  $\vec{H}_0$ .

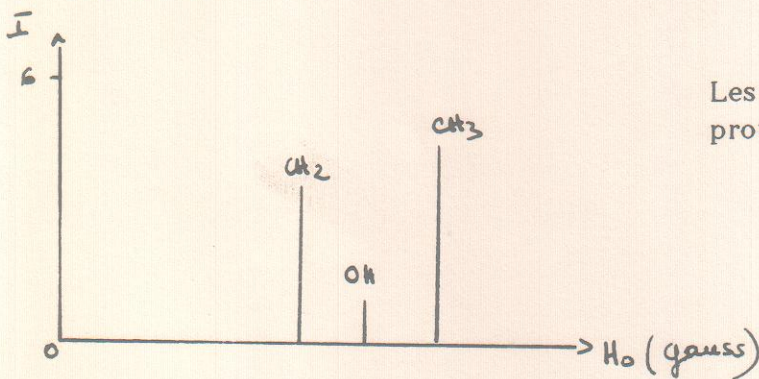
Dans une molécule, les atomes vont avoir un environnement électronique différent (CH<sub>3</sub> - CH<sub>2</sub> - OH).

- Lorsque l'environnement est identique, les noyaux sont dits isochromes (CH<sub>3</sub>).

- Lorsque l'environnement est différent, les noyaux sont dits anisochromes (CH<sub>2</sub> - OH)

Si on considère une molécule, on peut dire qu'il existe autant de champs efficaces que de groupes de noyaux isochromes. Donc pour chaque groupe d'atomes isochromes, on obtient une valeur de champ différente.

Sur le spectre, on observe :



Les hauteurs dépendent du nombre de protons d'un même groupement.

Plus la densité électronique autour du noyau est grande, plus le champ dû aux électrons  $\vec{h}$  est grand.

$$\vec{H}_0 = \vec{H}_{loc} + \vec{h}$$

$\vec{h}$  varie avec le champ  $\vec{H}_0$

$$\vec{h} = -\sigma \vec{H}_0$$

$\sigma$  est la constante d'écran (qui tient compte de la densité électronique autour du noyau).

$$\sigma_{CH_3} > \sigma_{OH} > \sigma_{CH_2}$$

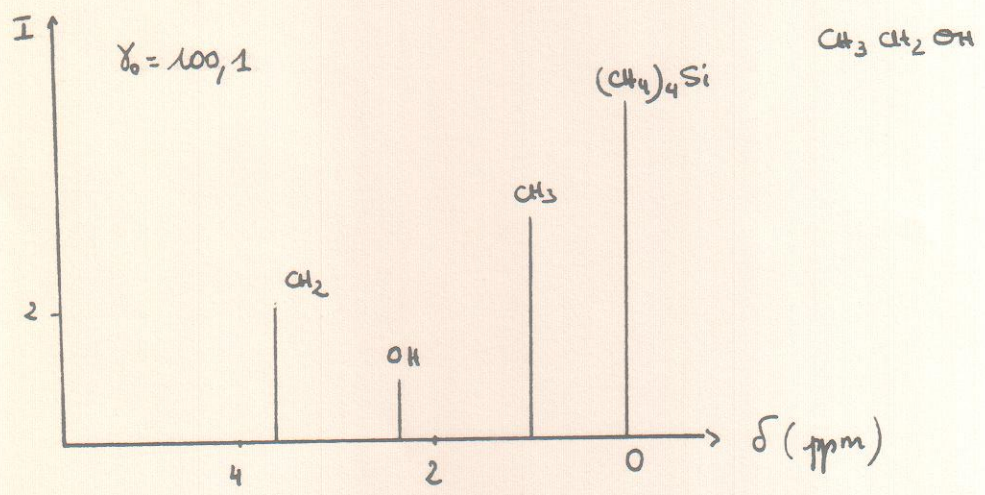
#### - Déplacement chimique

En pratique, on ne sait pas mesurer  $\vec{H}_{loc}$  de manière absolue. On fait une mesure en valeur relative par rapport à un composé de référence pour lequel la densité électronique est très grande. On utilise le tétraméthylsilane : (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub> Si. On note le déplacement chimique  $\delta$  donné par la formule suivante :

$$\delta = \frac{H_e - H_r}{H_r} \times 10^6$$

$\vec{H}_e$  = champ nécessaire pour obtenir la résonance pour l'échantillon.  
 $\vec{H}_r$  = champ nécessaire pour obtenir la résonance des protons du (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub> Si.  
 Pour la RMN du proton (technique utilisée à 99 %)  
 10<sup>6</sup> = permet d'exprimer les parties par millions.

Pour (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub> Si ==>  $\delta = 0$ .  
 On a une échelle de  $\delta$  allant de 0 à 7.



on a aussi :

$$\delta = \frac{\sigma_r - \sigma_e}{1 - \sigma_r}$$

Le spectre nous indique les groupes de noyaux isochromes.  
 Les pics (surfaces) nous indiquent le nombre de protons.  
 Le déplacement chimique nous permet de faire des études sur la nature des groupements étudiés (Schéma n° 1).

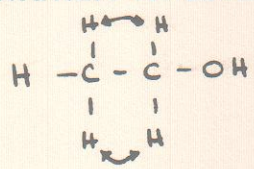
**b) Environnement nucléaire**

Cf "vrai" spectre de l'éthanol (Schéma n° 2)

L'appareil qui est utilisé présente ici un pouvoir de résolution bien plus important : ainsi, au lieu de voir un simple pic, on observe une surface.

Ce n'est pas la hauteur des pics qui permet de connaître le rapport de protons mais la surface de ces pics. (Les appareils sont capables de donner la valeur de ces surfaces). On a ici un triplet... c'est-à-dire 3 pics (s'il y avait 2 pics on aurait un doublet... 1 pic, un singulet... etc. si 4, 5... pics).

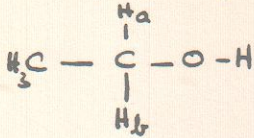
Cette structure est due à l'interaction entre des noyaux voisins.



interaction réciproque entre les H



On parle de couplage magnétique entre les noyaux.



Les protons (noyaux) peuvent avoir des spins différents ( $-1/2$ ;  $+1/2$ ).  
Ces protons sont soit parallèles, soit antiparallèles.

Ha Hb

$\uparrow$	$\uparrow$	$(+1/2) + (+1/2) = 1$	$\left. \begin{array}{l} \text{il y a influence positive} \\ \text{il n'y a pas d'influence} \\ \text{(c'est-à-dire modification} \\ \text{du champ local} \\ \text{il y a influence négative} \end{array} \right\}$	sur les protons voisins que l'on ne connaît pas forcément
$\uparrow$	$\downarrow$	$(+1/2) + (-1/2) = 0$		
$\downarrow$	$\uparrow$	$(-1/2) + (+1/2) = 0$		
$\downarrow$	$\downarrow$	$(-1/2) + (-1/2) = -1$		

Les modifications du champ entraînent :

- un déplacement positif (si protons parallèles et de spin  $+1/2$ ),
- pas de déplacement (antiparallèles),
- un déplacement négatif (si protons parallèles et de spin  $-1/2$ ).

On obtiendra ainsi :

- 3 raies de probabilité 1, 2, 1,
- 3 raies de surface dans un rapport 1,2, 1.

$\Rightarrow$  Le groupement comportant 3 protons a pour voisin un groupement portant  $2\text{H}^+$ .

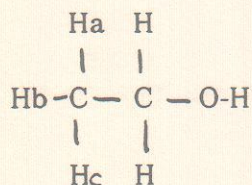
**NB :** L'influence des protons a lieu sur les protons voisins et pas 2 liaisons plus loins.



triplet  $\Rightarrow$  et la surface totale correspond à 3 (elle est donnée par l'appareil)

"J'ai un triplet"  $\Rightarrow$  ce qui signifie que j'ai 1  $\text{CH}_2$  : car 2 protons peuvent provoquer un triplet. Ceci signifie aussi que j'ai des  $\text{H}^+$  sur le groupement adjacent. Comme la surface  $S = 3$ , c'est qu'il y a 3 protons sur ce groupement voisin; il s'agit d'un  $\text{CH}_3$ .

Influence des protons du  $\text{CH}_3$  sur les protons du carbone adjacent.



Ha Hb Hc

 $\uparrow \quad \uparrow \quad \uparrow \quad + 3/2 \quad \left\{ \right.$ 
 $\uparrow \quad \uparrow \quad \downarrow \quad + 1/2 \quad \left\{ \right.$ 
 $\uparrow \quad \downarrow \quad \uparrow \quad + 1/2 \quad \left\{ \right.$ 
 $\downarrow \quad \uparrow \quad \uparrow \quad + 1/2 \quad \left\{ \right.$ 
 $\uparrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad - 1/2 \quad \left\{ \right.$ 
 $\downarrow \quad \downarrow \quad \uparrow \quad - 1/2 \quad \left\{ \right.$ 
 $\downarrow \quad \uparrow \quad \downarrow \quad - 1/2 \quad \left\{ \right.$ 
 $\downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \quad - 3/2 \quad \left\{ \right.$ 

Les protons du carbone adjacent (CH<sub>2</sub>) sont représentés sur le spectre par :

--> 4 raies,

--> probabilités : 1, 3, 3, 1,

--> surface dans rapport : 1, 3, 3, 1.

Le groupement comportant 2 protons a pour voisin un groupement comportant 3 protons.

"Quadruplet" = groupement avec 3 protons qui influencent les protons d'un groupement adjacent.

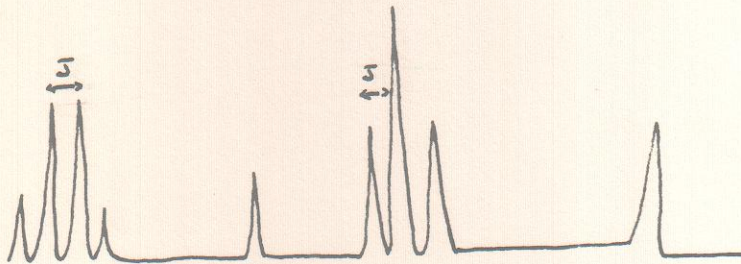
La surface de ce groupement adjacent m'indique le nombre de protons de ce groupement. (S = 2 : donc j'ai un CH<sub>2</sub> adjacent au CH<sub>3</sub>).

Il reste un seul pic : il correspond à un proton. Connaissant la formule brute C<sub>2</sub> H<sub>6</sub>O on peut dire que la molécule étudiée est CH<sub>3</sub> - CH<sub>2</sub> - OH.

En règle générale :

Si le carbone voisin porte n noyaux de spin I, le signal est décomposé en (2nI + 1) raies dont les intensités sont données par les coefficients de développement d'un binôme (cas de RMN du proton) :

1  
1 1  
1 2 1  
1 3 3 1  
1 4 6 4 1



La distance entre deux raies successives est appelée constante de couplage. Elle est désignée par la lettre J.

Lorsque deux groupements sont couplés entre eux, la constante  $J$  séparant les raies des deux groupements est la même. Ceci permet dans un spectre de déterminer deux groupements adjacents ( $\rightarrow$  ordonnancement des groupements dans les molécules).

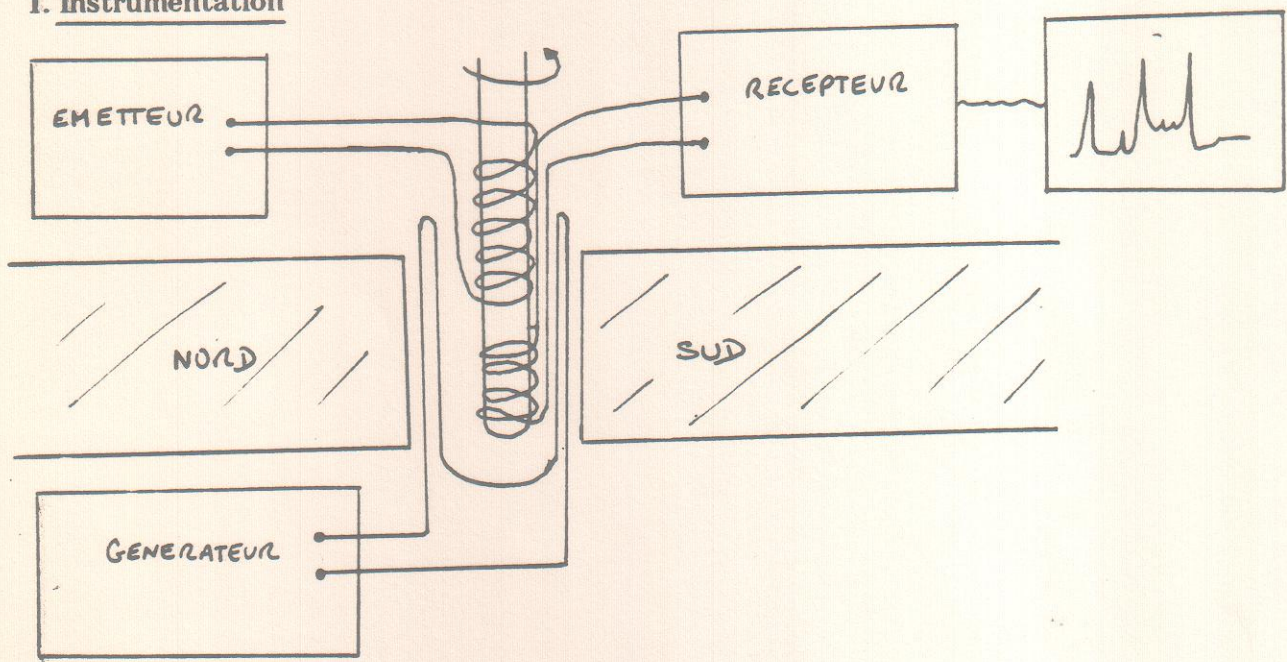
En règle générale, il n'y a pas de couplage au-delà de 3 liaisons (souvent ceci correspond à deux C adjacents). Toutefois, des couplages peuvent s'effectuer dans le cas de molécules de conformation particulière (disposition dans l'espace qui rapproche certains groupements).

#### 4. Intensité des raies

La surface des raies est proportionnelle au nombre d'atomes.

### III. MESURES

#### 1. Instrumentation



- Un champ magnétique est créé par un aimant ou électroaimant ( $\vec{H}_A$ ).

On fait varier le champ alors que la radiofréquence d'émission est constante. Un générateur sert à faire varier le champ qui était donné constant par l'aimant.

$$\vec{H}_0 = \vec{H}_A + \vec{H}_G$$

variable

- On place l'échantillon dans un tube en rotation permanente.

- Un émetteur de radiofréquence nous permet de choisir une fréquence pour le composé à étudier (100,1 si 23500 Gauss).

- Un récepteur radio permet d'enregistrer une modification du signal.

#### 2. Echantillonnage

- L'échantillon étudié est en solution.

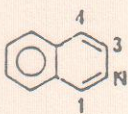
- On évite les solvants contenant des protons comme l'eau ou les alcools. On utilise ainsi  $\text{CCl}_4$  (mais peu de composé peut être dissout) et surtout des composés deutérés.

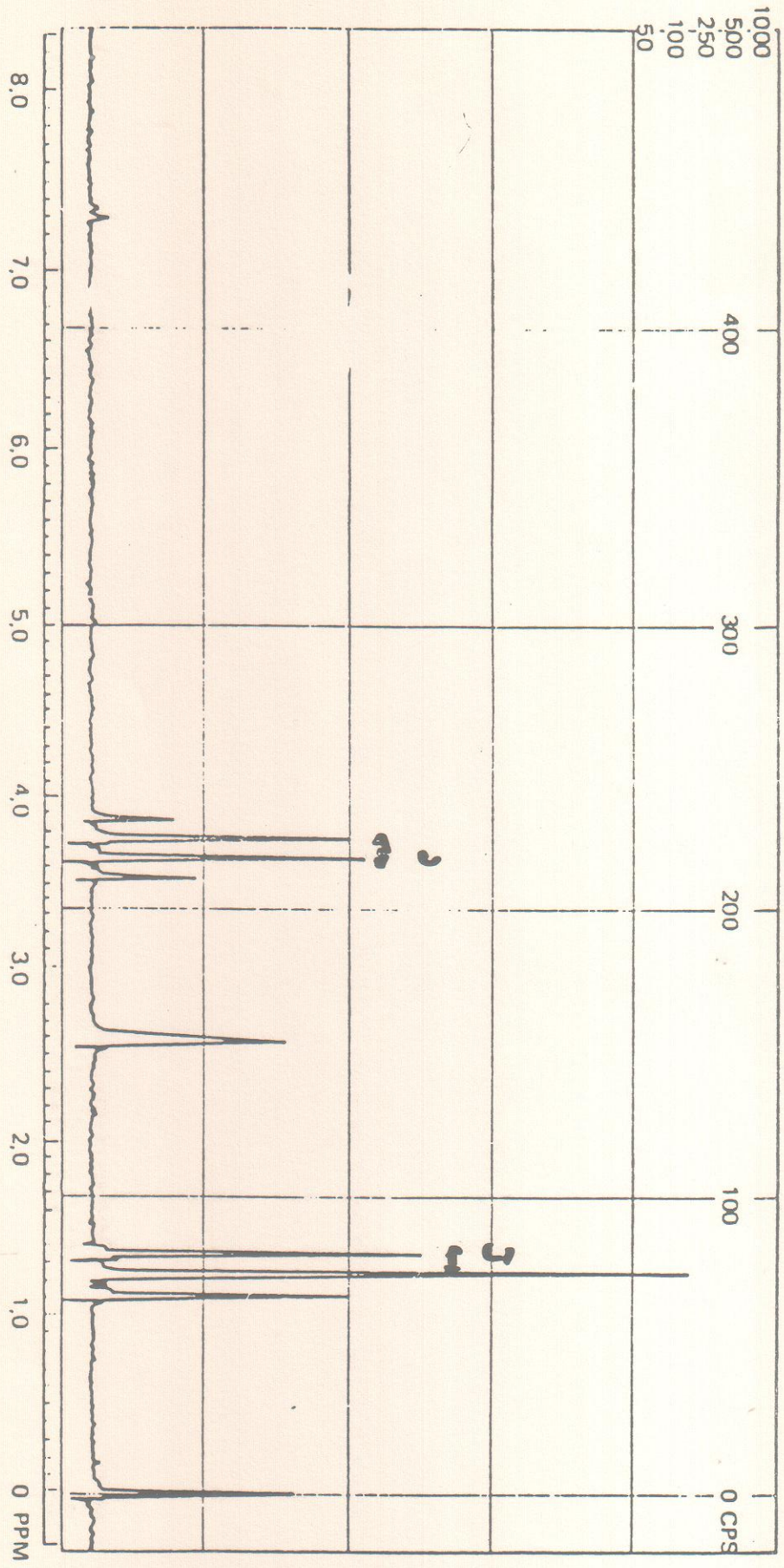
#### IV. APPLICATIONS

- Analyse qualitative structurale.  
Les méthodes par IR et RMN sont très complémentaires.
- Analyse quantitative négligeable.
- Une application en médecine est l'IRM (imagerie en résonance magnétique).

Schéma n°1

#### QUELQUES DÉPLACEMENTS CHIMIQUES EN RMN DU PROTON.

Groupement concerné	$\delta$
1) Protons portés par un carbone aliphatique	
$\text{CH}_3 - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array}$	0,80-1,20
$\begin{array}{c}   \\ - \text{C} - \text{CH}_2 \rightarrow \text{C} \\   \end{array}$	1,20-1,40
- $\text{CH}_2$ - cyclique	1,30-1,60
$\text{CH}_3 - \text{C} = \text{C} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array}$	1,60-2
$\text{CH}_3 - \text{Ar}$	2,10-2,50
$\text{CH}_3 - \text{C} - \begin{array}{c} \text{O} \\    \end{array}$	1,80-2,60
$\text{CH}_3 - \text{N} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array}$	2,20-3,30
$\text{CH}_3 - \text{O} -$	3,30-4
$\begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{C} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{CH}_2 - \text{O} -$	3,60-4,40
$\text{CH} - \text{O} -$	3,80-5,20
2) Protons portés par un carbone entrant dans une liaison multiple	
- $\text{C} \equiv \text{C} - \text{H}$	2,40-3,10
$\begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{C} = \text{CH}_2$	4,50-6
- $\text{CH} = \text{CH} -$	4,50-7,30
Ar - H	6,50-8
isoquinoléine 	1) 9-9,50; 3) 8-8,50; 4) 7-7,50
$\begin{array}{c} - \text{C} - \text{H} \\    \\ \text{O} \end{array}$	9,50-10
3) Protons portés par un hétéroatome	
R - OH	0-6
R - NH	0,5-4
Ar - OH	9-12
$\begin{array}{c} - \text{C} - \text{OH} \\    \\ \text{O} \end{array}$	9-12



Speetre de RMN du proton de l'ethanol.

## P L A N

### SPECTROMETRIE DE MASSE

#### I. PRINCIPE

#### II. APPAREILLAGE

##### 1. Appareil à impact électronique

- a) Chambre d'introduction
- b) Chambre d'ionisation
- c) Analyseur
- d) Collecteur - enregistreur

##### 2. Variantes

- a) De la chambre d'introduction
- d) De la chambre d'ionisation

- Ionisation chimique
- Désorption - ionisation

##### c) Des analyseurs

#### III. LE SPECTRE

- 1. Aspect général
- 2. L'ion moléculaire

- a) Mesure en basse résolution
- b) Mesure en haute résolution

- 3. Les ions fragments
- 4. Les amas isotopiques

#### IV. APPLICATIONS

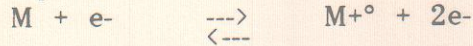
## SPECTROMETRIE DE MASSE

### I. PRINCIPE :

#### 1. Bombardement des molécules à étudier par des e-

- Sous-vide.
- A l'état gazeux.

Il se produit la formation d'un ion moléculaire.



Pour perdre l'énergie qu'il a accumulé, l'ion moléculaire va se fragmenter :

- en ions positifs,
- en ions négatifs,
- en nouvelles molécules.

#### 2. Accélération des ions formés :

- Ils sont dirigés dans un champ; seuls les ions positifs sont accélérés.

#### 3. Déviation de leur trajectoire dans un champ magnétique ou électrique

Il se produit une séparation en fonction de m/e

m = masse de l'ion,  
e = charge de l'ion.

#### 4. On mesure la déviation de la trajectoire, ce qui nous permet de déterminer m/e et par suite m.

### II. APPAREILLAGE :

#### 1. Appareil à impact électronique (le plus classique)

##### a) Chambre d'introduction

C'est une enceinte où on réalise un vide important. On injecte les composés à étudier sous forme de vapeur, liquide ou solide.

On chauffe cette chambre de manière à obtenir des vapeurs du composé à analyser.

##### b) Chambre d'ionisation

A ce niveau la pression est plus faible que dans le compartiment précédent, ce qui implique le passage des molécules.

Cette chambre joue différents rôles.

##### --> Source de production d'ions :

Les molécules passent entre deux électrodes auxquelles on applique une ddp importante; elles vont produire un flux d'électrons qui va bombarder les molécules. Des ions moléculaires se forment.

##### --> Répulseur :

C'est une plaque métallique dont le potentiel est légèrement positif : les ions négatifs sont attirés et les ions positifs repoussés de sorte que l'on ne retrouve dans la chambre que des ions positifs.

--> Accélérateur :

Ces ions positifs sont accélérés par passage à travers une série d'électrodes. Ils acquièrent une certaine vitesse de valeur :

$$V.e = \frac{1}{2} m v^2$$

V = ddp appliquée entre deux électrodes

e = charge de l'ion

m = masse de l'ion

v = vitesse

c) Analyseur

Il s'agit d'un tube cylindrique présentant une certaine courbure. Il est placé à l'intérieur d'un électroaimant.

La pression est encore plus faible que dans la chambre précédente, de manière à induire le déplacement des ions positifs.

Le champ magnétique va dévier la trajectoire des ions. Le rayon r de la trajectoire est relié à m et e par la relation

$$H \cdot e \cdot r = \frac{m v^2}{r}$$

$$\frac{m}{e} = \frac{H^2 \cdot r^2}{2V}$$

H = champ de l'électroaimant

r = rayon de courbure de la déviation

V = champ de cette expression.

On a une séparation des ions en fonction de m/e. L'appareil réalise un balayage de champ ce qui permet de collecter tous les ions, même de m/e différente.

d) Collecteur - enregistreur

Les ions positifs arrivent au niveau du collecteur où le signal est amplifié. On enregistre le courant.

2. Variantes

a) De la chambre d'introduction :

. On peut avoir un couplage d'un chromatographe en phase gazeuse et d'un spectromètre de masse (CG - MS) : c'est-à-dire que la colonne est directement reliée au spectromètre.

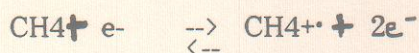
. On peut avoir un couplage d'un chromatographe liquide haute performance avec un spectromètre de masse (CLHP - MS).

Il faut éliminer la phase liquide avant d'effectuer le couplage de la colonne au MS.

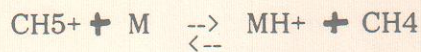
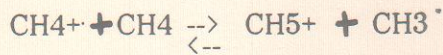
b) De la chambre d'ionisation

. Ionisation chimique

On bombarde les molécules à étudier par des ions issus de petites molécules (NH<sub>3</sub>, CH<sub>4</sub>...)







On introduit les gaz  $\text{NH}_3$  ou  $\text{CH}_4$  dans la chambre d'ionisation. Ils sont bombardés par les  $e^-$ . Ce sont les ions  $\text{CH}_5^+$ , obtenus après impact électronique qui vont servir à l'étude de la molécule. On recueille les ions  $\text{MCH}_4^+$  au niveau du collecteur.

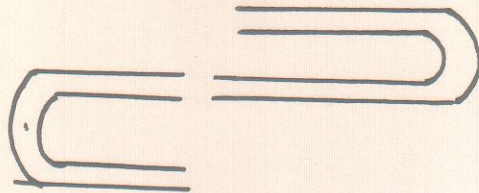
On utilise cette ionisation chimique, car en impact électronique, on a tendance à casser les molécules (travail à  $-70 \text{ eV}$ ); ici la méthode est plus douce et permet d'obtenir facilement l'ion moléculaire.

### Désorption / ionisation

Le bombardement s'effectue avec des atomes lourds de gaz rares (Xe-Ar).

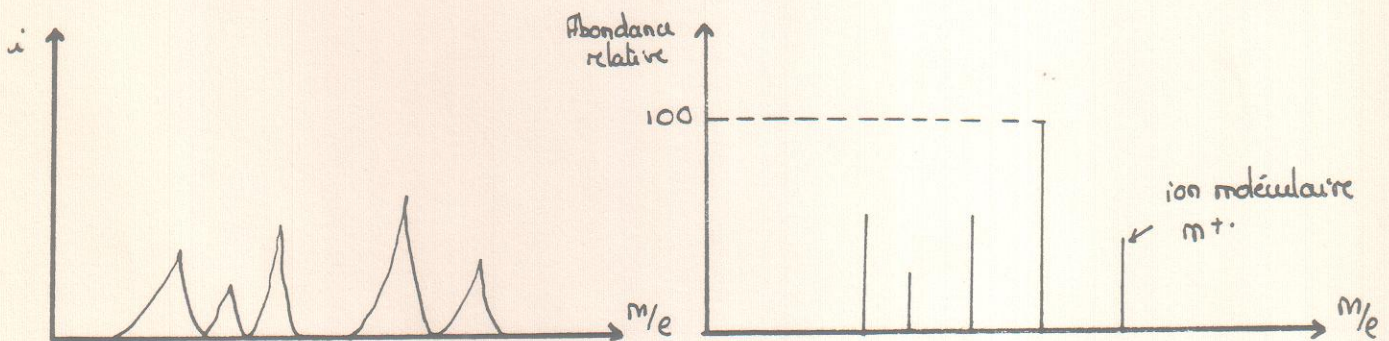
### c) Des analyseurs

Il existe des appareils à double focalisation; c'est-à-dire qu'à la sortie du premier analyseur, il y en a un second... ce qui permet d'être plus résolutif.



## III. LE SPECTRE:

### 1. Aspect général



L'appareil modifie le spectre de deux manières :

--> Il ne s'agit plus d'intensité mais d'abondance relative : l'appareil attribue la valeur 100 au pic le plus élevé. Pour les autres pics, il fait une règle de trois.

--> Il donne des raies et non plus des pics (car les ions arrivant au niveau du collecteur n'ont pas tous la même vitesse).

### 2. L'ion moléculaire

#### a) Mesure en basse résolution :

- L'ion moléculaire correspond au pic dont la valeur de  $m/e$  est la plus élevée. Il indique la masse moléculaire du composé ( $e$  ayant une valeur très faible).

28

- Soit le spectre du méthanol (Schéma n° 2)

. le pic dont la valeur de  $m/e$  est la plus élevée correspond à  $\text{CH}_3\text{OH}^+$  : il s'agit de l'ion moléculaire.

On peut déterminer la masse moléculaire de cet ion et donc de la molécule.

On lit  $MM = 32$  sur le spectre.

. Cet ion moléculaire possède une masse paire.

--> Les isotopes stables qui ont un nombre d'e- de valence impair ont un nombre de masse impair (vrai pour N).

--> Les isotopes stables qui ont un nombre d'e- de valence pair ont un nombre de masse pair, sauf l'azote.

	Valence	Nombre de masse	
O	2	16	
C	4	12	
H	1	1	
N	3	14	exaphon

L'ion moléculaire nous renseigne sur la présence ou non d'atomes d'azote.

### b) Mesure en haute résolution :

- Avec des appareils à double focalisation.

- Cette mesure permet de connaître la masse de la molécule avec une grande précision (4 chiffres après la virgule).

CO  $m = 27,994914$

N<sub>2</sub>  $m = 28,006146$

C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>  $m = 28,031299$

- Ceci permet la détermination de la formule brute d'un composé.

### 3. Lésions fragments

- Ils sont importants pour rechercher la véritable formule de la molécule.

- A partir des fragments recueillis on peut faire des hypothèses sur la fragmentation... chercher à reconstituer la molécule. (Il existe des règles de fragmentation).

Ex. : MM de 1 ==> H

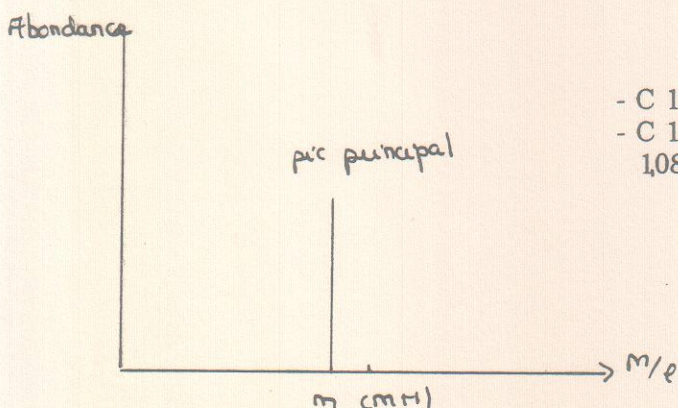
MM de 15 ==> CH<sub>3</sub>

### 4. Les amas isotopiques

La spectrométrie de masse permet la séparation des isotopes. On verra toujours l'isotope naturel le plus abondant.

12 CH <sub>2</sub> : 98,8 %	14 N : 99,62 %	35 Cl : 75 %	79 Br : 50 %
13 C : 1,2 %	15 N : 0,38 %	37 Cl : 25 %	81 Br : 50 %

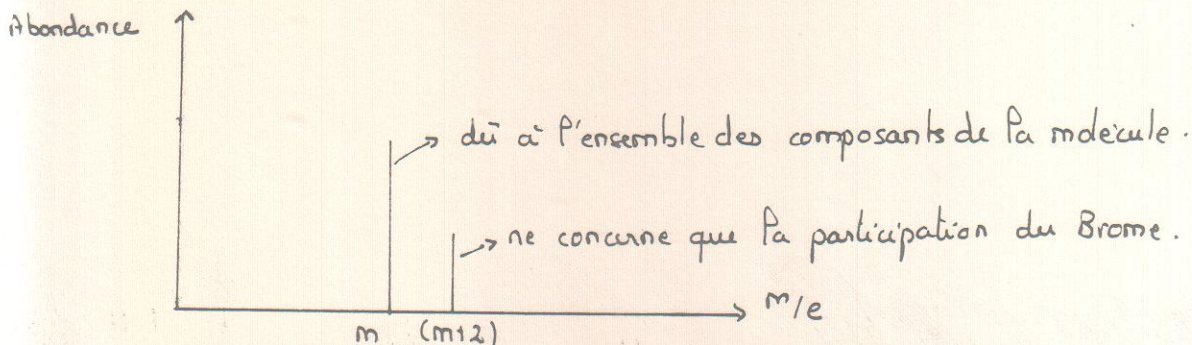
Prenons l'exemple du spectre du carbone :



- C 12 a une masse  $m$

- C 13 à une masse  $(m + 1)$  qui représente 1,08 % du pic principal

Pour le brome, on observera :



En faisant des analyses fines d'une drogue, on peut déterminer son origine géographique, car la composition en isotopes ne sera pas la même d'un pays à l'autre.

#### IV. APPLICATIONS

--> Identification d'un composé par rapport à un composé de référence ou par rapport à un catalogue de spectres (style La Redoute).

--> Détermination de la masse moléculaire.

--> Etablissement de la formule brute de la molécule (en spectrométrie de masse haute résolution) et de la structure moléculaire.

On utilise le catalogue qui nous donnera par exemple trois composés susceptibles de convenir. A partir des règles de fragmentation, on déterminera le composé le plus probable.

--> Dosage très spécifique d'un ion donné (on se place sur la valeur m/e d'un fragment), dans le cadre du couplage avec la chromatographie en phase gazeuse. On mesure l'intensité correspondant à m/e.

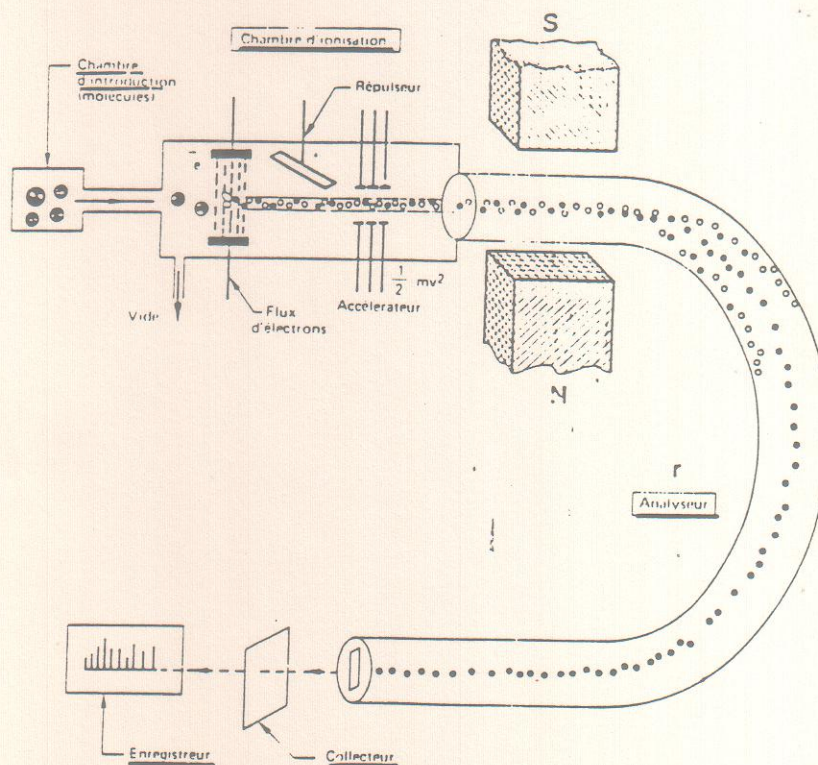
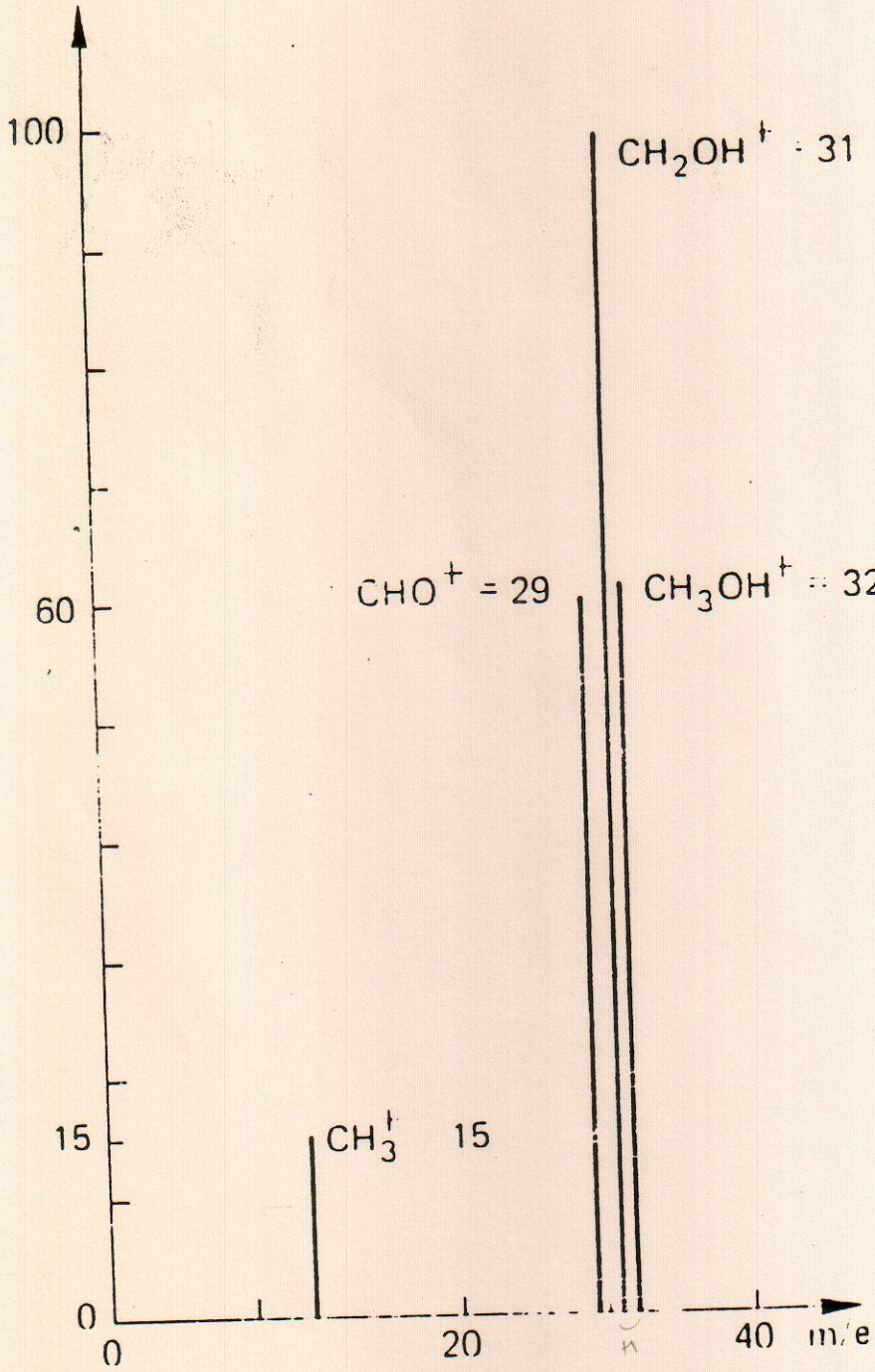


schéma n° 1

Abundance relative



## EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE

## I Généralités

1. Coefficient de partage.
2. Coefficient de distribution = rapport de distribution
3. Taux de distribution.
4. Rendement de l'extraction.

## II Méthodes.

1. Extraction simple.
  - a. Définitions
  - b. Rendement.
  - c. Mise en oeuvre.
2. Extractions répétées
  - a. principe
  - b. rendement.
  - c. optimisation
  - d. Mise en oeuvre.
3. Extraction à contre-courant.
  - a. principe.
  - b. rendement théorique
  - c. hauteur équivalente à un étage.
  - d. Mise en oeuvre.
4. Séparation à contre-courant.
  - a. principe.
  - b. séparation.
  - c. Mise en oeuvre.

## III Applications.

1. molécules simples
  - a. composés minéraux
  - b. composés organiques
  - c. acides et bases organiques
2. Extraction de chélates métalliques
  - a. principe
  - b. coefficient de distribution
  - c. Mise en oeuvre.

EXTRACTION LIQUIDE - LIQUIDE

I. GENERALITES

1. Coefficient de partage :

Dans un tube à essai on introduit un certain volume du solvant A avec un solvant B non miscible à A. On a dissout dans le solvant A une certaine quantité de soluté X. On mélange fortement. A l'équilibre, on constate qu'une certaine partie de X est passée dans B et qu'une autre est restée dans A.

- Le coefficient de partage :  $\lambda = \frac{C_B}{C_A}$  de la substance X (= K à l'équilibre).

Par convention :

Solvant A = eau

Solvant B = solvant organique.

-  $\lambda$  est constant → à une température donnée,  
→ pour des conditions idéales :

- non miscibilité absolue des deux solvants,
- pas d'interaction entre A, B et X,
- X doit être dans un même état physique.

- On parle de distribution régulière lorsqu'on a affaire aux conditions idéales précédentes.

- On peut aussi écrire,  $\lambda = \frac{S_B}{S_A}$  } solubilité de X dans les solvants A et B

- Loi de Berthelot-Jungfleisch.

Quelles que soient les valeurs de solubilité d'un corps à partager entre deux solvants non miscibles et quels que soient les volumes de ces solvants, le corps se répartit à l'équilibre de telle sorte que les concentrations soient en rapport constant.

2. Coefficient de distribution = rapport de distribution

Lorsque les conditions idéales ne sont pas remplies, on ne peut pas utiliser le coefficient de partage; on utilise alors le coefficient de distribution D :

$$D = \frac{\sum C_B}{\sum C_A}$$

$\sum C_B$  = somme des concentrations de toutes les formes du composé dans le solvant B

3. Taux de distribution

Il exprime la quantité de soluté X dans le solvant B sur la quantité de ce même soluté dans le solvant A.

$$\alpha = \frac{Q_B}{Q_A}$$

$$\alpha = \frac{C_B}{C_A} \times \frac{V_B}{V_A} = \lambda \frac{V_B}{V_A}$$

#### 4. Rendement de l'extraction

On cherche à déterminer le pourcentage de substance que l'on a extraite du solvant A par le solvant B.

$$\rho = \frac{\sum Q_B}{Q_{A_0}}$$

$Q_{A_0}$  = quantité initiale de X dans le solvant A

### II. METHODES

#### 1. Extraction simple

##### a) Définitions

- Extraction à un étage : on réalise une seule extraction.
- La couche extraite ou extrait correspondant à la couche de solvant B.
- La couche raffinée ou raffiné est celle qui contenait l'extrait (A).

##### b) Rendement

On cherche à l'exprimer en fonction de constantes comme  $\lambda$  ou  $\alpha$

$$\rho = \frac{Q_{B_1}}{Q_{A_0}}$$

$$\alpha = \frac{Q_{B_1}}{Q_{A_1}} = \lambda \frac{V_B}{V_A}$$

$$Q_{A_1} = \frac{Q_{B_1}}{\alpha}$$

$$Q_{A_0} = Q_{B_1} + Q_{A_1} \quad (\text{conservation de la matière au cours de l'extraction})$$

$$Q_{A_0} = Q_{B_1} + \frac{Q_{B_1}}{\alpha} = Q_{B_1} \left( 1 + \frac{1}{\alpha} \right)$$

$$Q_{B_1} = Q_{A_0} \frac{\alpha}{1 + \alpha}$$

$$\rho = \frac{\alpha}{1 + \alpha}$$

$$\alpha \quad Q_{A_0} = Q_{A_1} + \alpha Q_{A_1} = Q_{A_1} (1 + \alpha)$$

$$Q_{A_1} = \frac{Q_{A_0}}{1 + \alpha}$$

$$Q_{B_1} = Q_{A_0} - Q_{A_1}$$

$$\rho = \frac{Q_{A_0} - Q_{A_0}/(1 + \alpha)}{Q_{A_0}}$$

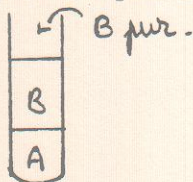
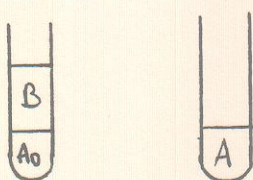
$$\rho = 1 - \frac{1}{1 + \alpha}$$

##### c) Mise en oeuvre

Dans une ampoule à décanter.

#### 2. Extractions répétées

Lorsqu'on fait une seule extraction, la quantité extraite est faible. On reprend le solvant A d'où le composé n'a pas totalement été extrait.



etc ...

a) Principe  
Cf schéma 1

Dans un premier tube on introduit la quantité  $Q_{A0}$  dans un solvant A de volume  $V_A$ .  
On recueille la première fraction extraite par le solvant B ( $V_{B1}$ ).  
Alors le solvant A restant contient une quantité  $Q_{A1}$  de substance à extraire. On ajoute B et on extrait  $Q_{B2}$  que l'on recueille.  
On répète l'opération plusieurs fois...le solvant A se retrouve avec une quantité  $Q_{An-1}$  de substance : le solvant B permet l'extraction d'une quantité  $Q_{Bn}$ . Il reste alors dans le solvant A une quantité  $Q_{An}$ .

b) Rendement

Etage	Quantité
1	$Q_{A0} = Q_{A1} + Q_{B1}$
2	$Q_{A1} = Q_{A2} + Q_{B2}$
3	$Q_{A2} = Q_{A3} + Q_{B3}$
n	$Q_{An-1} = Q_{An} + Q_{Bn}$

$$Q_{A0} = Q_{B1} + Q_{B2} + Q_{B3} \dots + Q_{Bn} + Q_{An}$$

$$= \sum Q_B + Q_{An}$$

$$\rho = \frac{\sum Q_B}{Q_{A0}}$$

$$\sum Q_B = Q_{A0} - Q_{An}$$

Mais à quoi est donc égal  $Q_{An}$  ?

$$\alpha_1 = \frac{Q_{B1}}{Q_{A1}} ; \quad \alpha_2 = \frac{Q_{B2}}{Q_{A2}} ; \quad \alpha_n = \frac{Q_{Bn}}{Q_{An}}$$

$$Q_{A1} = \frac{Q_{A0}}{1+\alpha_1} \quad \text{d'où } Q_{A1} = Q_{A0} - Q_{B1}$$

$$= Q_{A0} - \alpha_1 Q_{A1}$$

$$Q_{A2} = \frac{Q_{A1}}{1+\alpha_2} = \frac{Q_{A0}}{(1+\alpha_1)(1+\alpha_2)} = \frac{Q_{A0}}{1+\alpha_1}$$

$$Q_{A3} = \frac{Q_{A2}}{1+\alpha_3} = \frac{Q_{A0}}{(1+\alpha_1)(1+\alpha_2)(1+\alpha_3)}$$

$$Q_{An} = \frac{Q_{A0}}{(1+\alpha_1)(1+\alpha_2) \dots (1+\alpha_n)}$$

$$\sum Q_B = Q_{A0} - Q_{An} = Q_{A0} \left[ 1 - \frac{1}{(1+\alpha_1)(1+\alpha_2) \dots (1+\alpha_n)} \right]$$

$$\rho = 1 - \frac{1}{(1+\alpha_1)(1+\alpha_2) \dots (1+\alpha_n)}$$

Si  $V_{B1} = V_{B2} = \dots = V_{Bn}$

$$\rho = 1 - \frac{1}{(1+\alpha)^n} = 1 - \frac{1}{\left(1 + \lambda \frac{V_B}{V_A}\right)^n} \quad V_B = \text{volume utilisé à chaque étage.}$$



c) Optimisation de l'extraction

$$V_B = n v_B$$

$$\alpha = \lambda \frac{v_B}{V_A}$$

$$v_B = \frac{V_B}{n}$$

$V_B$  = volume total de solvant B utilisé au cours des différents étages.  
 $v_B$  = volume utilisé à chaque étage.

$$\alpha = \frac{\lambda}{n} \frac{V_B}{V_A}$$

$$\rho = 1 - \frac{1}{\left(1 + \frac{\lambda}{n} \frac{V_B}{V_A}\right)^n}$$

$$1 - \rho = \frac{1}{\left(1 + \frac{\lambda}{n} \frac{V_B}{V_A}\right)^n}$$

$$\log(1 - \rho) = \underbrace{-n}_{(-)} \log\left(1 + \frac{\lambda}{n} \frac{V_B}{V_A}\right)$$

NB: le rendement est exprimé

1er cas : le nombre d'étages est fixé et on représente  $\log(1 - \rho) = f(V_B)$   
 On obtient des droites de pente -n.

2ème cas : on fixe le volume  $V_B$  et on représente  $\log(1 - \rho) = f(n)$   
 On obtient des courbes pour  $\frac{V_B}{V_A}$  donné.

==> Détermination de  $\rho$

Si  $V_B = 10\text{ml}$  }  $\frac{V_B}{V_A} = 10$  si je veux  $\rho = 98\%$  il faut au moins 2 étages.  
 $V_A = 1\text{ml}$  }  $V_A$

d) Mise en oeuvre

Utilisation d'une série d'ampoules à décanter.

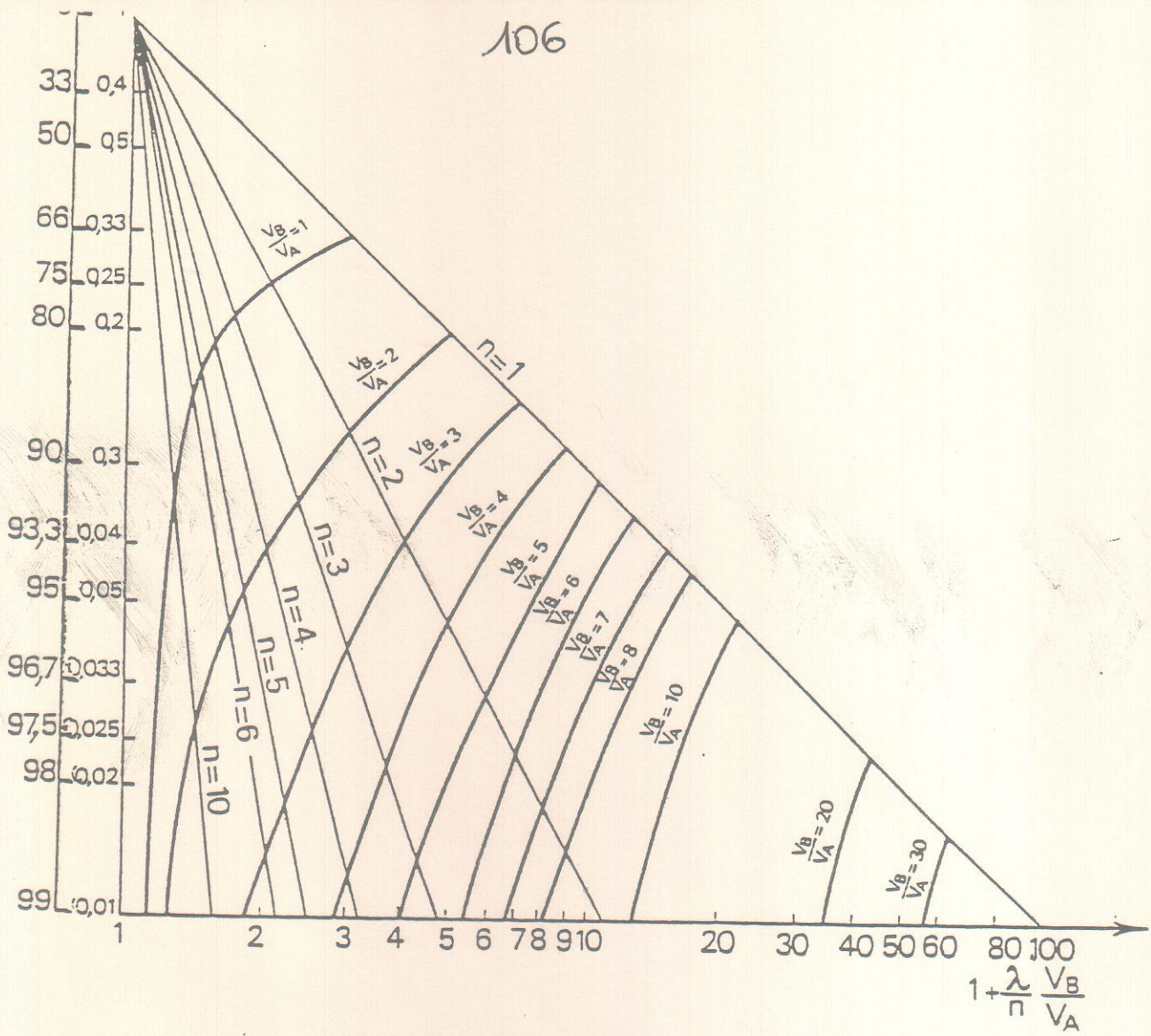


Figure 1

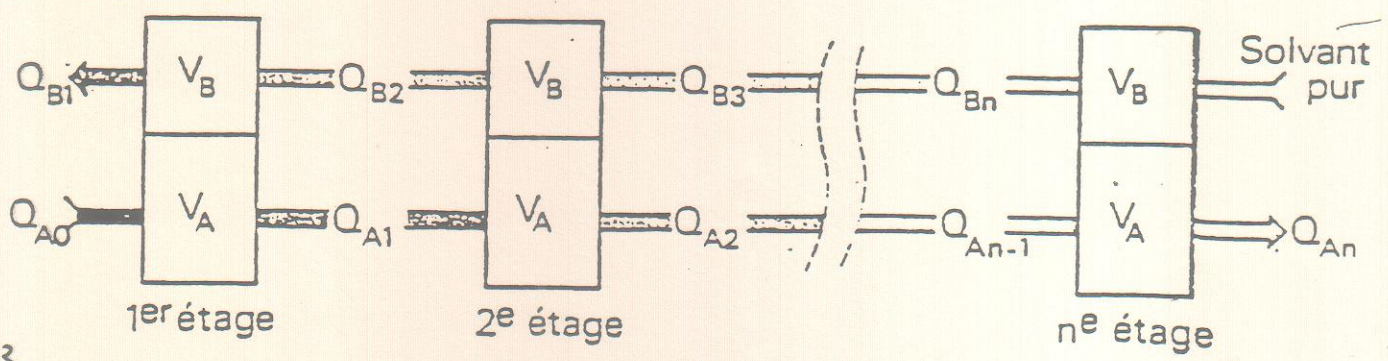
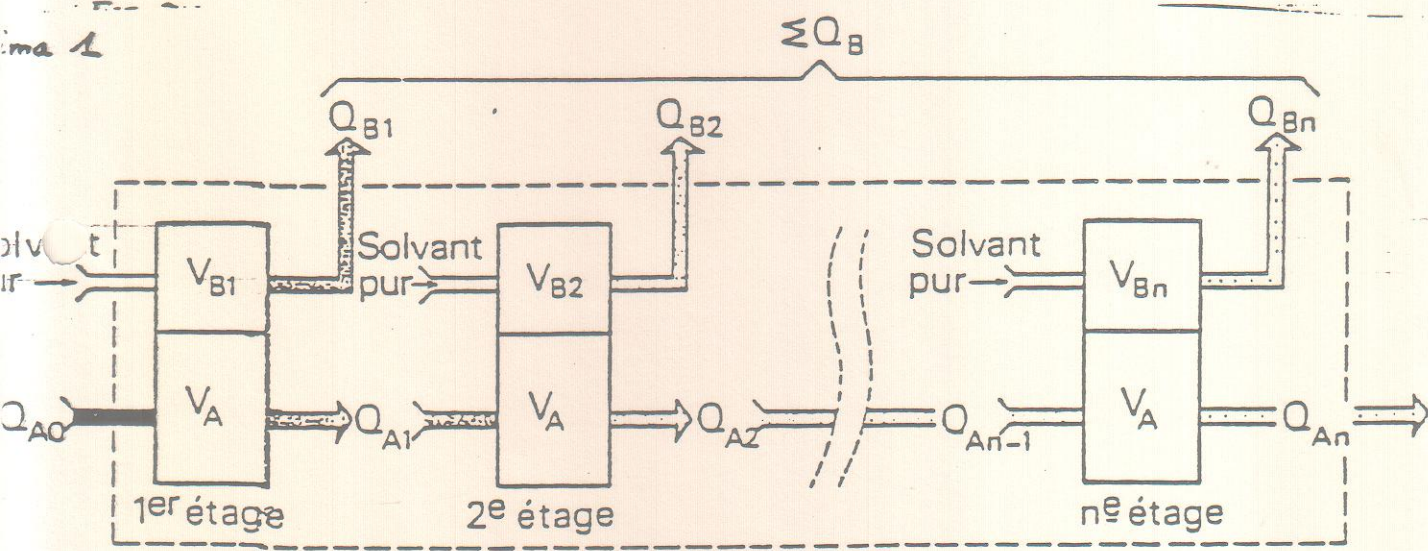
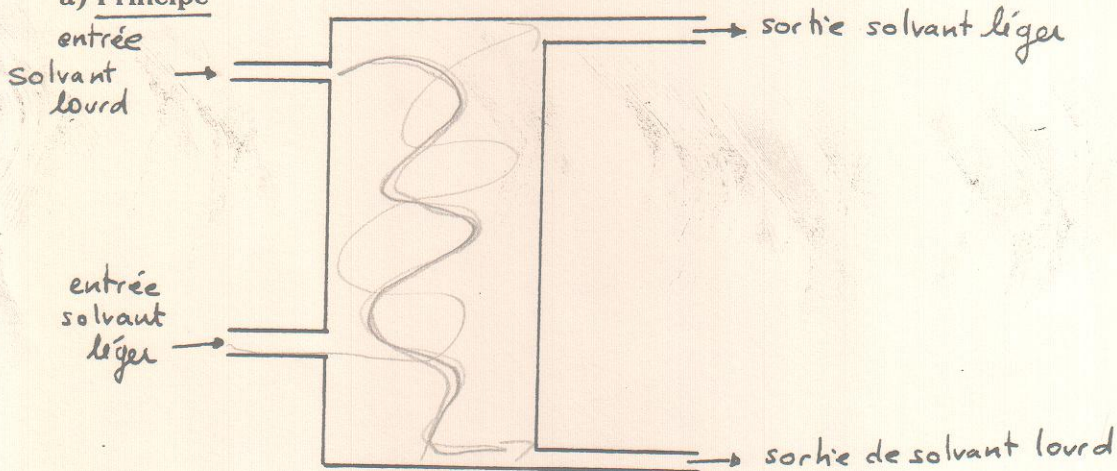


Figure 3

### 3. Extraction à contre-courant

#### a) Principe

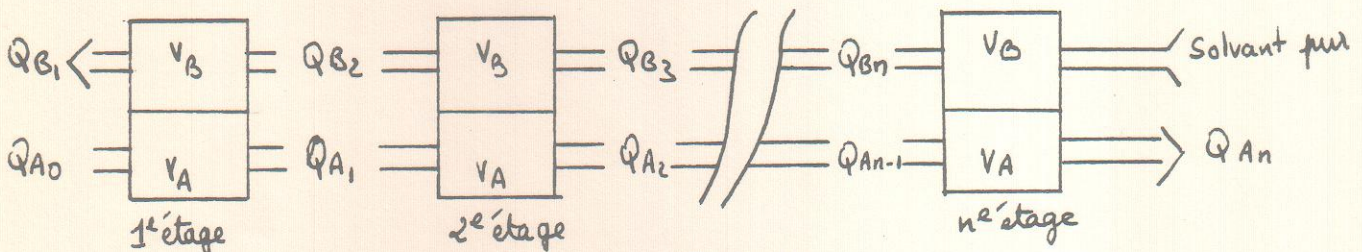


Le solvant léger va avoir tendance à monter dans la colonne, l'autre solvant descendra au contraire. Un système permet un brassage intense des deux solvants : on procède effectivement à une extraction.

#### • Schéma de fonctionnement :

La colonne fonctionne comme si elle était découpée en plusieurs étages au niveau desquels il y a extraction : on a une suite discontinue d'extractions répétées, qui fonctionnent à contre courant.

QA0 est introduite à un 1er étage imaginaire,  
QA1 est introduite dans un 2ème étage imaginaire,  
QA2  
QAn est introduite dans un n<sup>ième</sup> étage imaginaire.  
Le solvant pur au n<sup>ième</sup> étage extrait de QAn-1 une quantité QBn  
....  
QB3 extrait une quantité de QA1 donnant QB2.  
QB2 extrait une quantité de QA0 donnant QB1.



#### • Hauteur équivalente à un étage théorique (définition)

Pour une colonne donnée, on calcule facilement le rendement (on connaît les quantités qui sortent et qui rentrent). Cette colonne équivaut à un certain nombre d'étages théoriques : on les détermine de telle sorte qu'ils correspondent au rendement trouvé.

$$\rho = \frac{QB1}{QA0} \text{ et calcul de } n \text{ de manière théorique}$$

La hauteur équivalente à un étage théorique HEET est :

$$HEET = \frac{l}{n} \quad (l = \text{longueur de la colonne})$$

**b) Rendement théorique**

$$\rightarrow \lambda = \frac{CB1}{CA1} = \frac{CB2}{CA2} = \dots = \frac{CBn}{CAN}$$

VB et VA sont considérés comme identiques dans toute la suite des opérations :

$$\alpha = \lambda \frac{VB}{VA} = \frac{QB1}{QA1} = \frac{QB2}{QA2} = \dots = \frac{QBn}{QAn}$$

$\rightarrow \frac{QA0 + QB2}{\text{ce qui rentre au 1er étage}} = \frac{QA1 + QB1}{\text{ce qui sort au 1er ét.}}$  rien ne se perd

$$QA1 + QB2 = QA2 + QB2$$

$$QAn-1 = QAn + QBn$$

$$QA0 = QAn + QB1$$

NB : La démonstration n'est pas à connaître.

$$\rightarrow \rho = \frac{QB1}{QA0} = 1 - \frac{\alpha - 1}{\alpha^{n+1} - 1} = \frac{\alpha^{n+1} - \alpha + 1}{\alpha^{n+1} - 1}$$

**c) Hauteur équivalente à un étage :**

$$\rho = \frac{\alpha^{n+1} - \alpha}{\alpha^{n+1} - 1}$$

$$\rho(\alpha^{n+1} - 1) = \alpha^{n+1} - \alpha$$

$$\alpha^{n+1}(\rho - 1) = \rho - \alpha$$

$$(n+1) \log \alpha = \log(\rho - \alpha) - \log(\rho - 1)$$

$$n = \frac{\log(\rho - \alpha) - \log(\rho - 1)}{\log \alpha} - 1$$

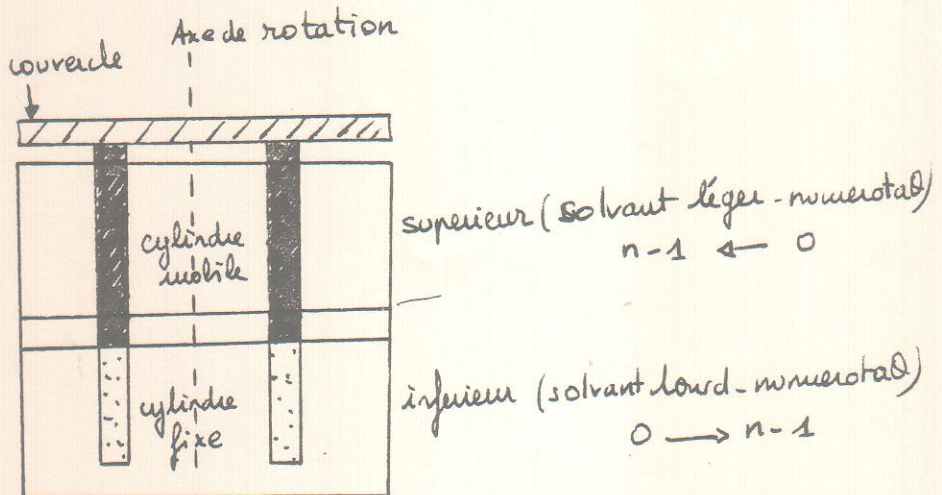
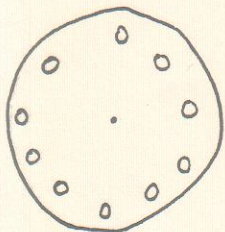
$$H_{EET} = \frac{l}{n}$$

**d) Mise en oeuvre**

- Colonne avec des entrées et sorties en haut et en bas (de quelques cm de hauteur).
- Ce système est utilisé en industrie.

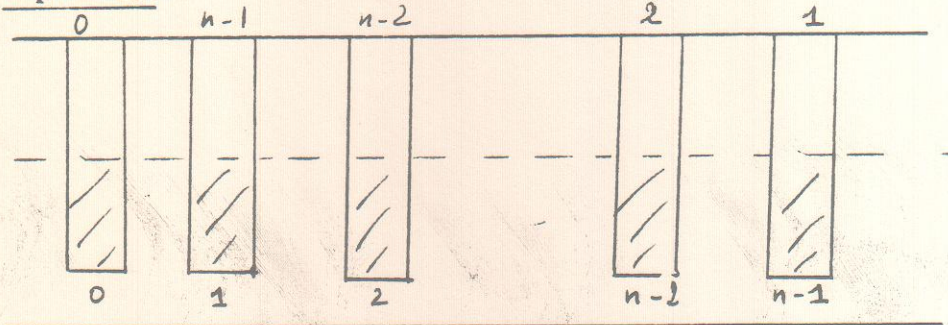
**4. Séparation à contre-courant**

**a) Principe**



- Vu d'en haut, l'appareillage forme un disque percé de cavités.
  - L'appareil est constitué de deux blocs :
    - un bloc inférieur fixe présentant des tubes de volume identique,
    - un bloc supérieure mobile dont les cavités viennent se superposer au cylindre fixe.
- La numérotation se fait en sens inverse dans les cylindres inf. (0 → n-1) et sup. (n-1 ← 0).

### b) Séparation :



- Dans le tube 0 du cylindre fixe, on place le solvant lourd contenant les substances à séparer.
  - On remplit de solvant lourd pur (c'est-à-dire sans le composé dissout) tous les autres tubes du cylindre fixe.
  - On place le cylindre mobile sur le cylindre fixe et on remplit toutes ses cavités du solvant le plus léger.
  - On réalise alors une agitation. Lorsque l'équilibre est atteint, c'est-à-dire qu'il y a eu décortication, on provoque la rotation du cylindre mobile de manière à ce que le tube supérieur 0 soit au-dessus du tube inférieur 1.
- Ainsi, le tube 1 du cylindre fixe qui contient du solvant lourd pur se trouve en contact d'un tube contenant du solvant léger qui a déjà été extrait.

- Si l'on considère que l'on a :
  - . un seul composé X,
  - . une distribution régulière,
  - . pas d'interaction soluté-solvant.

Le coefficient de partage est :  $\lambda = \frac{C_m}{C_s}$

$C_m$  : concentration de x dans le solvant léger (c. mobile)

$C_s$  : concentration de x dans le solvant lourd (c. fixe)

$$Q = \Sigma Q_m + \Sigma Q_s$$

$Q$  : quantité du composé de départ

$\Sigma Q_m$  : somme des quantités de chacun des tubes de la partie mobile

$\Sigma Q_s$  : somme des quantités de chacun des tubes de la partie fixe.

- On distingue 3 étapes dans cette séparation à contre courant :

Agitation / Décantation / Rotation d'un cran

→ 1ère opération (Cf schéma No 5)

x se répartit selon le coefficient de partage entre les deux phases.

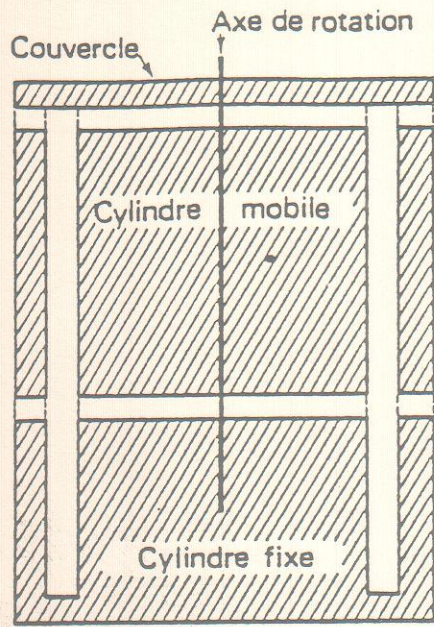
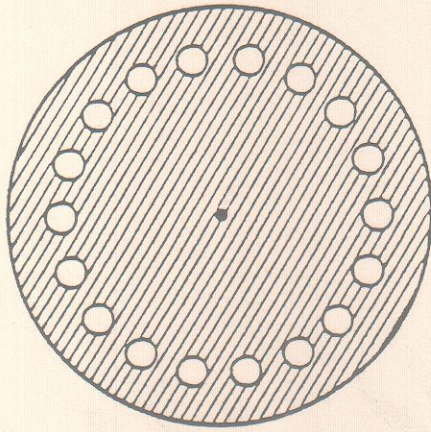
On aura  $Q_m$  dans la phase mobile supérieure et  $Q_s$  dans la phase stationnaire inférieure.

$$\begin{aligned} Q &= Q_m + Q_s & \text{si } Z = 0,6 & \quad Q_m = 0,6 Q \\ Q_m &= ZQ & \text{ex. et } Y = 0,4 & \quad Q_s = 0,4 Q \\ Q_s &= YQ & & \quad Q_m + Q_s = Q \end{aligned}$$

$$Q = (Y + Z) Q \quad \text{et} \quad Y + Z = 1$$

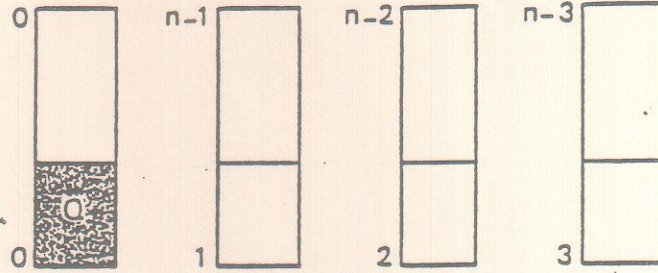
$$\alpha = \frac{Q_m}{Q_s} = \frac{ZQ}{YQ} \quad \text{soit} \quad Z = \alpha Y.$$

$$\alpha Y + Y = 1 \quad \text{soit} \quad Y = \frac{1}{1+\alpha} \quad \text{et} \quad Z = \frac{\alpha}{1+\alpha}$$

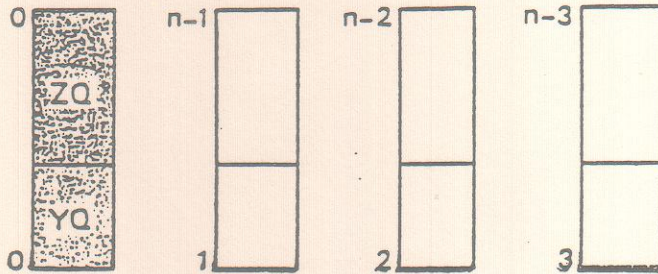


1ère opération

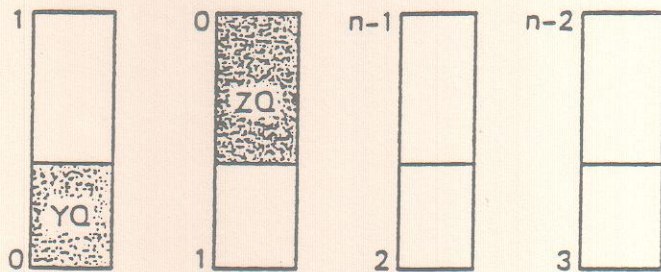
Etat initial



Agitation et équilibre



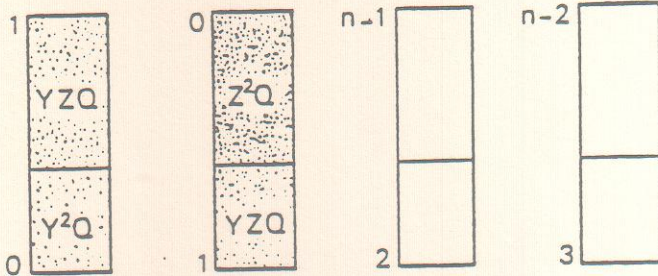
Rotation



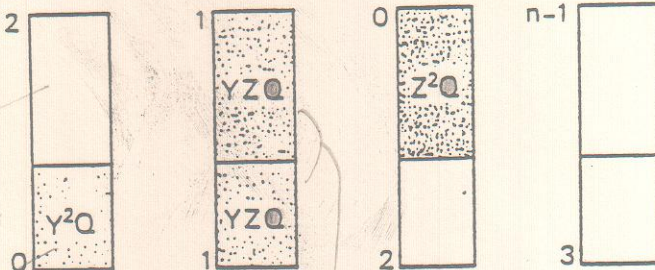
11

2ème opération

Agitation et équilibre



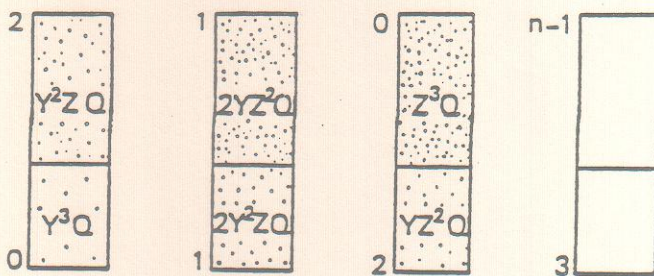
Rotation



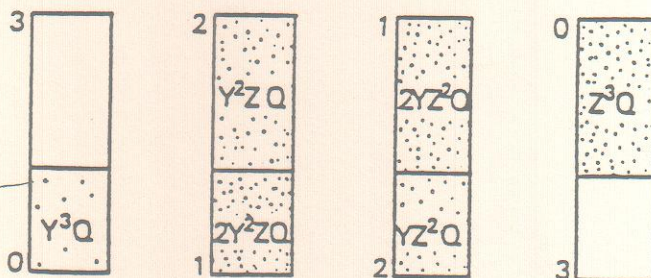
*Handwritten notes:*  
 $YZQ \times 2$   
 $\rightarrow 2YZQ$   
 $2YZQ$

3ème opération

Agitation et équilibre

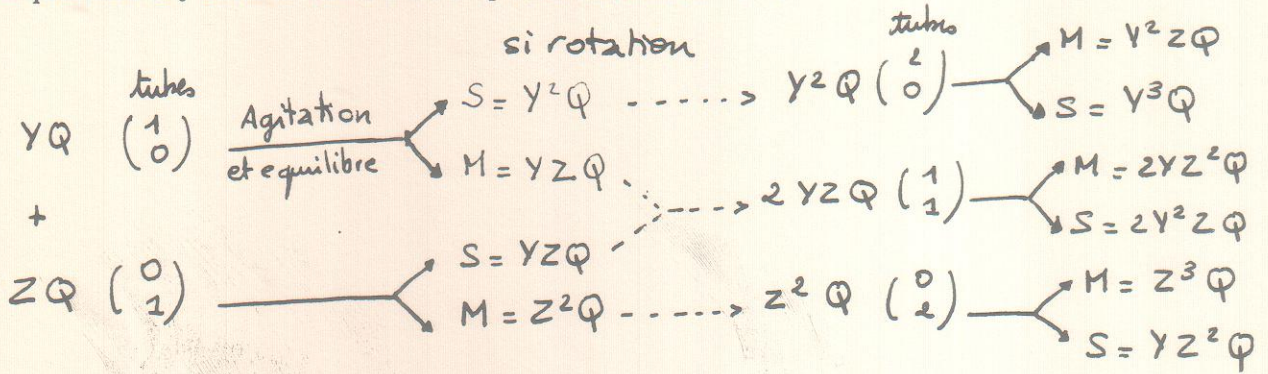


Rotation



→ 2ème opération :

Il y a une répartition des phases en proportion de Y et Z; on trouve :  
 . une quantité YQ dans le tube 0 de la partie inférieure } suite à la première  
 . une quantité ZQ dans le tube 0 de la partie supérieure } opération



Q = (Y + Z) Q      ⇒      Q = (Y + Z)<sup>2</sup>Q      ⇒      Q = (Y + Z)<sup>3</sup>Q  
 fin de 1ère opération      fin seconde opération      fin 3ème opération

En fin de 2ème opération, on a :

Q = Y<sup>2</sup> Q + 2 Y Z Q + Z<sup>2</sup>Q  
 Q = Q (Y + Z)<sup>2</sup>

→ 3ème opération :

Q = Y<sup>3</sup> Q + 3 Y<sup>2</sup> ZQ + 3 Y Z<sup>2</sup> Q + Z<sup>3</sup>Q  
 Q = Q (Y + Z)<sup>3</sup>

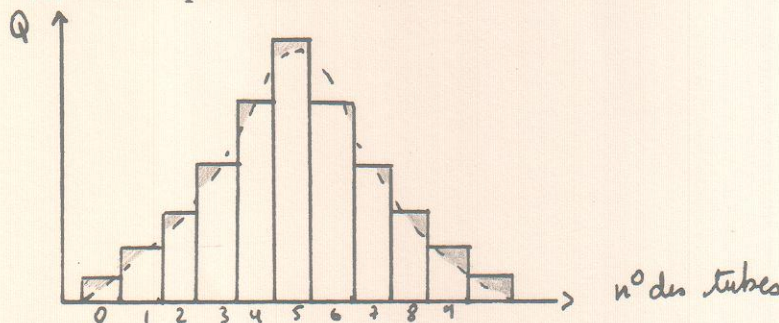
→ Nième opération :

Q = Y<sup>n</sup> Q + n Y<sup>n-1</sup> ZQ + ... + n Y Z<sup>n-1</sup> Q + Z<sup>n</sup> Q

Q = Q (Y + Z)<sup>n</sup>

→ Conclusions :

- On a une répartition binomiale :

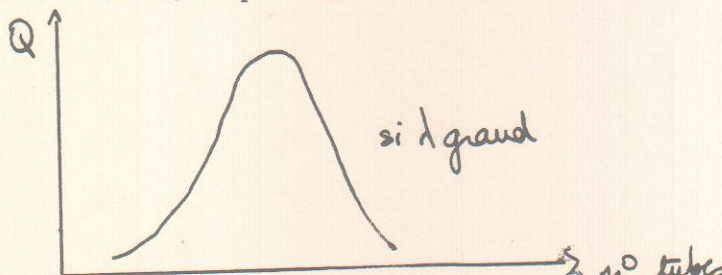


. Chaque colonne (tube sup. + inf.) contient une fraction de la quantité initiale égale à QT (T = terme d'expansion du binôme (Y + Z)<sup>n</sup>).

. La colonne contenant la concentration maximale a pour valeur (n Y).

Si par exemple on a 100 tubes, cette colonne sera la colonne 40 avec Y = 0,4.

. Cette courbe peut être apparentée à une courbe de Gauss. Si le coefficient de partage a une valeur très élevés, les premiers tubes contiendront peu de substance.



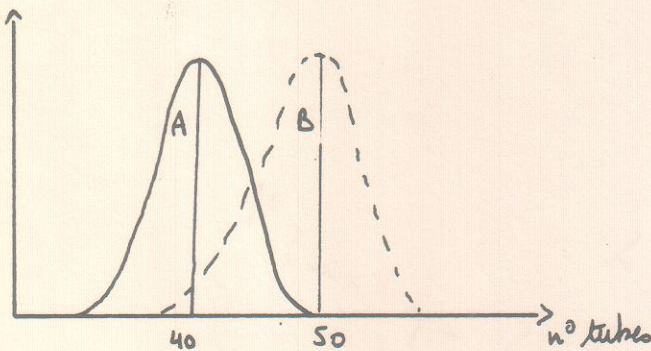


- Séparation des solutés :

$$\rho = \left( \frac{1}{1+\alpha} + \frac{\alpha}{1+\alpha} \right)^n Q$$

$$\rho = \left[ \frac{1}{1 + \lambda \frac{V_M}{V_S}} + \frac{\lambda \frac{V_M}{V_S}}{1 + \lambda \frac{V_M}{V_S}} \right]^n Q$$

Il y a séparation des solutés si leurs coefficients de partage sont différents.



Pour  $n = 100$  tubes

$$\text{composé A : } \lambda_A = \frac{Z}{Y} = \frac{0,6}{0,4} = \frac{3}{2}$$

$$\text{composé B : } \lambda_B = \frac{Z}{Y} = \frac{0,5}{0,5} = 1$$

$\Rightarrow$  conc. max. dans le tube 50

c) Mise en oeuvre :

Appareil de CRAIG (est de moins en moins utilisé).

### III. APPLICATIONS

#### 1. Molécules simples

a) Composés minéraux : Ils ont souvent un caractère ionique. Ils ne sont alors pas extractibles par des solvants organiques. Toutefois, on peut extraire :

- $\rightarrow$  des halogène : iode - brôme,
- $\rightarrow$  un certain nombre d'halogénures : chlorure mercurique.

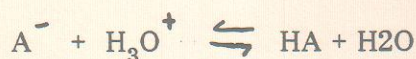
b) Composés organiques : Ils possèdent une chaîne carbonée et ont plus facilement tendance à dissoudre dans les solvants organiques.

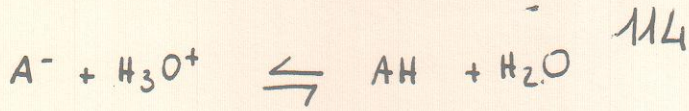
- $\rightarrow$  la solubilité augmente avec la chaîne carbonée,
- $\rightarrow$  la présence d'hétéro atomes contribue à diminuer le coef. de partage, donc la solubilité dans ces solvants organiques,
- $\rightarrow$  par contre, l'introduction d'un halogène augmente la solubilité dans ces mêmes solvants.

c) Acides et bases organiques :

Sous certaines conditions de pH, les acides ou bases organiques sont solubles dans l'eau ou dans des solvants organiques.

$\rightarrow$  Cas des acides :





$$K_a = \frac{|A^-| |H^+|}{|AH|}$$

$$D = \frac{|HA|_{org}}{|HA|_{aq} + |A^-|}$$

$$\lambda = \frac{|HA|_{org}}{|HA|_{aq}} \quad (\text{coefficient de partage})$$

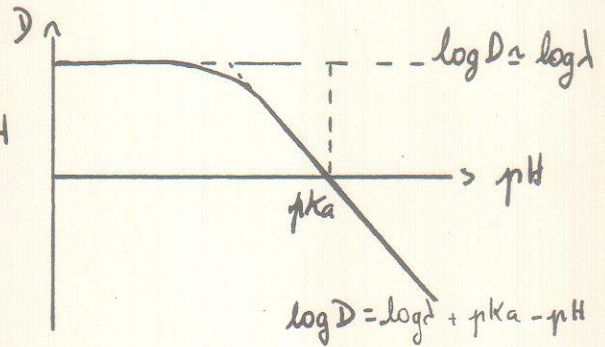
$$D = \frac{|HA|_{org}}{|HA|_{aq} \left(1 + \frac{K_a}{|H^+|}\right)}$$

$$D = \frac{\lambda}{1 + \frac{K_a}{|H^+|}} \quad (\text{coefficient de distribution})$$

$$\log D = \log \lambda - \log \left(1 + \frac{K_a}{|H^+|}\right)$$

• si pH ↓  $\log D \approx \log \lambda$

• si pH ↑  $\log D \approx \log \lambda + pK_a - pH$

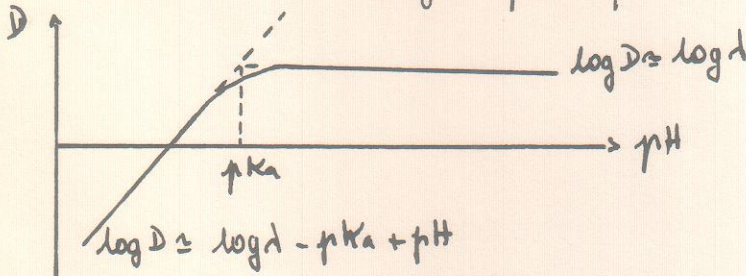


→ Cas des bases :

$$\log D = \log \lambda - \log \left(1 + \frac{|H^+|}{K_a}\right)$$

• si pH augmente  $\log D \approx \log \lambda$

• si pH baisse  $\log D \approx \log \lambda - pK_a + pH$



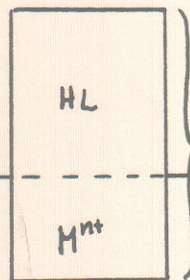
## 2. Extraction des chelates metalliques :

### a) Principe :

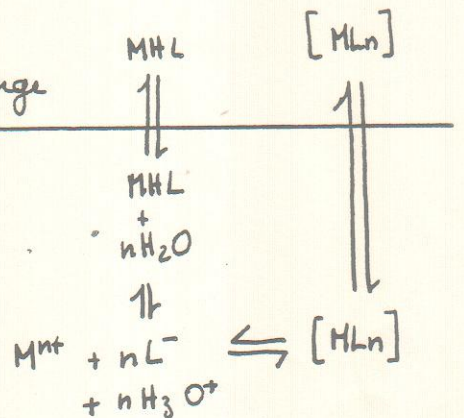
On cherche à réaliser un complexe qui sera soluble dans la phase organique.

solvant organique  
(contenant l'agent chelatant)  
ce sont souvent des acides "HL"  
ex: EDTA

Phase aqueuse (H<sub>2</sub>O)



⇒ Mélange



b) Coefficient de distribution :

$$D = \frac{[ML_n]_{org}}{[ML_n]_{aq} + [M^{n+}]_{aq}}$$

• Equilibres

$$\lambda_H = \frac{[HL]_{org}}{[HL]_{aq}}$$

$$K_a = \frac{[L^-] \times [H^+]}{[HL]_{aq}}$$

$$[L^-] = \frac{K_a \times [HL]_{aq}}{[H^+]}$$

$$[HL]_{aq} = \frac{c}{\lambda_H} \text{ avec } c = [HL]_{org}$$

$$\lambda_H = \frac{[ML_n]_{org}}{[ML_n]_{aq}}$$

$$K_s = \frac{[ML_n]_{aq}}{[M^{n+}] [L^-]_{aq}^n}$$

$$[ML_n]_{org} = \lambda_H \times [ML_n]_{aq}$$

$$[M^{n+}] = \frac{[ML_n]_{aq}}{K_s \times [L^-]_{aq}^n}$$

$$D = \frac{\lambda_H \times [ML_n]_{aq}}{[ML_n]_{aq} + \frac{[ML_n]_{aq}}{K_s \times \left(\frac{c - K_a}{\lambda_H \times [H^+]}\right)^n}} = \frac{\lambda_H}{1 + \frac{\lambda_H^n (H^+)^n}{K_s \times K_a^n c^n}}$$

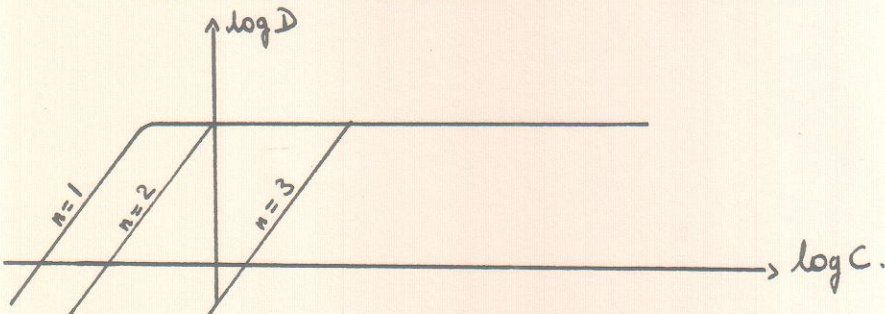
NB : Ceci n'est pas à savoir par coeur !

Ici encore se pose le problème du pH; en modifiant c et (H+) on fera varier D. ( $\lambda_M, \lambda_H, K_s$  et  $K_a$  sont constantes).

- $\lambda_M$  = coefficient de partage du complexe
- $\lambda_H$  = coefficient de partage de HL
- $K_s$  = cte de formation du complexe
- $K_a$  = cte d'acidité de l'agent complexant
- c = concentration de l'agent complexant.

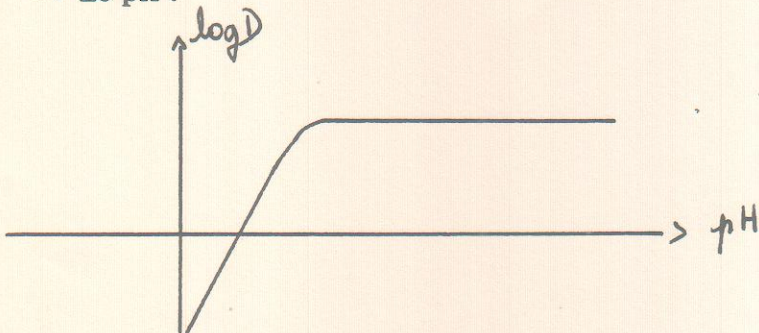
• Facteurs d'influence : (pour un système métal, chélateur et solvant)

--> Concentration du chélateur :



n : nombre de molécules de ligand liées à l'atome métallique.

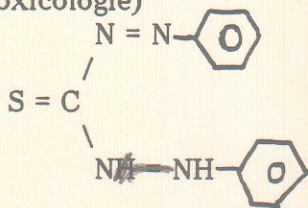
--> Le pH :



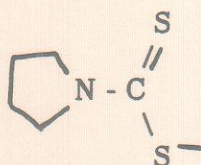
c) Mise en oeuvre :

## • Agents chélatants les plus utilisés

- Dithizone (Diphénylthio carbazone) : pour les métaux lourds comme le plomb (utilisé en toxicologie)



- Pyrrolidine dithiocarbamate



• Solvants : =  $\text{CHCl}_3$  ;  $\text{CCl}_4$  ; cétones

## CHROMATOGRAPHIES - GÉNÉRALITES.

## I Définition - Principe.

## II. Classification.

1. Nature des phases.
2. Nature des phénomènes physico-chimiques.
3. Technologie.
4. Procédés de développement

## III Théorie des plateaux.

1. Répartition des solutés
2. Principe
3. Distribution du soluté dans la colonne.
4. Distribution en sortie de colonne.
5. Chromatogramme.
  - a. chromatogramme idéal
  - b. Cas des isothermes

## IV Théorie cinétique.

1. Insuffisance de la théorie des plateaux.
2. Les facteurs d'élargissement des pics.
3. Equation de Van Deemler.

## V. Les paramètres fondamentaux.

1. Les grandeurs de rétention -
2. les grandeurs de séparation

## VI Analyse quantitative

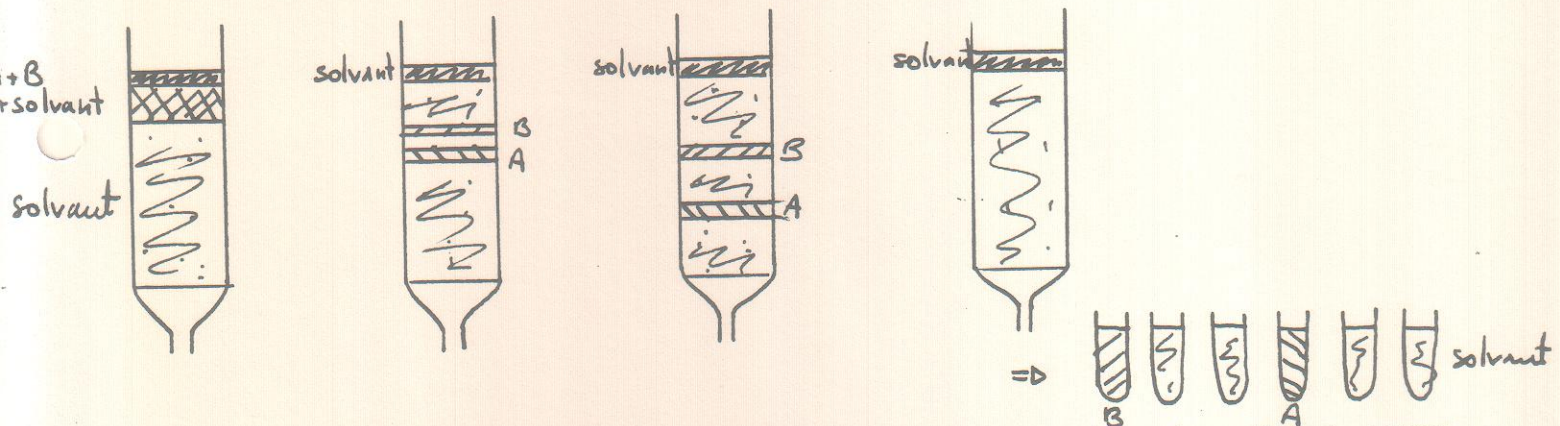
1. principe
2. mesure de  $A_i$
3. mesure de  $K_i$
4. Détermination des quantités ou des concentrations

## CHROMATOGRAPHIE - GENERALITES

- 1903 : TSWETT réalise la première chromatographie : il sépare des pigments végétaux sur une colonne de carbonate de calcium.
- 1940 : chromatographie sur papier.
- 1950 : chromatographie gazeuse / CCM
- 1970 : CLHP : chromatographie liquide haute performance.

### I. DEFINITION - PRINCIPE

Une colonne est remplie d'une phase stationnaire (silice - alumine - carbonate de calcium) sur laquelle on fait passer un solvant (correspondant à la phase mobile). C'est une méthode de séparation basée sur des équilibres de partage entre une phase mobile et une phase stationnaire.



On divise la colonne en plateaux théoriques. (Analogie avec la séparation à contre courant).

Le coefficient de partage est noté  $K$  (car on est pas dans les conditions idéales).

$$K = \frac{CS}{CM} \quad \left. \begin{array}{l} CS = \text{conc. du composé dans la phase stationnaire} \\ CM = \text{conc. du composé dans la phase mobile.} \end{array} \right\}$$

Si  $K_A < K_B$  : ceci signifie que le composé A a moins d'affinité que le composé B. Le composé A progressera plus rapidement dans la colonne. Les composés sont recueillis dans des tubes.

### II. CLASSIFICATION

#### 1. Nature des phases

Les phases stationnaires peuvent être : - solides,  
- liquides.

Les phases mobiles peuvent être : - liquides; ce sont celles qui sont entourées,  
- gazeuses.

Chromatographies :

gaz	- solide (CGS)	liquide	- solide (CLS)
gaz	- liquide (CGL)	liquide	- liquide (CLL)
		liquide	- gel (CLG)
		liquide	- phase gréffée

#### 2. Nature des phénomènes physico-chimiques

- Adsorption : phase stationnaire en Silice, Alumine.

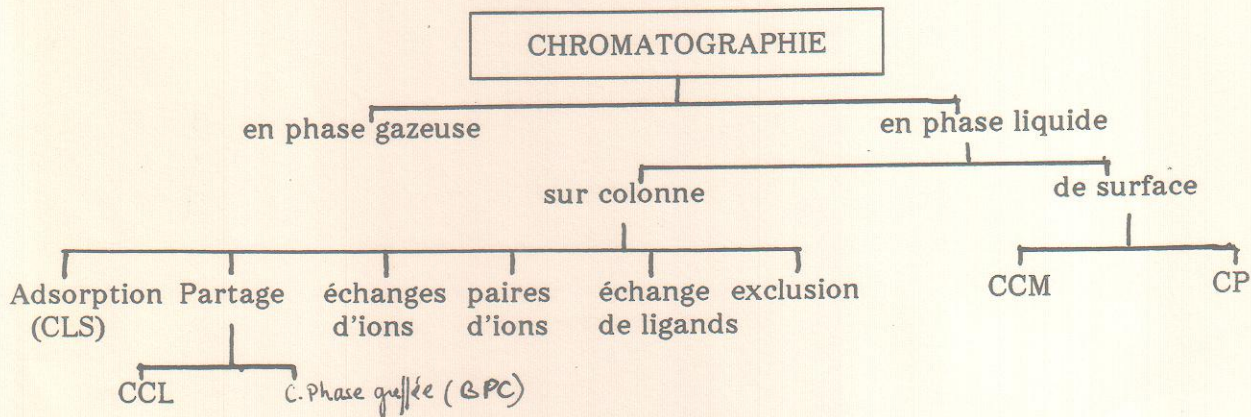
- Partage : séparation basée, sur une différence de solubilité entre une phase liquide qui imprègne la phase stationnaire et une phase mobile liquide ou gazeuse.
- Echange d'ions : la phase stationnaire est une résine échangeuse d'ions où sont fixés les groupements ionisés ou ionisables.
  - $R - SO_3H + Na^+ \leftrightarrow RSO_2 Na + H^+$
- Echange de ligands : phase solide où sont fixés des ligands pouvant former des complexes.
- Paires d'ions.
- Exclusion (chromatographie d'exclusion - diffusion) : on fait des gels dont la porosité détermine le passage des molécules.

### 3. Technologie

- Chromatographie de colonne.
- Chromatographie de surface.

### 4. Procédés de développement :

- Analyse par : Elution - déplacement - frontale



## III. THEORIE DES PLATEAUX

### 1. Répartition des solutés : entre phase mobile et phase stationnaire.

- Coefficient de partage :  $K = \frac{C_S}{C_M}$

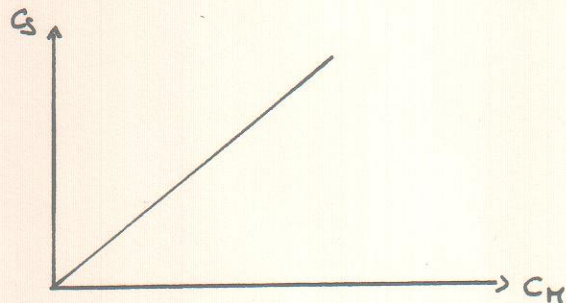
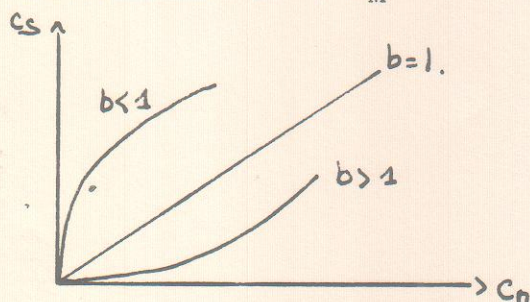
On note K car d'autres phénomènes interviennent et les conditions ne sont pas idéales.

- Taux de distribution :  $K_1 = \frac{Q_S}{Q_M} = K \frac{V_S}{V_M}$

Si on avait un partage idéal, on aurait :  
En fait, on a deux types d'isothermes.

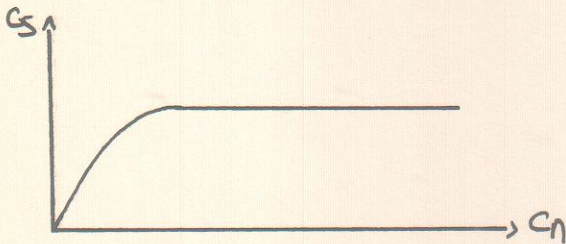
- Isothermes :

→ De Freundlich :  $C_S = a C_M^b$

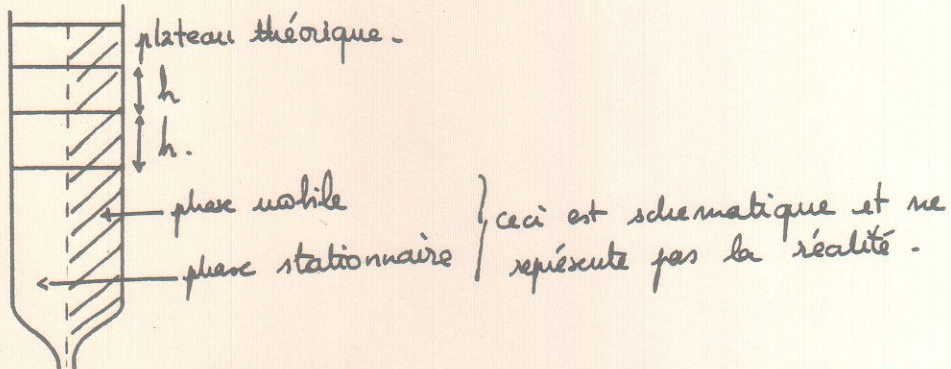


→ De Langmuir :

$$C_S = \frac{a_1 a_2 C_M}{1 + a_2 C_M}$$



## 2. Principe :



- La colonne est séparée en plateaux théoriques. Elle est remplie d'un solvant stationnaire. La phase mobile peut percoler à travers cette colonne. Les deux phases sont mélangées.
- On considère que l'équilibre de partage entre le soluté de la phase stationnaire et la phase mobile est toujours atteint.
- On considère que le soluté ne diffuse pas d'un plateau à l'autre.
- Le transfert du soluté se fera uniquement par déplacement de la phase mobile.
- On considère que K est constant et qu'on a affaire à des isothermes linéaires.

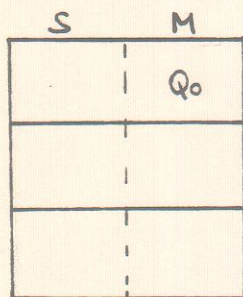
## 3. Distribution du soluté dans la colonne :

**Hypothèse :** On a un soluté A. On en utilise une quantité  $Q_0$ .

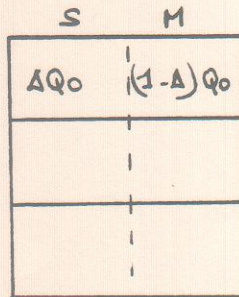
$$K = \frac{C_S}{C_M}$$

### Première opération

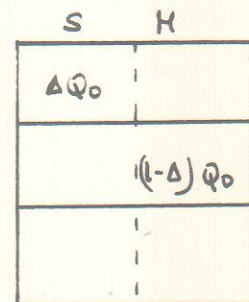
- On introduit dans le premier plateau la quantité  $Q_0$  de soluté dans un volume  $\Delta V_m$  de phase mobile correspondant au volume de la phase mobile d'un plateau.
- On considère ensuite que l'équilibre entre les phases S et M est atteint. Une quantité  $\Delta Q_0$  est entrée dans la phase S  
 $(1-\Delta)Q_0$  est entrée dans la phase M.
- On réalise un transfert : on rajoute un volume  $\Delta V_m$  de phase mobile. Ainsi, ce qui était dans le plateau n° 1 passe en 2.



introduction



équilibre



Transfert.

### 2ème opération :

- Une fraction  $\Delta$  de  $\Delta Q_0$  reste dans le 1er plateau au niveau de la phase stationnaire (soit  $\Delta^2 Q_0$ ). Dans la phase mobile il y a  $\Delta(1-\Delta)Q_0$ . Au niveau du second plateau il reste dans la phase mobile  $(1-\Delta)^2 Q_0$ .

- On réalise un nouveau transfert en ajoutant un volume  $\Delta V_m$  pur.

S	M
$\Delta Q_0$	
	$(1-\Delta)Q_0$

introduction

S	M
$\Delta^2 Q_0$	$\Delta(1-\Delta)Q_0$
$(1-\Delta)\Delta Q_0$	$(1-\Delta)^2 Q_0$

Equilibre

S	M
$\Delta^2 Q_0$	
$(1-\Delta)\Delta Q_0$	$\Delta(1-\Delta)Q_0$
	$(1-\Delta)^2 Q_0$

Transfert  $n=2$ .

N<sup>i</sup>ème opération :

$$Q_0 = \Delta^n Q_0 + n\Delta^{n-1} (1-\Delta) Q_0 + \dots + n\Delta (1-\Delta)^{n-1} Q_0 + (1-\Delta)^n Q_0$$

La concentration maximale dans les plateaux est :

$$X = \frac{n}{1 + \frac{\Delta}{1-\Delta}} + 1$$

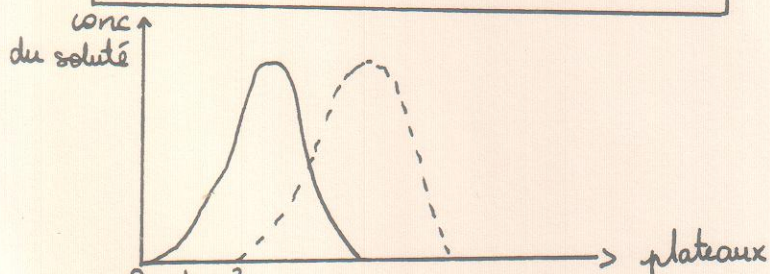
$n$  = nombre de transferts  
 $K$  nous permet de déterminer  $\Delta$

NB : Il reste toujours quelque chose dans le premier plateau.

Conséquences :

Il y a séparation de deux solutés si les  $K$  sont différentes :

$$\frac{\Delta Q_0}{(1-\Delta)Q_0} = \frac{Q_S}{Q_M} = \frac{V_S}{V_M} \cdot K = K'$$



Ex. : Modèle des plateaux. Migration de 64 mg d'un soluté ( $K = 1$ ) dans une colonne de 5 plateaux (Cf doc.)

#### 4. Distribution en sortie de colonne : (Courbe d'élution)

$$\frac{n}{1 + \frac{\Delta}{1-\Delta}} + 1 = N + 1 \quad \left\{ \begin{array}{l} n = \text{nombre de transferts,} \\ N = \text{nombre de plateaux.} \end{array} \right.$$

$$n = N \frac{(1+\Delta)}{(1-\Delta)} = N \left(1 + K \frac{V_S}{V}\right) = \frac{V_R}{\Delta V_m}$$

$$V_R = N \frac{(1 + K \frac{V_S}{V})}{V_m} \Delta V_m = V_M \frac{(1 + K \frac{V_S}{V})}{V}$$

$$V_R = V_M + K V_S$$

-  $V_R$  : volume de rétention : volume de phase mobile au bout duquel apparaît en sortie de colonne la concentration maximale.

Ce volume est celui au bout duquel on a ajouté  $n$  fois un volume  $\Delta V_m$ . Ainsi  $n = \frac{V_R}{\Delta V_m}$



$VM = N \Delta V_m$   $VM =$  volume total de la phase mobile dans la colonne.  
 $VS =$  volume de phase stationnaire dans la colonne.

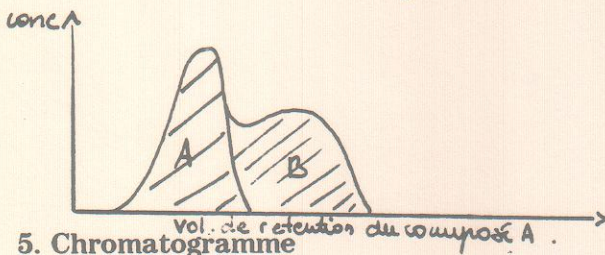
Par le calcul on peut déterminer le volume de rétention.

- Ce phénomène de chromatographie entraîne un élargissement de la zone initiale. Par ailleurs, il reste toujours quelque chose dans le premier plateau. Par conséquent, on ne peut dire exactement dans quel volume se retrouve le composé élué.

$$\Delta V = \frac{8 V_R}{\sqrt{N}} \quad (99,9 \%)$$

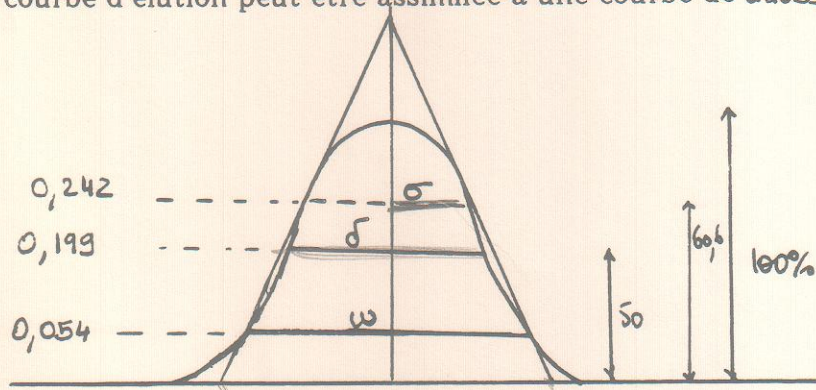
$$\Delta V = \frac{5,2 V_R}{\sqrt{N}} \quad (99 \%)$$

- La courbe d'éluion correspond au chromatogramme (Cf schéma).



### a) Chromatogramme idéal

- La courbe d'éluion peut être assimilée à une courbe de Gauss.



- A partir de cette courbe on peut déterminer le nombre de plateaux théoriques.

$$N = 5,54 \left( \frac{V_R}{\delta} \right)^2 \quad \text{en utilisant } \delta = \text{largeur à mi-hauteur}$$

$$N = 16 \left( \frac{V_R}{w} \right)^2 \quad \text{en considérant la distance déterminée par l'intersection des tangentes avec l'axe des } x : w$$

$$N = \left( \frac{V_R}{\sigma} \right)^2 \quad \text{en utilisant l'écart type (mesure de la } 1/2 \text{ largeur du pic à } 60,6 \% \text{ de sa hauteur)}$$

- Détermination de la hauteur équivalente à un plateau théorique.

$$HEPT = \frac{l}{N} \quad l = \text{hauteur de la colonne}$$

### b) Cas des isothermes

Les pics sont déformés - voir schéma No

#### IV. THEORIE CINETIQUE

##### 1. Insuffisance de la théorie des plateaux :

- La HEPT varie avec la vitesse d'écoulement de la phase mobile sur la colonne.

##### 2. Les facteurs d'élargissement des pics :

A. Hétérogénéité de la colonne : il se crée des chemins préférentiels. Pour les éviter au maximum on essaye d'avoir des grains de taille semblable et on réalise un bon tassage de colonne.

B. Diffusion longitudinale : Ce qui élargit le pic. Cette diffusion est plus importante dans la phase mobile que dans la phase stationnaire. Elle le sera d'autant plus que la phase M est fluide.

Pour un gaz, la diffusion est 10<sup>5</sup> fois plus importante. Elle l'est moins si on utilise un liquide.

##### C. Résistance au transfert de masse

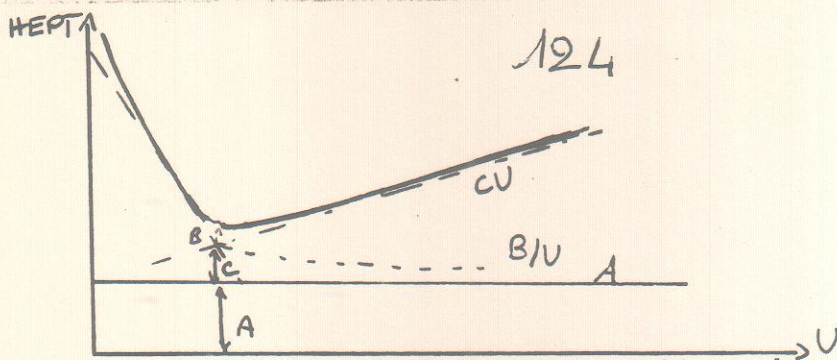
La résistance sera d'autant plus grande que le soluté aura plus profondément pénétré dans les grains.

##### 3. L'équation de Van Deemter :

$$\boxed{HEPT = A + \frac{B}{U} + CU}$$

$$HEPT = 2\lambda dp + \frac{2\gamma D_m}{4} + \left( \frac{2}{\pi^2} \cdot \frac{\Delta}{1+\Delta} \frac{d^2}{D_s} \right)$$

- $\lambda$  = Coef. tenant compte des irrégularités de remplissage.
- $dp$  = lié au diamètre de la molécule.
- $\gamma$  = facteur de tortuosité tenant compte de la sinuosité des chemins
- $D_m$  = diffusion dans la phase mobile
- $\Delta$  = facteur de capacité
- $d$  = épaisseur du film stationnaire
- $D_s$  = diffusion dans la phase stationnaire
- $U$  = vitesse d'écoulement de la phase mobile.



Ceci est surtout applicable à la chromatographie en phase gazeuse.

==>  $A = cte$

==>  $CU$  est une droite dont la pente est  $C$ . Plus la vitesse d'écoulement augmente, plus  $HEPT$  est grande.

==>  $\frac{B}{U}$  :  $HEPT = f\left(\frac{1}{U}\right)$  à une constante près.

Si  $U$  augmente, le soluté n'a pas le temps de diffuser. Inversement, la diffusion augmente si  $U$  diminue trop.

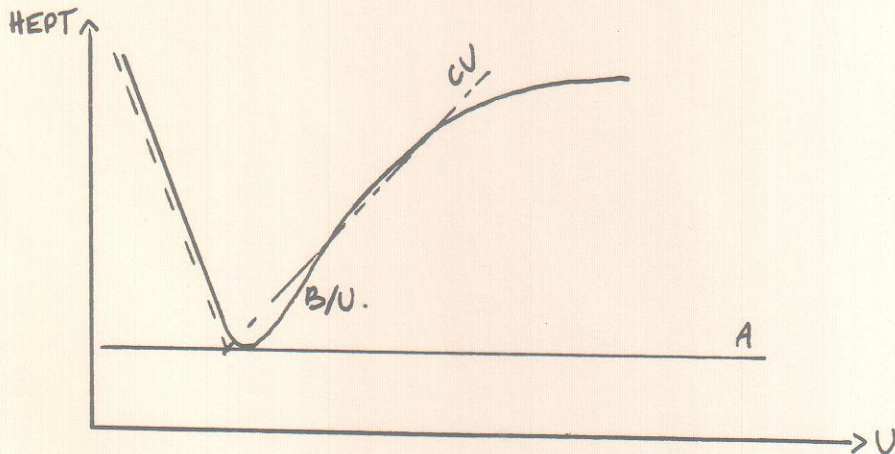
Il y a une vitesse particulière pour laquelle  $HEPT$  a une valeur très faible, donc pour une longueur donnée,  $N$  sera grand, et donc meilleure sera la séparation et l'efficacité de la colonne.

==> Par homogénéisation et tassage, on peut diminuer la valeur de  $A$ .

==> Pour que le facteur  $C$  soit le plus faible possible, il faut que les grains soient les plus fins possibles.

**Jeudi 9 Décembre (8 h à 9 h)**

En chromatographie liquide haute performance, on obtient la courbe suivante :

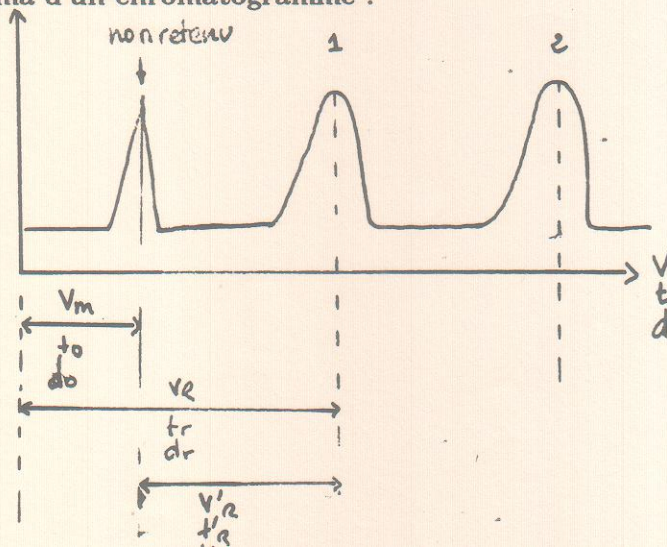


La différence est la contribution beaucoup plus faible de la diffusion longitudinale (la contribution du facteur  $B$  est de sorte très faible).

## V. LES PARAMETRES FONDAMENTAUX

Ils caractérisent une séparation, une chromatographie :

Schéma d'un chromatogramme :



s = signal

v = volume de phase mobile qui a traversé la colonne.

On est dans le cas où deux composés ont été séparés 1) et 2). Un composé est non retenu et reste dans la phase mobile.

Le signal est très souvent exprimé en fonction du temps, car :

v = débit (constant)  $\Rightarrow V = f(t)$ . Il est facile d'obtenir le temps de rétention que le volume   
 temps

de rétention.

Le signal peut aussi être exprimé en fonction d'une distance de rétention car on a également  $d = f(t)$ .

## 1. Les grandeurs de rétention

### a) $V_m$ = volume mort de la colonne :

- C'est le volume de la phase mobile à l'intérieur de la colonne.
- Il peut s'exprimer en fonction du temps et correspondre alors à  $t_0$  ( $t_0 = \frac{V_m}{D}$ )
- Il peut expérimentalement être obtenu par injection d'un composé qui ne sera pas reconnu.
- S'il est exprimé selon une distance, cette dernière correspondra à  $d_0$ .

### b) Volume de rétention : $V_R$

- C'est le volume au bout duquel apparaît la concentration maximale du composé élevé :
  - en fonction du temps  $t_r = \frac{V_R}{D}$ ,
  - en fonction d'une distance  $d_r$ .

### c) Volume de rétention réduit : $V'_R$

$$V'_R = V_R - V_m$$

- En fonction du temps :  $T'_r = t_r - t_0$ .
- En fonction d'une distance :  $d'_r = d_r - d_0$ .

### d) Facteur de capacité : $K'$

Il correspond au taux de distribution.

$$V_R = V_M + K' V_S = V_M + \frac{C_S}{C_M} V_S = V_M + \frac{C_S}{C_M} V_S \times \frac{V_M}{V_M}$$

$$K' = \frac{C_S}{C_M} \frac{V_S}{V_M}$$

$$V_R = V_M + K' V_M = V_M (1 + K')$$

$$K' = \frac{V_R - V_M}{V_M}$$

$$K' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

## 2. Les grandeurs de séparation

### a) Sélectivité

$$\alpha = \frac{t_{r2} - t_0}{t_{r1} - t_0} = \frac{h'_2}{h'_1}$$

pour un chromatogramme à deux composés

Plus  $\alpha$  sera grand, plus les composés seront séparés.

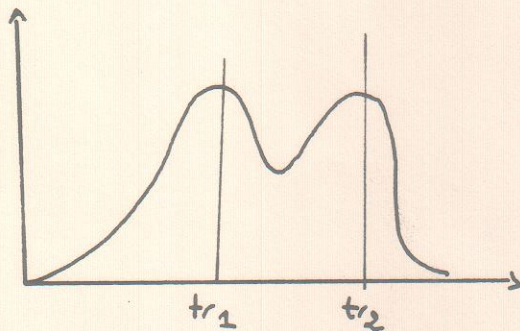
b) Efficacité

Est exprimée : par le nombre de plateaux d'une colonne donnée, ou par HEPT.

c) Résolution

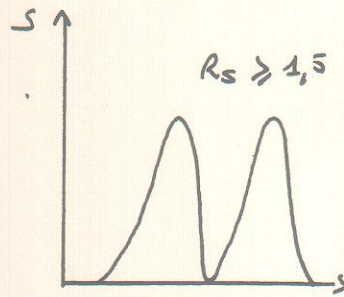
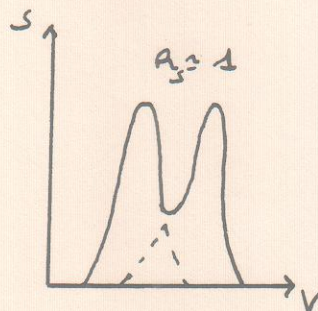
$$R_s = 2 \frac{t_{r2} - t_{r1}}{w_2 + w_1}$$

$$R_s = \frac{1}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} + \frac{k'_2}{1 + k'_2} \times \sqrt{N}$$



Ce chromatogramme montre 2 composés non séparés ayant des  $t_r$  différents

La résolution prend en compte non seulement le temps de rétention mais aussi la largeur du pic, ce qui nous donnera une idée plus ou moins complète de la séparation des deux composés.



Pour  $R_s < 0,75$  : la séparation est insuffisante  
 $R_s > 1,5$  : " " est totale

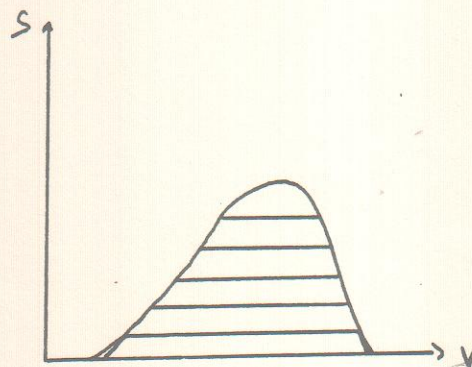
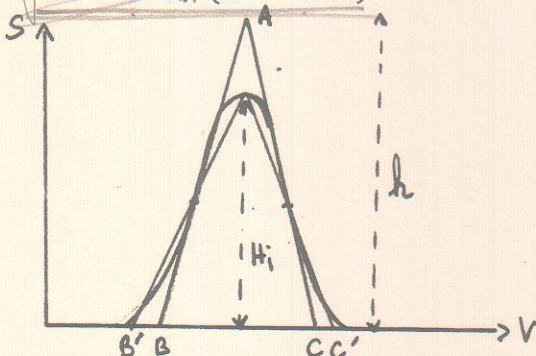
VI. ANALYSE QUANTITATIVE1. Principe

On cherche à obtenir des résultats reproductibles ce qui nécessite :

- le maintien des conditions opératoires chimiques constantes,
- le dépôt de l'échantillon sur la colonne selon des volumes reproductibles (ceci n'est pas forcément évident lorsque l'on fait des dépôts à la seringue !)
- Soit une masse de substance  $i$  ayant traversé la colonne et le détecteur :  $m_i$

$A_i$  est l'aire du pic correspondant.

$$m_i = K_i A_i \quad (m_i = K_i H_i)$$



Si on a des pics symétriques, on peut seulement tenir compte de la hauteur du pic ( $H_i$ )

## 2. Mesure de $A_i$

### a) Méthodes géométriques

- Triangulation : à condition que le pic soit bien symétrique.

On trace les tangentes au point d'inflexion de la courbe : on mesure  $h$  et  $BC$ .

On considère alors que la surface du triangle est proportionnelle à l'aire sous la courbe.

Une autre possibilité est d'abaisser les droites partant du sommet du pic et passant par les points d'inflexion. On multiplie la hauteur du pic par sa surface à mi-hauteur. La valeur obtenue est proportionnelle à l'aire sous la courbe.

- Trapèze : dans le cas où le pic n'est pas symétrique.

Le pic est découpé en  $N$  parties qui sont chacune assimilées à un trapèze.

On détermine l'aire de tous les trapèzes obtenus.

### b) Méthode pondérale

- On pèse à la balance le pic que l'on a préalablement découpé avec des ciseaux.

### c) Méthode par intégration automatique

- C'est ce qui est utilisé dans 80 % des cas.

## 3. Mesure de $K_i$ :

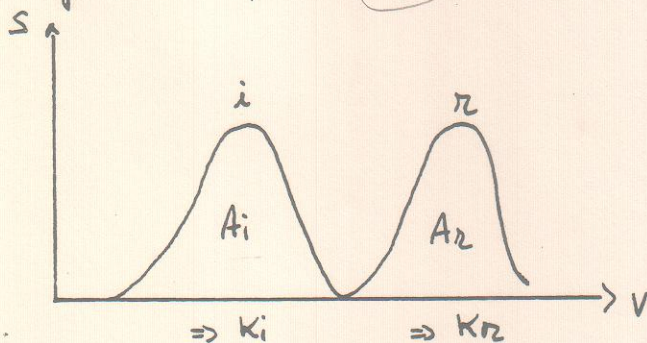
### a) Absolue

On prépare une solution contenant une quantité déterminée (par pesée exacte) de composé  $i$ . On réalise une chromatographie  $\rightarrow$  on obtient une courbe d'éluion ce qui nous permet de déterminer  $A_i$  et par suite  $K_i$  (très subtil non ?)

$$K_i = \frac{M_i}{A_i}$$

b) Relative (à un composé de référence)

On injecte une quantité  $m_i$  et une quantité  $m_r$  d'un composé de référence.



$$K_i = \frac{m_i}{m_r} \frac{A_r}{A_i} K_r$$

$$K_i = \frac{A_r}{A_i} \frac{m_i}{m_r} \times K_r$$

$$\frac{m_i}{m_r} \begin{cases} m_i = K_i A_i \\ m_r = K_r A_r \end{cases}$$

$$\frac{m_i}{m_r} = \frac{K_i}{K_r} \frac{A_i}{A_r}$$

On s'allourcit dans ce cas de l'injection d'un volume précis

#### 4 Détermination des quantités ou des concentrations

##### a) Méthode de normalisation interne.

On détermine le pourcentage des composés dans un mélange. Pour cela, on injecte un mélange qui comprendra des quantités connues:  $m_1, m_2 \dots m_n$ . On peut alors obtenir les surfaces correspondantes  $A_1, A_2 \dots A_n$  et déterminer  $K_1, K_2 \dots K_n$ .

On injecte alors un mélange inconnu: on détermine  $A'_1, A'_2$  et  $\dots A'_n$ .

$$m'_1 + m'_2 + m'_3 + \dots + m'_n = K_1 A'_1 + K_2 A'_2 + \dots + K_n A'_n$$

$$\frac{m'_i \times 100}{m'_1 + m'_2 + \dots + m'_n} = \frac{K_i A'_i \times 100}{K_1 A'_1 + K_2 A'_2 + \dots + K_n A'_n}$$

$K$  connus

##### b) Méthode d'étalonnage externe

Pour chaque composé on injecte une masse étalon  $m_e$  qui nous permet de déterminer  $A_e$  et  $K$ . On injecte ensuite le mélange inconnu. On trouve une valeur  $m_i$  à laquelle correspond  $A_i$ . On peut écrire:

$$m_i = A_i K.$$

##### Inconvénients

Les quantités injectées doivent être strictement identiques pour l'étalon et l'échantillon étudié.

Il faut à chaque fois déterminer la valeur de  $K$  pour que les conditions chromatographiques soient les mêmes si on ne travaille pas le même jour sur l'étalon et l'échantillon (le problème ne se pose pas si les deux chromatogrammes se suivent).

##### c) Méthode d'étalonnage interne

On injecte le composé à analyser auquel on a ajouté le composé de référence, dont le temps de rétention est différent.

$$m_r = K_R A_R \text{ pour le composé de référence}$$

$$m_i = K_i A_i \text{ pour le composé à analyser.}$$

On peut déterminer  $K_R$  et  $K_i$

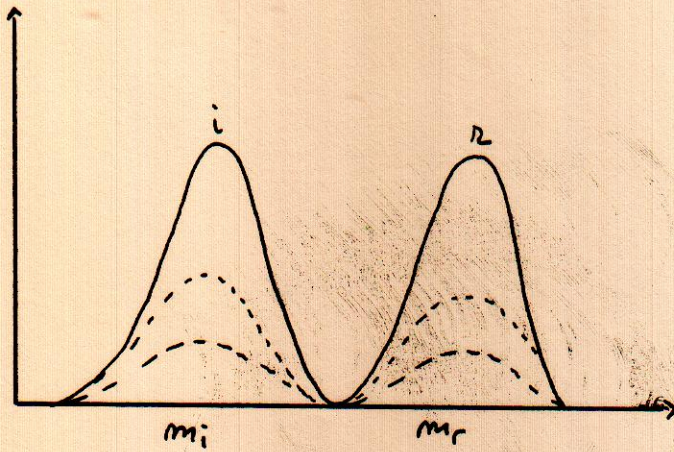
$$\frac{m_r}{m_i} = \frac{K_R A_R}{K_i A_i} \implies K = \frac{K_R}{K_i}$$

Dans un second temps on injecte une masse inconnue de l'échantillon et une masse connue du composé de référence. On réalise un chromatogramme et on mesure  $A_i$  et  $A_r$ .

$$m_i = m_r \times \frac{K_i}{K_R} \times \frac{A_i}{A_r} \implies m_i = m_r \times \frac{1}{K} \times \frac{A_i}{A_r}$$

On détermine la masse du composé dans le mélange.

K reste constant car on se met à l'abri d'un mauvais volume injecté et de mauvaises conditions opératoires.

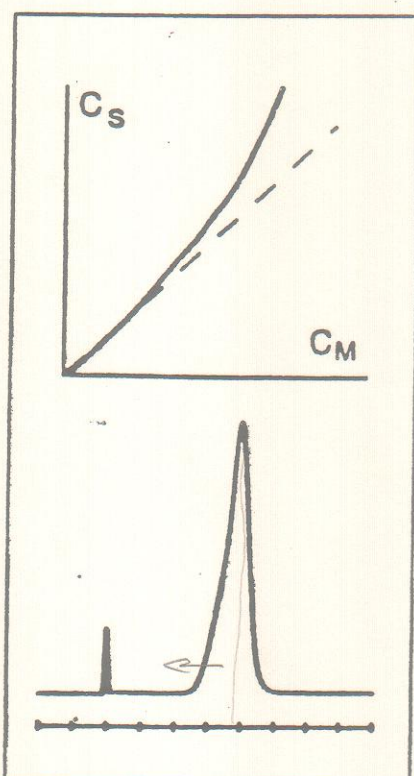
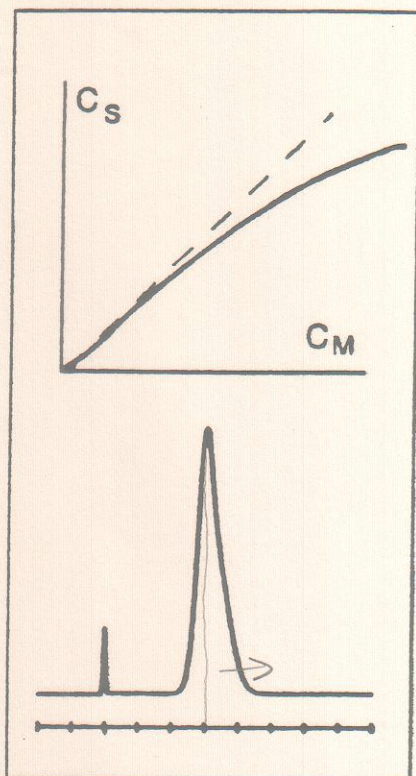
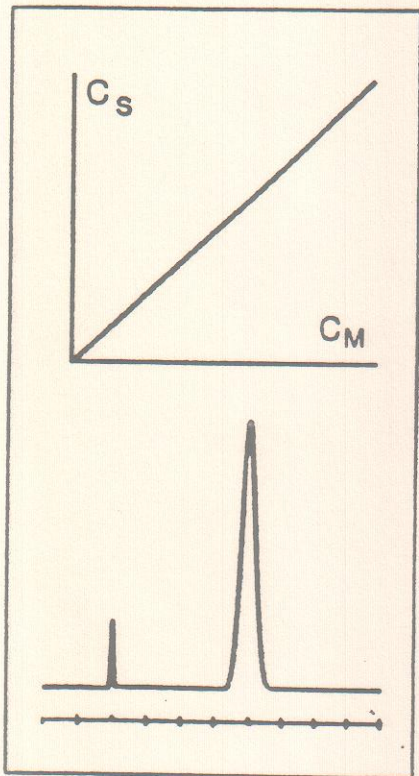


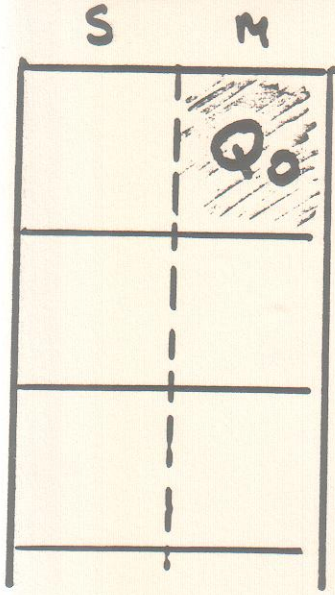


52

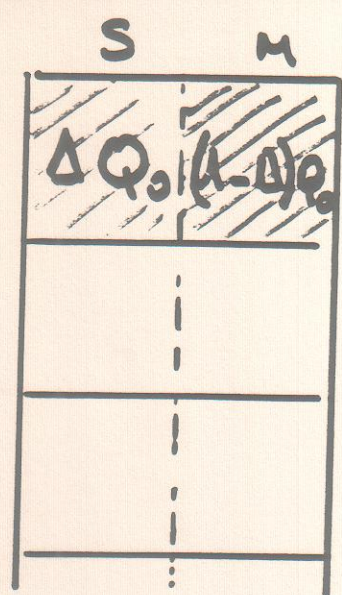
# Pics REELS

=> cas des isothermes - P. 122 bis

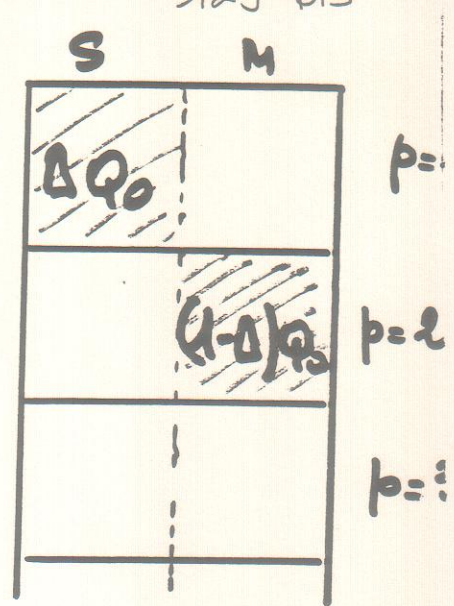




INTRODUCTION



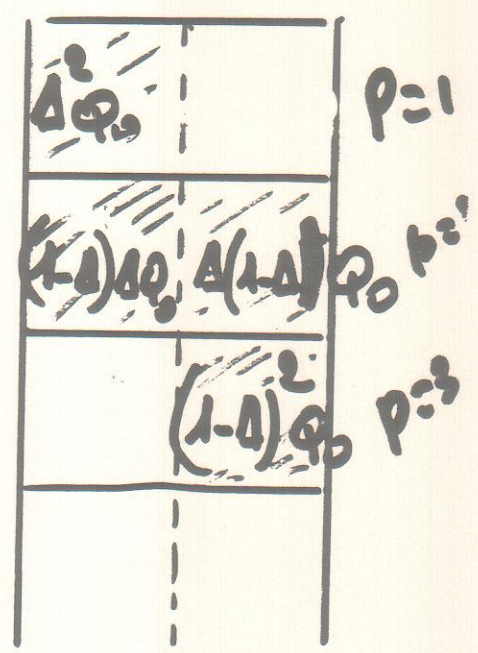
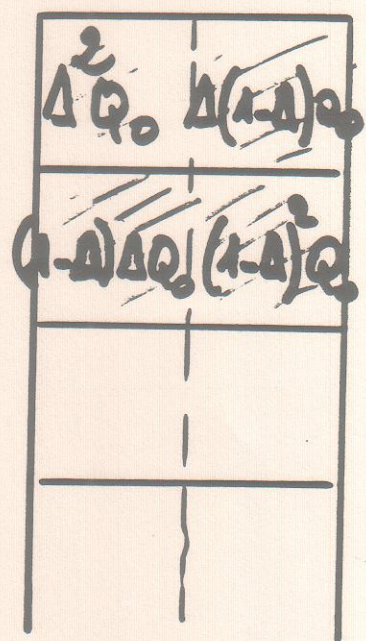
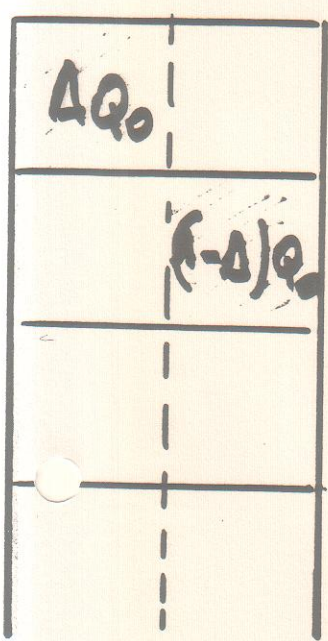
EQUILIBRE



TRANSFERT (1)

$n=1$

2ème operation



TRANSFERT (2)

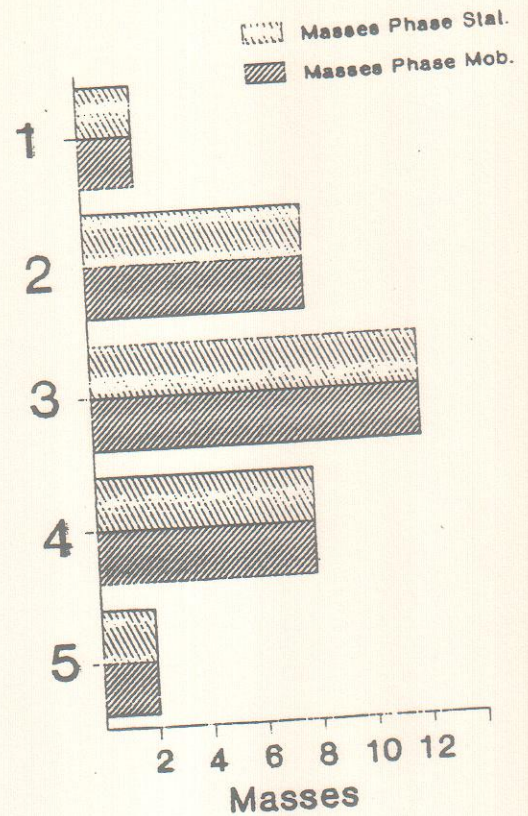
$n=2$

après deux transferts

$$Q_0 = \Delta^2 Q_0 + 2\Delta(1-\Delta)Q_0 + (1-\Delta)^2 Q_0$$

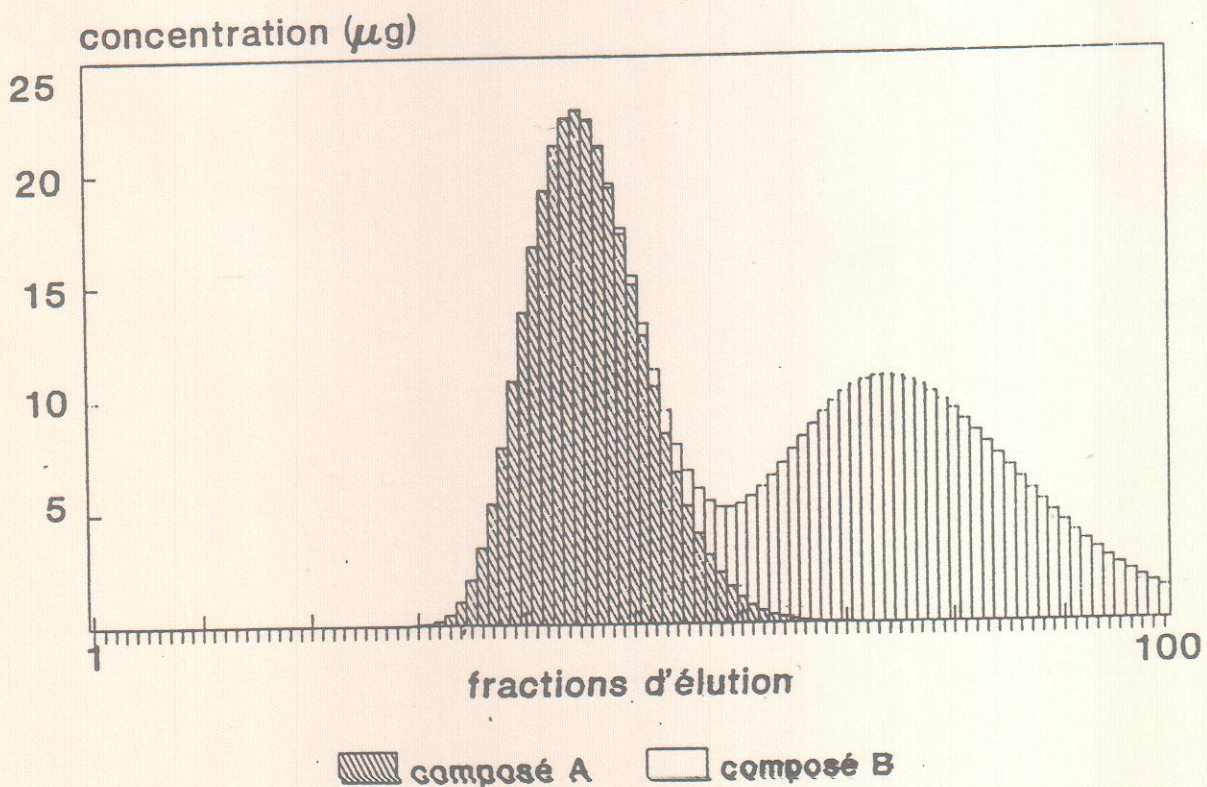
- Modèle des plateaux. Migration de 64 mg d'un soluté ( $K = 1$ ) dans une colonne de 5 plateaux (S, pour phase stationnaire et M pour phase mobile).

	1	2	3	4	5
1 S	32	16	8	2	2
M	32	16	8	4	2
2 S	0	16	$(8+8)=16$	$(8+4)=12$	$(6+2)=8$
M	0	16	$(8+8)=16$	$(8+4)=12$	$(6+2)=8$
3 S	0	0	8	$(4+8)=12$	$(6+6)=12$
M	0	0	8	$(4+8)=12$	$(6+6)=12$
4 S	0	0	0	4	$(2+6)=8$
M	0	0	0	4	$(2+6)=8$
5 S	0	0	0	0	2
M	0	0	0	0	2



Remarque - Si  $K$  était nul, le composé migrerait aussi vite que le solvant, et inversement si  $K$  était infini le composé resterait toujours sur le premier plateau.

Quant au chromatogramme, il représente, la masse transitant dans la phase mobile par le  $N+1^{\text{ème}}$  plateau (figure 1.3) au cours des équilibres successifs.



## CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CPG)

### I. DEFINITION

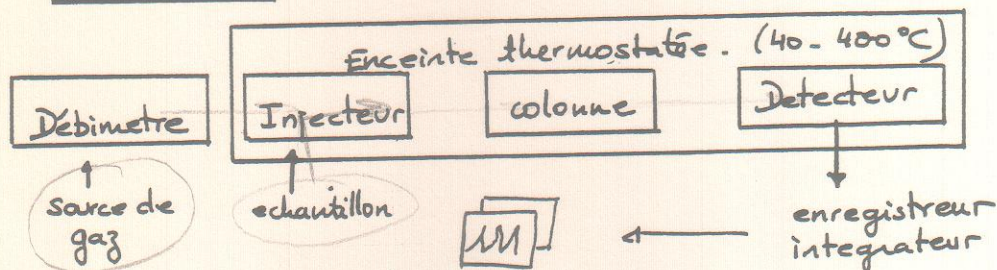
C'est une chromatographie dont :

- la phase mobile est toujours un gaz,
- la phase stationnaire est soit un liquide, soit un solide (le support poreux de la colonne est imprégné d'une phase liquide s'il s'agit d'un liquide).

Les composés sont à l'état de vapeur, à l'état gazeux.

Cette chromatographie s'applique donc à des molécules volatilisables et thermostats.

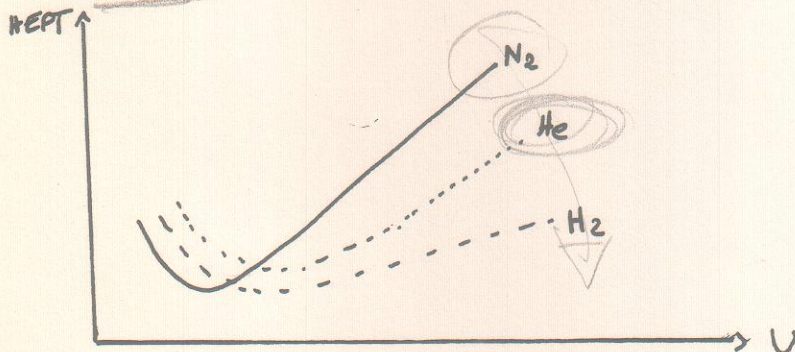
### II. APPAREILLAGE



- Le débitmètre sert à réguler l'arrivée du gaz.
- L'injecteur permet l'introduction de l'échantillon.

#### 1. Gaz vecteur :

- He, N<sub>2</sub>, Ar, H<sub>2</sub>
- La viscosité de ces gaz a une influence sur le débit optimal.



L'efficacité de la colonne sera meilleure avec H<sub>2</sub>, puis He et enfin N<sub>2</sub>. Toutefois, l'H<sub>2</sub> est explosif de sorte que très fréquemment on utilise He.

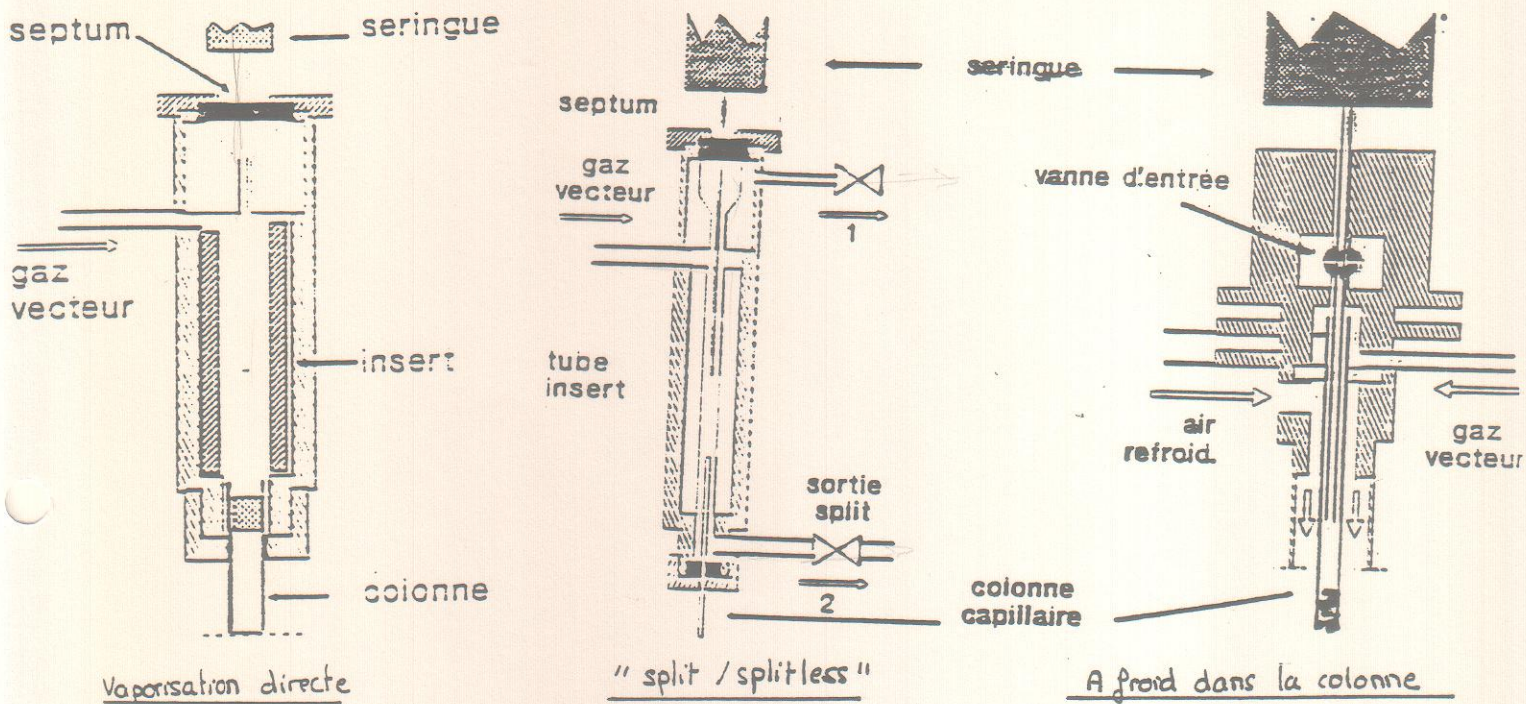
Les gaz ne doivent pas présenter d'impuretés qui encrasseront la colonne.

- Les débits sont de 1 à 30 ml/min.
- Les pressions utilisées vont de 1 à 4 bars : elles permettent la traversée de la colonne par le gaz.

#### 2. Injecteur : il comprend :

a) Un dispositif d'injection : ce sont de simples seringues de quelques microlitres.

b) Une chambre d'injection : (3 modèles)



Pour les colonnes remplies, on utilise la chambre d'injection à vaporisation directe. La tête de la colonne est insérée dans la chambre d'injection dont le sommet est bouché par un septum : pastille d'élastomère. Cette chambre est placée à l'intérieur du four; l'échantillon se vaporise et est entraîné par le gaz vecteur.

Pour les colonnes capillaires : injection < 1  $\mu$ l.

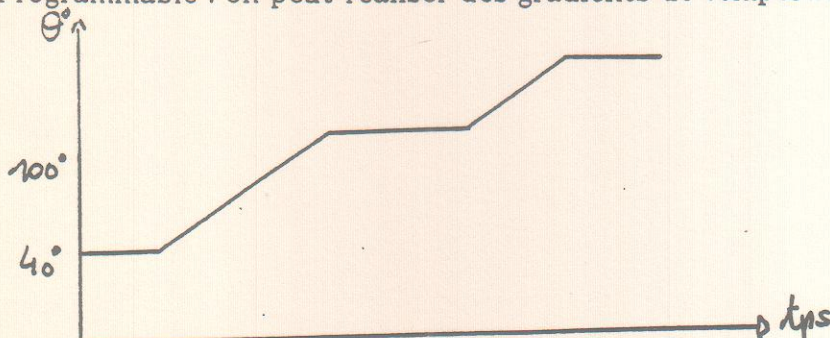
On utilise la méthode "split/splitless" : avec ou sans division. Le dispositif est le même que précédemment sauf que le gaz vecteur peut aller soit dans la colonne, soit en dehors. A la fin, le volume injecté doit être plus faible.

En réalité, on injectera des volumes importants et on va créer des fuites (sorties split 1 et 2) : ainsi 1/50<sup>è</sup> ou 1/10<sup>è</sup> de la quantité injectée arrivera sur la colonne.

Pour les colonnes capillaires, on utilise aussi le système d'injection à froid : L'aiguille de la seringue rentre directement dans la colonne. On a de l'air froid qui arrive sur la tête de la colonne de façon à ce que l'échantillon soit à l'état de liquide en haut de la colonne. Par suite, on met le four en marche et on vaporise ainsi l'échantillon.

### 3. Four :

- 40  $\rightarrow$  450 $^{\circ}$  C (régulé à plus ou moins 0,1 $^{\circ}$  C).
- Programmable : on peut réaliser des gradients de température.



On peut jouer sur le phénomène de volatilisation dans ce cas.

#### 4. Colonnes

##### a) Colonnes remplies : à garnissage :

Il s'agit d'un tube en acier inoxydable de 1/8 à 1/4 d'inch de diamètre et de 1 à 3 m de long. (NB : 1 inch : 2,54 cm).

##### b) Colonnes capillaires :

Ce sont des colonnes en verre dont le diamètre varie de 0,05 à 0,35 mm et de 10 à 50 m de long.

On a un "bobinage".

Le support de la phase stationnaire est le verre de la colonne elle-même.

#### 5. Supports de phases stationnaires (à l'intérieur des colonnes)

##### a) Les matériaux doivent être poreux

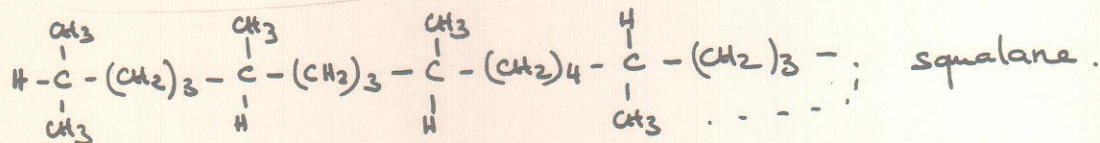
On utilise de la silice amorphe ou du kieselguhr (la surface de ces composés représente 2 à 8 m<sup>2</sup>(g)). La marque la plus utilisée est CHROMOSORB<sup>(R)</sup>

##### b) Paroi des colonnes capillaires

#### 6. Phases stationnaires

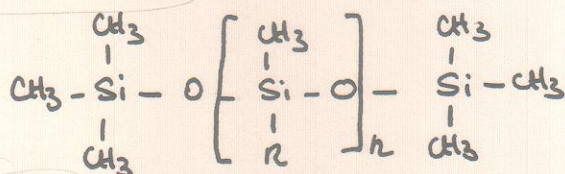
##### a) Liquides

→ Hydrocarbures ramifiés :

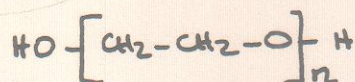


Les composés sont émis dans l'ordre des températures d'élution croissante.

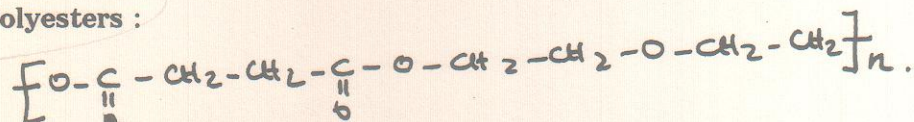
→ Polydialkylsiloxanes : ces dérivés donnent une certaine polarité... mais ils sont non polaires :



→ Polyéthères : très polaires et connus sous le nom de carbowax.



→ Polyesters :



Diéthylénerglycolsuccinate : DEGS.

##### b) Solides

→ Flumine

→ Silice

→ Argiles (il en existe plusieurs)

→ Charbon actif

→ Polymères organiques.

## 7. Détecteurs

### a) Détecteur à conductibilité thermique = catharomètre :

- Le gaz qui passe sur la colonne arrive sur une résistance puis sur une autre. A la suite, il y a un pont de weston (constitué de 4 résistances comme tout le monde le sait). Le principe : (sur nos montres, nous avons pu lire que 5 minutes s'étaient écoulées avant que Mr Later ne nous dire "le trou noir"... 3 minutes après EUREKA il avait compris !!!)...

En plus du gaz qui arrive sur la seconde résistance, il y a un composé qui entraîne une conductibilité différente ce qui crée un déséquilibre au niveau du pont de weston et constitue le signal.

Le détecteur est non spécifique, il n'est sensible qu'aux molécules organiques et est de sensibilité moyenne.

Par contre, il a une bonne linéarité et est non destructif : si ça vous amuse, vous pouvez récupérer les composés en sortie de colonne.

### b) Détecteur à ionisation de flamme

De l'air alimente le brûleur. Les composés qui sortent de la colonne sont donc brûlés dans une flamme. Il apparaît des particules chargées que l'on cherche à détecter. La flamme est entourée d'une cathode constituée d'un brûleur métallique et d'une anode ou se constitue la flamme. On crée une ddp entre ces électrodes. On collecte des ions négatifs sur l'anode ce qui crée un courant qui constitue le signal qui nous permettra d'établir la courbe d'éluion.

Il est non spécifique et n'est sensible qu'aux molécules organiques.

Il est plus sensible et a une bonne linéarité... mais il est destructif.

### c) Détecteur thermoionique

Dans ce système il y a en plus une céramique dopée qui contient un sel alcalin de Rubidium ou de Cesium. Ceci permet d'établir un courant de base. Lorsque dans le gaz vecteur, il y a des composés comme le phosphore ou l'azote, ils vont entraîner une multiplication des ions émis par la céramique. Ce détecteur est donc intéressant pour détecter des molécules contenant P ou N.

Il est de 10 à 100 fois plus sensible que le détecteur précédent, moins linéaire.

Il est bien utilisé dans le domaine de la biologie.

### d) Détecteur à capture d'électrons

Le gaz vecteur est de l'azote. Il rentre dans un détecteur constitué d'une chambre avec une anode et une cathode et d'une source radioactive de  $^{63}\text{Ni}$  de faible énergie (quelques mCuries) de telle sorte qu'il se produit une réaction entre l'azote et le rayonnement radioactif :



Ils s'établissent un courant différent entre la cathode et l'anode. Il est de la forme :

$$I = I_0 e^{kc} \quad (c = \text{concentration du composé}).$$

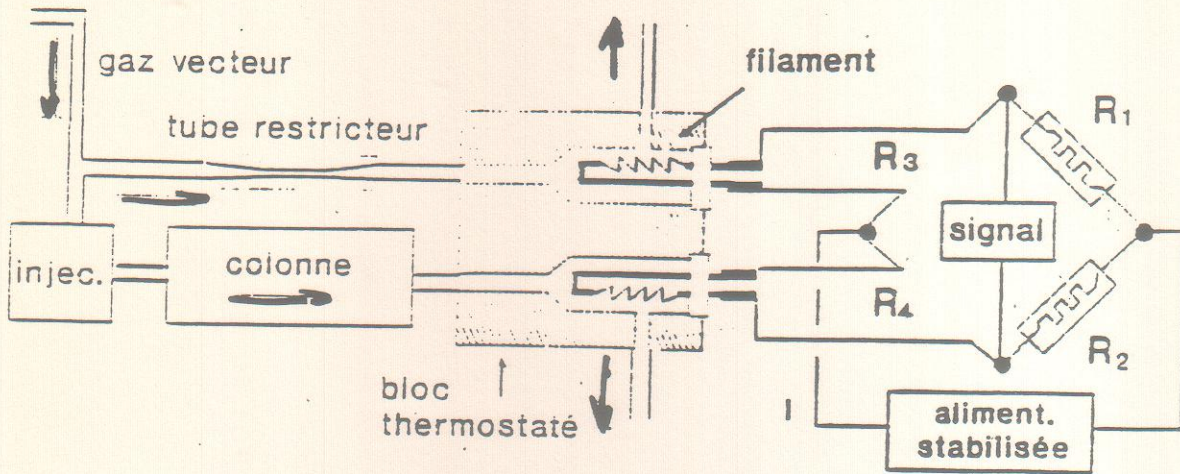
Il est sélectif puisqu'il est nécessaire qu'il comporte des halogènes.  
Sa linéarité de réponse est faible, mais il est excessivement sensible.

### e) Autres détecteurs

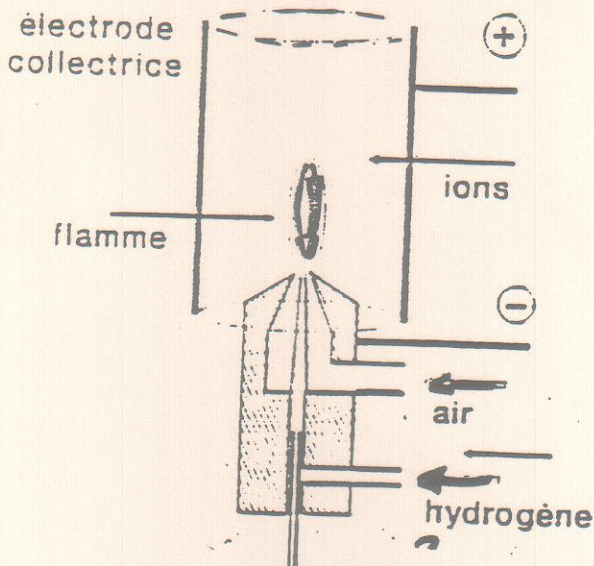
→ Photomètre de flamme qui est surtout utilisé pour mettre en évidence le soufre ou le phosphore (émission à 526 pour S et 386 pour P).

DETECTEURS

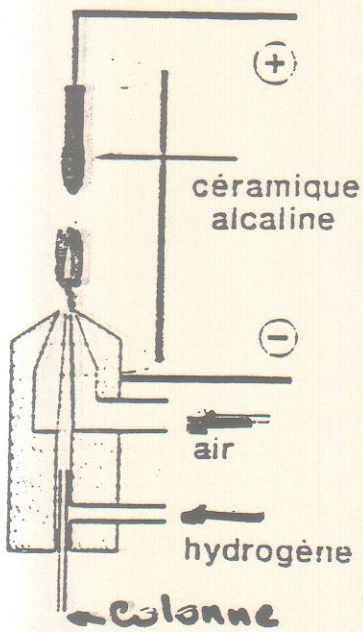
1. Détecteur à conductibilité thermique (catharomètre):



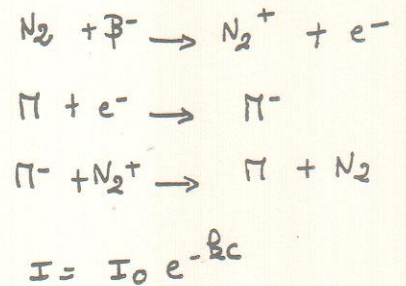
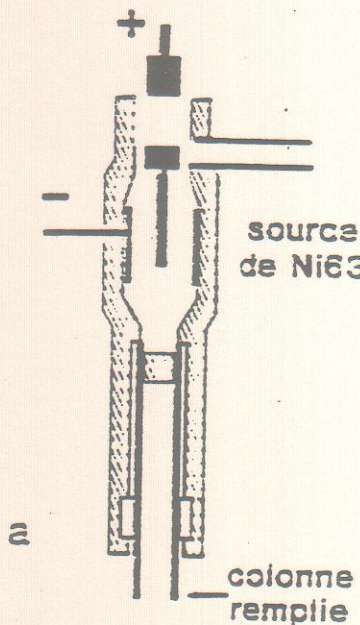
2. Détecteur à ionisation de flamme:



3. Détecteur thermionique:



4. Capture d'électrons:





→ **Emission atomique** : On utilise habituellement une petite torche à plasma.

→ **Spectromètre de masse** : Très bonne méthode pour séparer et caractériser. Pour mettre en évidence un dopage, on couplera une chromatographie en phase gazeuse et une spectrométrie de masse.

→ **Spectromètre IR**.

### III. CONDITIONS OPERATOIRES

#### 1. Chromatographie

a) **Température** : Elle va modifier le coefficient de partage. Ce dernier diminue lorsque la température augmente. (On augmente la proportion dans la phase mobile). Plus la température augmente, plus les pics sont fins.

#### b) Programmation de température

A une température donnée, des composés sont bien séparés, d'autres traînent. On peut choisir la température à laquelle les composés se séparent bien puis on l'augmente progressivement de manière à accélérer la séparation des autres composés.

#### c) Vitesse de phase mobile

HEPT dépend de  $\mu$  → courbe de Van Demter.

#### d) Composition de la colonne

On essaye différentes phases stationnaires pour améliorer les séparations.

#### e) Longueur de la colonne

Si deux composés ne sont pas totalement séparés, ils peuvent l'être si la colonne utilisée est plus longue.

Lorsqu'on multiplie la longueur de la colonne par 2 → le temps de rétention est multiplié par 2 et N par  $\sqrt{2}$  (nombre de plateaux).

$$NB : \omega = \frac{4 VR}{\sqrt{N}} \quad \omega = \text{largeur du pic}$$

#### 2. Formation des dérivés

On cherche à former les dérivés les plus volatiles possibles... par :

##### a) Silylation :

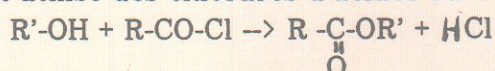
On fixe sur un composé  $(CH_3)_3 - Si -$   
 $(CH_3)_3 - Si - Cl + RH \leftrightarrow HCl + (CH_3)_3 - Si R.$

##### b) Alcoylation

Pour obtenir la transformation des alcools en éthers :  $R-OH \rightarrow R-O-R$   
 Pour obtenir la transformation des acides en esters :  $R-COOH \rightarrow R-COO-R'$   
 On utilise le sulfate de méthyl  $(CH_3)_2-SO_4$   
 On utilise l'iodure de méthyl  $CH_3 I$   
 On utilise le diazométhane  $CH_2 = N_2$  } Réactifs d'acoylation

##### c) Acylation

On utilise des chlorures d'acides ou des anhydrides d'acide :



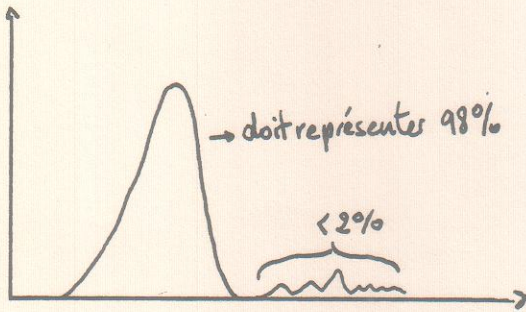
### III. APPLICATIONS

#### 1. Analyse qualitative

On cherchera à mesurer  $t_r$  et  $V_r$  que l'on comparera aux  $t_r$  et  $V_r$  d'un composé de référence dans de mêmes conditions.

NB : 1  $t_r$  et un  $V_r$  ne sont pas caractéristiques d'un composé. Deux composés peuvent présenter les mêmes valeurs... On aura simplement une présomption.

On peut rechercher des impuretés : normalisation interne.



On peut chercher des produits toxiques qui sont intervenus lors de l'extraction ou la synthèse d'un composé.

#### 2. Analyse quantitative

Elle est la plus utilisée; elle sert à de nombreux dosages.

#### 3. Domaines

Etude des médicaments.

Biologie : - dosage des hormones thyroïdiennes,

- peut constituer une méthode de référence du dosage du cholestérol si elle est couplée à la spectrométrie de masse.

Toxicologie : mise en évidence des dopages.

Environnement : recherche des pesticides et insecticides.

<b>CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE SUR COLONNE</b>
--

**==> CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE****I. AVANT PROPOS.**

- Pendant très longtemps on a utilisé des colonnes de diamètre important (1 à 10 cm) et de 1 à 2 m de longueur. On remplissait ces colonnes avec de la phase stationnaire. On évitait d'avoir des grains très fins pour éviter tout colmatage et permettre l'écoulement (par gravité).

Ces chromatographies duraient plusieurs heures, voire plusieurs jours et leur efficacité était plus qu'incertaine... c'était le temps de la chromatographie conventionnelle.

- Depuis 1970, on sait faire des pompes qui font passer la phase mobile sous pression, de granulométrie plus fine, de résistance au transfert de masse plus faible, avec réduction du temps et de la diffusion des solutés.

C L haute formance (CLHP)

(haute pression = HPLC car high performance)

(haute résolution liquide de chromatographie).

NB : La C L conventionnelle est encore un peu utilisée de nos jours.

**II. APPAREILLAGE**

En trait plein sont mentionnés les éléments indispensables pour réaliser une chromatographie liquide.

En pointillé sont cités des éléments améliorant la qualité, la praticabilité.

**1. Schéma de principe : Schéma 1.****2. Eléments essentiels****a) Réservoir de solvant :**

C'est un flacon en verre (fumé si la phase mobile contient des composés sensibles à la lumière) ayant une contenance de 100 ml à quelques litres.

Ce flacon peut être rendu étanche à l'air de manière à éliminer des gaz gênants.

Lorsque les solvants sont volatiles, il faut que le réservoir soit étanche pour éviter une modification dans la composition de la solution. Par ailleurs, ceci permet la non dissolution de la vapeur d'eau et des gaz atmosphériques.

On est très souvent amené à dégazer le solvant, car selon Mr Later "des bulles dans votre spectro : c'est pas joli" (nous ne nous lançons pas dans des considérations purement esthétiques !). Pour ce faire, on passe le solvant aux ultra-sons ou on réalise un barbotage d'hélium qui est généralement peu soluble dans les liquides et qui va avoir tendance à déplacer tous les autres gaz dissouts (solubles), en particulier l'O<sub>2</sub>.

**b) Pompes (Schéma n° 2)**

On cherche à avoir des débits constants sur une colonne : les débits les plus utilisés vont de 0,1 à 3 ml/min et pour les microcolonnes de 0,01 à 0,5 ml/min.

Les pressions vont de 400 à 500 bars (elles sont donc élevées).

**a) Pompes à pression constante :**

- Présente un corps de pompe dans lequel va pouvoir s'engager un piston. L'entrée et la sortie sont commandées par des clapets à billes.

- Lorsque le piston va d'arrière en avant, il va pousser le liquide contenu dans le corps de la pompe. Le liquide se dirigera vers la colonne. Arrivé en bout de course, le piston revient en arrière ce qui crée une dépression : il y a réaspiration de la phase mobile qui était contenue à l'intérieur du réservoir de solvant.

- On imprime sur le piston de l'air comprimé qui s'appliquera soit en avant, soit en arrière de ce dernier.

Inconvénient du système : à un moment, pendant que le piston revient en arrière, il y a un bref arrêt de pression --> la colonne travaille par à coups.

**b) Pompe à débit constant :**

- A simple déplacement.

Le piston de la seringue est relié à une vis sans fin, elle-même reliée à un moteur.

Cette pompe très simple délivre un volume très régulier, sans pulsation, mais elle présente l'inconvénient de ne fonctionner que pour un faible volume (après chaque chromatogramme il faut à nouveau la remplir). De fait, on utilisera plutôt des pompes...

- A piston :

Ce dernier est actionné par un disque excentrique à moteur. Il a un mouvement de va et vient et le débit est donné avec des pulsations. Ainsi, on utilisera volontiers une pompe...

- A piston à deux têtes :

Un seul excentrique actionne les deux têtes de pompes. Quand l'un des pistons pousse sur la colonne, l'autre piston remplit la tête de pompe opposée. On obtient un débit constant.

**c) Injecteur :**

C'est une vanne 6 voies qui comporte une boucle d'échantillonnage. On peut mettre en relation des voies différentes.

1. La pompe injecte l'éluant dans la colonne, l'échantillon est dans la boucle.
2. L'éluant rentre dans la boucle, il pousse l'échantillon qui est alors éjecté dans la colonne.
3. L'échantillon est réintroduit dans la boucle d'échantillonnage à l'aide d'une seringue. Les boucles font de 5 à 100  $\mu$ l

**d) Colonnes :**

La majorité des colonnes sont des tubes en acier inoxydable comportant à leur extrémité inférieure une capsule en acier inoxydable fritté qui permet le passage de la phase mobile. A l'intérieur de la colonne se trouve la phase stationnaire. Le fait de travailler à des pressions allant de 4 à 500 bars permet d'expliquer l'emploi de l'acier.

Ces colonnes ont des diamètres compris entre 2 et 5 mm et des longueurs allant de 5 à 50 cm (généralement  $l = 10 - 20$  cm). Il existe des microcolonnes dont le diamètre varie de 0,25 à 1 mm et qui ont des longueurs semblables aux précédentes.

**e) Détecteurs :**

--> Spectromètre U.V visible

On peut se placer à une ou deux longueurs d'ondes... ou utiliser des barrettes de diodes qui couvrent toutes les  $\lambda$ .

Cette méthode de détection est peu spécifique et peu sensible : 1 ng de substance par ml.

--> **Fluorimètre et spectrofluorimètre**

Méthode spécifique et plus sensible : 0,1 ng/ml, mais elle nécessite la présence d'éléments fluorescents.

--> **Détecteurs électroniques**

Ampérométriques :  $i = f(c)$  à 3 électrodes --> sensibilité de 0,01 ng/ml.

Coulométriques :  $Q = f(c)$  Dans ce cas, 100 % de la substance est réduite ou oxydée, alors qu'en ampérométrie, 5 % seulement peut l'être. Ainsi la sensibilité est supérieure --> 1 pg/ml.

--> **Réfractomètre différentiel**

--> **Spectromètre de masse**

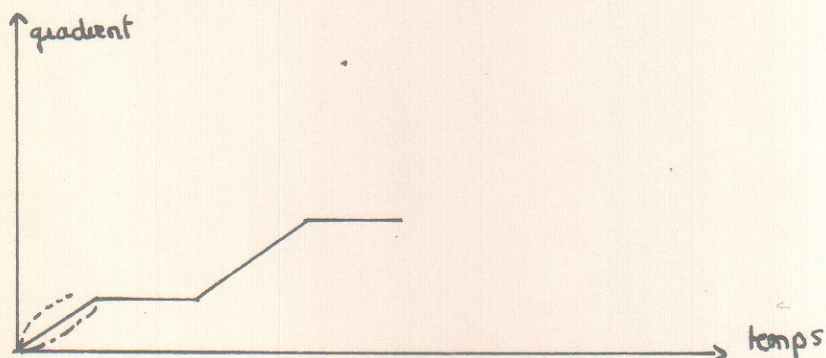
Les problèmes techniques sont importants : le volume de solvant à introduire est généralement trop important. Au-delà d'un certain volume (3 à 20  $\mu$ l) il y a perte de résolution et d'efficacité.

f) Raccords... via une plomberie importante !

### 3. Éléments complémentaires :

#### a) Appareil pour gradient :

Son objectif est de modifier la composition de la phase mobile au cours de la chromatographie. On crée des gradients de solvant, de sels, de pH. On peut avoir des gradients linéaires, convexes, concaves, en paliers.



On peut les générer en utilisant deux pompes et en jouant sur le débit de ces pompes.

Soit un solvant A = eau.

Soit un solvant B = méthanol.

On veut travailler à un débit de 1 ml/min.

Une pompe A apportera l'eau, une pompe B le méthanol. Si on veut :

100 % A et 0 % B)

A = 1 ml/min et B = 0 ml/min

80 % A et 20 % B)

les débits de A et B seront A = 0,8 ml/min et B = 0,2 ml/min.

On peut travailler avec une seule pompe qui sera reliée à deux réservoirs de solvants. Entre les réservoirs et la pompe il y a des vannes. C'est le temps d'ouverture des vannes qui va déterminer la composition de la phase mobile.

**b) Passeur et injecteur automatique****c) Thermorégulation**

On place la colonne dans un four afin d'obtenir une régulation de la température.

**d) Intégrateur - Ordinateur**

La lecture est plus rapide; surfaces des pics et concentrations peuvent être directement obtenues, du fait de la mise en mémoire de tous les chromatogrammes.

**e) Collecteurs de fractions :****f) Réacteur :**

Il est intéressant pour des composés qui n'ont pas de propriétés chimiques permettant de les détecter. On les transforme en dérivés fluorescents par exemple.

On utilise une réaction en précolonne ou en post colonne (ce dernier est généralement un grand tuyau de téflon placé en post colonne). Ce type de système est utilisé pour les chromatographies d'acides aminés.

AA + orthodiphaldéhyde  $\rightarrow$  dérivé fluorescent qui sera détecté, ce qui permet le dosage de l'AA.

**III. CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION****1. Principe :**

C'est une chromatographie solide-liquide. Les composés à séparer sont adsorbés sur la phase stationnaire. Le solide correspond à l'adsorbant, recouvert d'une couche monomoléculaire de molécules de solvant et le phénomène chromatographique sera une compétition entre les molécules de solvant et celles de soluté de la phase mobile.

On écrit une relation d'équilibre d'adsorption et de désorption :



S (m) = molécules de soluté de la phase mobile qui vont déplacer les...

M (a) = molécules de solvant adsorbé.

**2. Phases stationnaires :**

a) Nature : silice - alumine.

**b) Propriétés**

$\rightarrow$  Surface spécifique : plus la surface de ces phases est grande, plus les solutés sont retenus et plus on diminuera la longueur des colonnes (500 m / g de composé).

$\rightarrow$  Activité de l'adsorbant : elle dépend de sa teneur en eau. Elle est maximale lorsque cette teneur = 0. Plus la teneur en eau est faible, plus l'adsorbant sera actif, donc capable de retenir les solutés. On prépare les phases stationnaires par le procédé suivant : on chauffe les adsorbants (120-150° C étuve) afin d'éliminer la totalité de l'eau, puis on ajoute une quantité d'eau bien déterminée (quantité d'eau maintenue en pourcentage constant au cours de la chromatographie, pour éviter un phénomène de rétention permanente).

**3. Phases mobiles :**

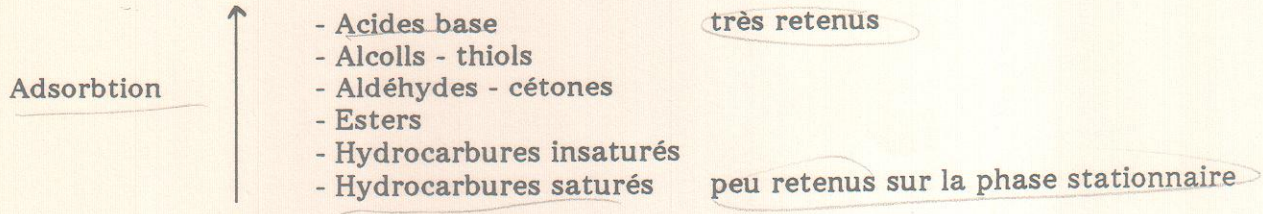
Polarité décroissante	↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hexane</li> <li>- Isooctane</li> <li>- Dichlorométhane</li> <li>- Ether éthylique</li> <li>- Méthanol</li> <li>- Acétonitrile</li> <li>- mélange de ces solvant (le plus souvent)</li> </ul>
--------------------------	---	---

**4. Conditions chromatographiques :**

**a) Pour la phase stationnaire**

- Silice = utilisée pour chromatographier des composés à caractère basique.
- Alumine = utilisée pour chromatographier des composés à caractère acide.

**b) Solutés**



**c) Phase mobile**

Si on chromatographie des composés polaires (acide ou base) il faut éluer avec un solvant polaire (éthanol...).

Si on chromatographie des composés peu polaires (hydrocarbure saturé) on utilisera un solvant non polaire (benzène...).

**5. Applications:**

Ces chromatographies s'appliquent à des composés organiques de masse moléculaire allant de 200 à 1000.

Exemple : schéma n°

**IV. CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE (CLL)**

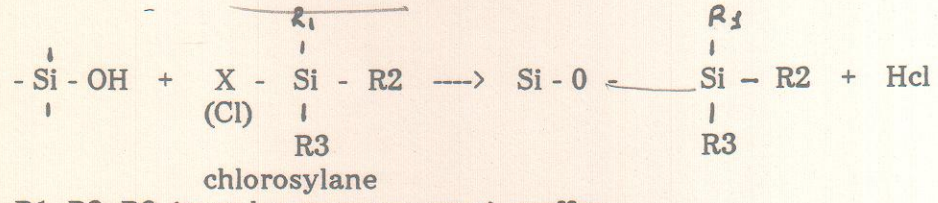
**1. Principe :**

Le liquide de la phase stationnaire est fixé sur un support poreux qui est souvent de la silice. Les phases liquides sont fixées par greffage. On distingue :

- > la chromatographie de partage à polarité de phase normale : la phase stationnaire présente des groupements polaires (qui ont été greffés); la phase mobile est peu polaire;
- > la chromatographie de partage à polarité de phase inversée : les groupements apolaires sont greffés sur la phase stationnaire; la phase mobile est polaire.

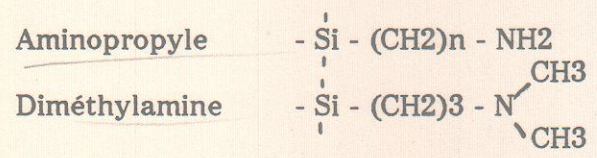
**2. Les phase stationnaires :**

a) **Le support** : Il s'agit de Si sur laquelle on fixe des groupements polaires ou apolaires par l'intermédiaire d'un chlorosylane.



R1, R2, R3 étant les groupements à greffer.

b) **Phase normale** : les groupements polaires utilisés sont :



Diamine            - Si - (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub> - NH - (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> - NH<sub>2</sub>

Nitrile            - Si - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - CN

### c) Phase inversée

Alkyle            - Si - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - CH<sub>3</sub>            n = 2 → 17

Phényle            - Si - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>

### 3. Les phases mobiles :

a) Phase normale : solvants apolaires

Hexane - Heptane - Cyclohexane.

Mélange hexane + solvant polaire en petite concentration.

(THF = tétrahydrofurane - Méthanol - acétonitrile - dichlorométhane).

b) Phase inversée : solvants polaires

Eau - Méthanol - Ethanol - Acétonitrile.

### 4. Conditions chromatographiques :

a) Phases :

→ Phase normale

- Composés polaires.

- La force éluante de la phase mobile augmente quand la polarité augmente.

→ Phase inversée

- Composés peu ou pas polaires.

- La force éluante augmente quand la polarité diminue.

b) Soluté : On peut jouer sur :

→ Le pH : en fonction du pH un composé sera sous sa forme HA (peu polaire) ou sous sa forme H<sup>+</sup> A<sup>-</sup> (polaire).

→ Les concentrations en sels : si on les augmente, on augmente la polarité (Cf schéma n° ).

### 5. Applications :

- Pour les molécules de MM < 2000.

- 95 % des CLHP sont utilisées en faisant de la chromatographie de partage, essentiellement en phase inverse 80 %.

### 6. Domaines :

- Etude des médicaments.

- Biochimie : dosage des aa, des catécholamines.

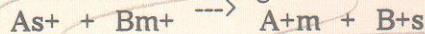
## V. CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGE D'IONS

### 1. Principe :

La phase stationnaire correspond à l'échangeur d'ions. C'est une phase solide qui comporte des groupements ionisés fonctionnels (+) ou (-) avec des ions mobiles.

Ex. : Si - SO<sub>3</sub><sup>-</sup> ⊕ H<sup>+</sup> les ions H<sup>+</sup> sont échangeables avec des ions contenus dans la solution.



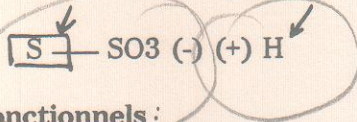
Mécanisme d'échange :

A<sup>+</sup> est un échangeur de cations. La phase stationnaire s comporte des cations A<sup>+</sup>. Dans la phase mobile il y a des cations B<sup>+</sup>. A<sup>+</sup> va pouvoir passer dans la phase mobile et B<sup>+</sup> dans la phase stationnaire.

(NB : la résine porte des groupements chargés négativement pour fixer les ions As positifs).

2. Les échangeurs :

Ils comportent une matrice et des groupements fonctionnels.

a) Groupements fonctionnels :

--> Echangeurs de cations :

- Acides forts    ■ SO<sub>3</sub><sup>-</sup>    sulfonate    (sont échangeurs √ pH)
- Acides faibles   ■ COO<sup>-</sup>    carboxylate
- CH<sub>2</sub> - COO<sup>-</sup>
- CH<sub>2</sub> - N                    amino acétate
- CH<sub>2</sub> - COO<sup>-</sup>
- PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>                    phosphanate

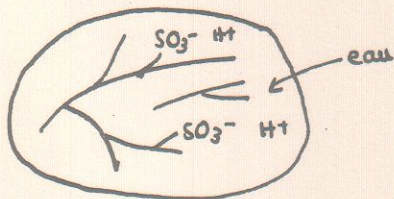
--> Echangeurs d'anions :

- Bases fortes    ■ N<sup>+</sup> (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>    ammonium IV
- NR<sub>2</sub>            amine III

b) Matrice :

--> Résines :

Elles sont habituellement obtenues par polymérisation de styrène et divinylbenzène. On obtient des grains sur lesquels on fixe des groupements échangeurs qui vont se gonfler d'eau : on parle de solvation.



on a donc une phase liquide à l'intérieur de ces grains

Le taux de pontage est le pourcentage de divinylbenzène nécessaire à l'obtention de la résine (80 % généralement). C'est ce taux qui fait que les mailles seront plus ou moins lâches et donc que les ions pénétreront plus ou moins bien. Si on souhaite des échanges faciles il faut un taux faible... mais la résine perd ses propriétés mécaniques (mauvaise résistance à la pression). Autrement dit : Plus le pourcentage est grand, plus les porés de la résine sont petits, plus le gonflement est faible et plus la résistance mécanique des grains est grande.

--> Echangeurs pelliculaires

Le support peut être un grain de résine : il y a un taux de pontage très élevé si bien que les groupements fonctionnels sont seulement situés à l'extrémité de ce dernier. Les capacités de liaison sont donc beaucoup plus faibles.

--> Silices échangeuses d'ions

Silices que l'on fait réagir avec un chlorosylane de manière à obtenir des groupements situés à l'intérieur et à l'extérieur.

==> Avantage des résines : capacité d'échange très importante. Mais : mauvaises propriétés mécaniques (si pression --> se déforment).

Les échangeurs pelliculaires : ont une capacité d'échange très faible. Mais une très bonne résistance mécanique.

Les silices échangeuses d'ions sont un compromis des deux autres résines.

### c) Mécanismes d'échange et séparation

--> Echange simple :



$$d = \frac{|B+s|}{|B+M|} \times \frac{|A+M|}{|A+s|} = \frac{K_B}{K_A} = \text{constante de partage}$$

Plus la constante de partage est grande, plus l'ion est solidement fixé à la résine.

Par ordre de constantes de partage décroissantes :

Anions : citrate >  $SO_4^{2-}$  > oxalate >  $I^-$  >  $NO_3^-$  >  $Br^-$  >  $Cl^-$  > formiate > acétate >  $OH^-$  >  $F^-$

Cations :  $Ba^{2+}$  >  $Pb^{2+}$  >  $Ca^{2+}$  >  $Ni^{2+}$  >  $Cu^{2+}$  >  $Mg^{2+}$  >

$Ag^+$  >  $K^+$  >  $NH_4^+$  >  $Na^+$  >  $H^+$  >  $Li^+$

--> Réactions chimiques couplées :

- Acide Base : considérons un acide aminé ( $NH_2-\overset{R}{\underset{|}{C}}-COOH$ ). Si on utilise un échangeur de cations, on se placera en milieu acide pour amener l'AA sous la forme  $NH_3^+-\overset{R}{\underset{|}{C}}-COOH$ .

Si on veut éluer la résine, on augmentera le pH et on aura  $NH_3^+-\overset{R}{\underset{|}{C}}-COO^-$

- Formation de complexe : si ■ Si  $Fe^{3+}$ , utilisation de HCl -->  $FeCl_4^-$

--> Equilibre de DONAN :

C'est un partage de soluté entre la phase mobile à l'extérieur de la résine et le solvant (eau) à l'intérieur de la résine. On peut :

- séparer des molécules non chargées,
- exclure certains ions à l'intérieur de la résine.

### 3. Phase mobile :

On utilise des solutions aqueuses de sels. On joue sur le pH, la force ionique.

### 4. Conditions chromatographiques :

#### a) Phase stationnaire :

Selon que l'on veuille échanger des cations ou des anions, on choisira un échangeur de cations ou d'anions.

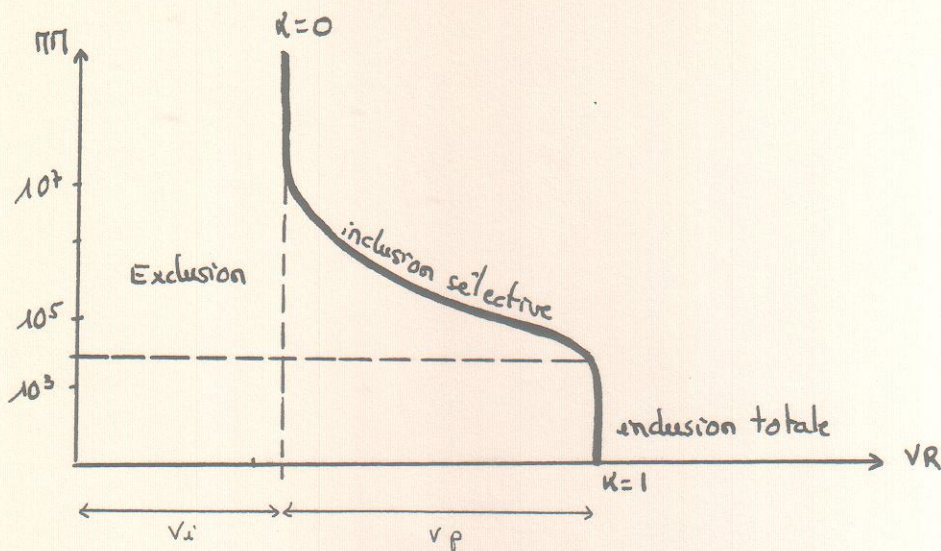
#### b) Phase mobile :

- pH
- Force ionique
- Ion développeur : se fixe en fonction de l'affinité de l'ion échangeur. Si l'ion a une constante de partage élevée, on choisira aussi un éluant qui a une constante de partage élevée.

### 5. Applications

Molécules ionisées ou ionisables (acides aminés...)





NB : Ceci est un exemple.

## 2. Phases stationnaires :

### a) Caractéristiques

- Diamètre des pores.
- Consistance : si on veut faire de l'CLHP, il faut des gels.
- Affinité pour les solutés : tenir compte des phénomènes qui peuvent se surajouter (liaisons hydrogènes...)

### b) Nature

--> Gels semi-rigides : se prêtent à la CLHP conventionnelle.

- Dextrane = polymère de glucose (= Septadex<sup>(R)</sup>)
- Agar, Agarose = polymères de Galactose (= Sépharose<sup>(R)</sup>)
- Polyacrylamide = polymère de l'amide acrylique.

--> Gels rigides :

- Polystyrène (billes)
- Verre poreux (billes)
- Silice poreuse (billes).

## 3. Phase mobile

Dans les domaines nous intéressant ce sont en général des solutions aqueuses salines.

## 4. Applications

--> Séparation de molécules de taille très différente :

On fait du désalage de molécules en excluant toutes les grosses molécules et en laissant entrer les autres (petites).

--> Séparation de molécules de taille voisines (pour les protéines, IgA et IgM)

Il faut une différence de MM suffisante : entre 5000 et 2000 par exemple. La séparation ne peut se faire pour des masses trop proches : 5000 et 5200.

--> Détermination des poids moléculaires

On trace la courbe du paragraphe 1 après avoir chromatographié des molécules de PM connu. Connaissant le volume de rétention, on détermine la masse. Ceci n'est valable que si la molécule est de forme sphérique.

CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE : Choix de la méthode

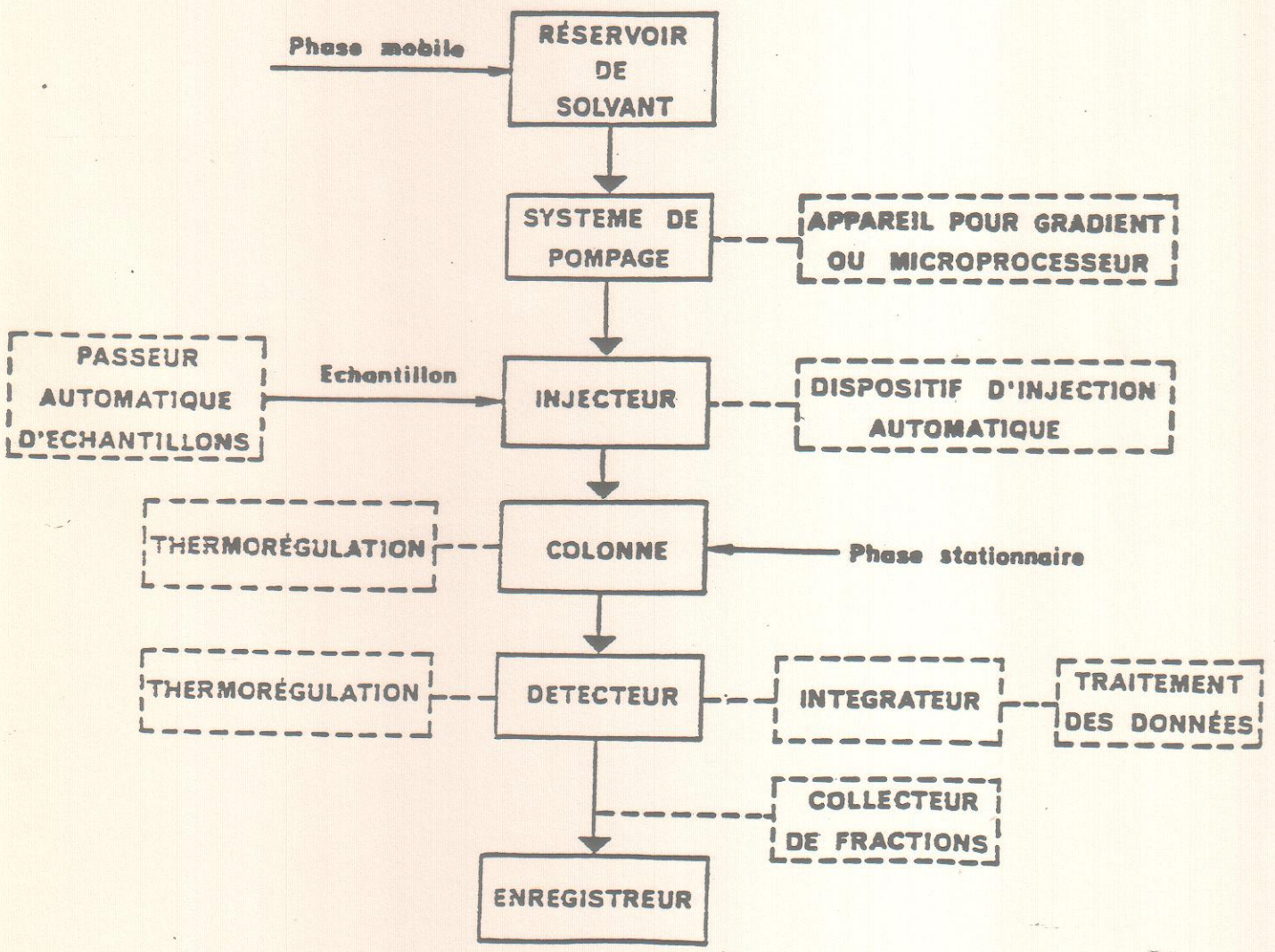
- Si composés volatiles
  - Si composés sensibles à la chaleur
  - Si composés non ionisés
- } => CPG

La CLHP est plus performante au niveau des séparations du fait d'un grand choix des phases stationnaires. La CPG est plus sensible.

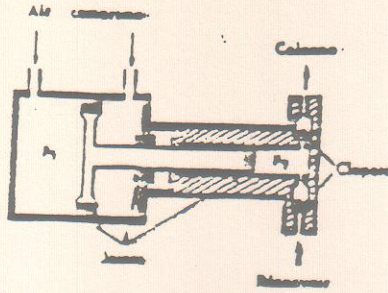
- Pour la CPL (chromatographie en phase liquide) on se réfère au schéma n° 6 (PM > 2000 ou PM < 2000).

NB : La phase polaire = phase normale.

. SCHEMA DE PRINCIPE

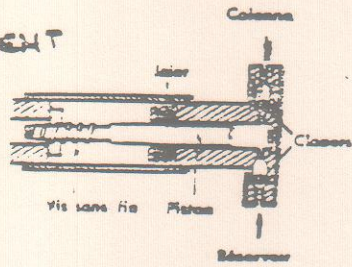


A. POMPE A PRESSION CONSTANTE

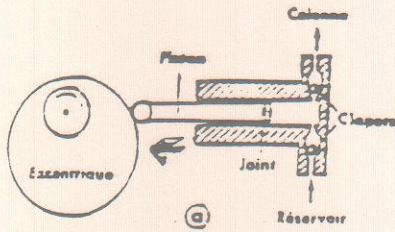


B. POMPES A DEBIT CONSTANT

A SIMPLE DEPLACEMENT  
(Seringue)



A PISTON



A PISTON ET  
DIAPHRAGME

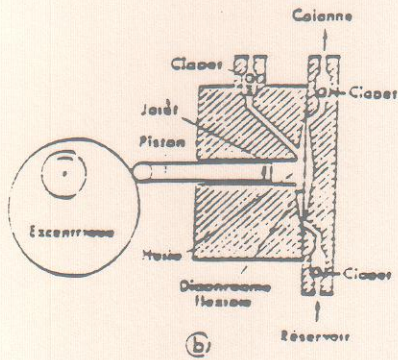
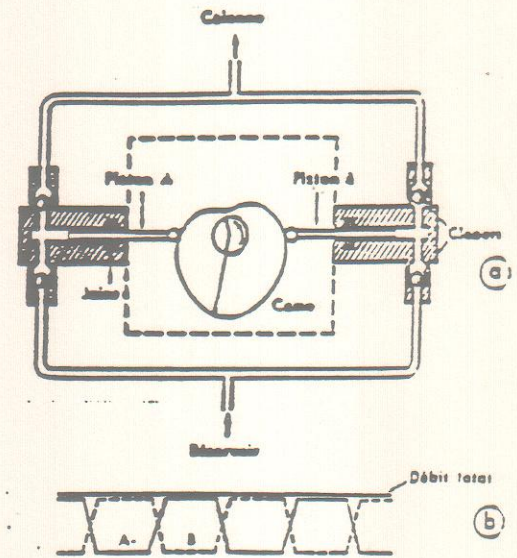
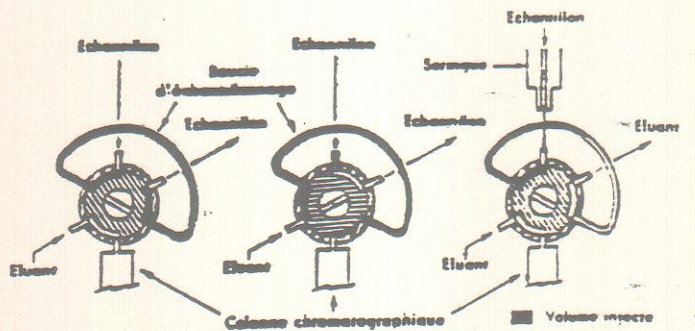


schéma 3

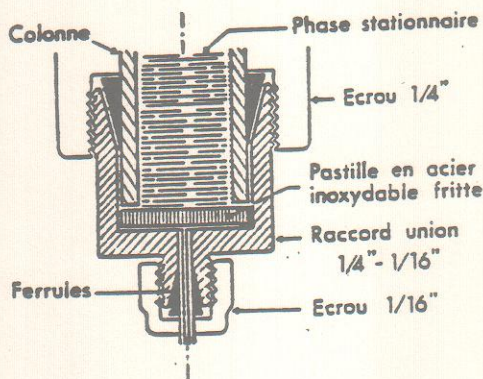
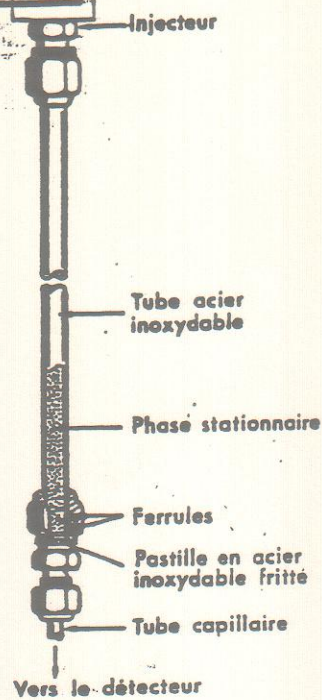
A Piston et à deux têtes



C. INJECTEUR



## 2.d) COLONNES



### schema 5

Substances de PM > 2 000

Substances de PM < 2 000

- a) Molécules non ionisées
- b) Molécules ionisées ou ionisables

Polarité élevée :  
Polarité faible : ou moyenne

- Chrom. d'exclusion-diffusion
- Chrom. d'adsorption
- Chrom. de partage sur phase polaire
- Chrom. de partage à polarité de phase inversée
- Chrom. par échange d'ions
- Chrom. de partage avec appariements d'ions sur phase inverse
- Chrom. de partage sur polarité de phase inversée après recul d'ionisation

### schema 6

Substances de PM > 2 000

Substances de PM < 2 000

- a) Molécules non ionisées
- b) Molécules ionisées ou ionisables

Polarité élevée :  
Polarité faible : ou moyenne

- Chrom. d'exclusion-diffusion
- Chrom. d'adsorption
- Chrom. de partage sur phase polaire
- Chrom. de partage à polarité de phase inversée
- Chrom. par échange d'ions
- Chrom. de partage avec appariements d'ions sur phase inverse
- Chrom. de partage sur polarité de phase inversée après recul d'ionisation

150

CHROMATOGRAPHIE  
EN PHASE LIQUIDE DE SURFACE

I. PRINCIPE

C'est une méthode de séparation où :

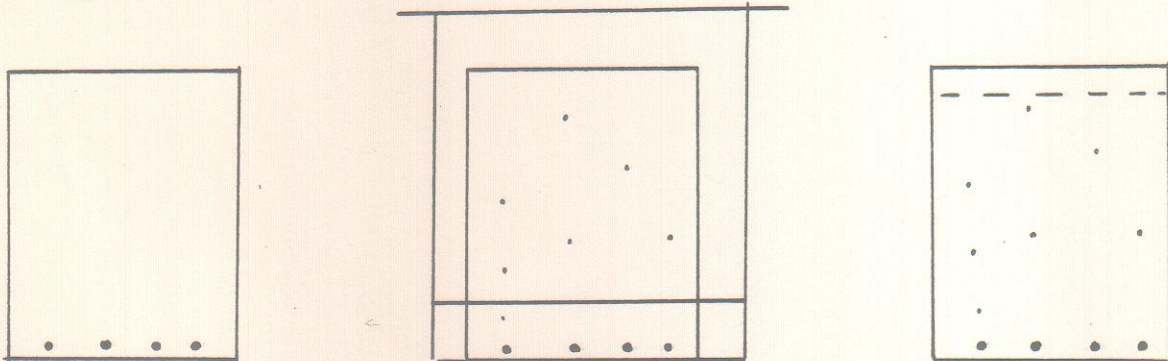
→ La phase stationnaire :

- papier,

- couche mince : couche d'un substrat solide réparti en une épaisseur uniforme sur un support comme une plaque de verre;

→ La phase mobile utilise le phénomène de capillarité pour se déplacer.

- Mise en oeuvre : on effectue des dépôts sur la phase stationnaire, on les laisse sécher et on place la couche mince dans une cuve. Il y a montée du solvant par capillarité et séparation des constituants. Lorsque le solvant a atteint une certaine hauteur, on enlève la couche mince de la cuve. Les composés sont soit déjà colorés, soit ils seront révélés à l'aide d'une réaction chimique appropriée.



$$R_f = \frac{dM}{dS}$$

II. EXPRESSION DES DISTANCE DE MIGRATION

$R_f = \frac{\text{distance parcourue par la substance}}{\text{distance parcourue par le front du solvant}}$

$R_x = \frac{\text{distance parcourue par le composé à étudier}}{\text{distance parcourue par un composé de référence}}$

$R_f < 1$

$R_x$  peut prendre des valeurs  $>$  à 1

$R_f$  et  $R_x$  ne sont pas des constantes (leurs valeurs sont modifiées par l'épaisseur de la couche, la composition du solvant, etc...)

III. LES PHASES

1. Papier

a) Phase stationnaire :

- Cellulose d'épaisseur variable et de structure variable.



- On a toujours affaire à une chromatographie de partage.  
Dans un premier temps, le papier va s'imbiber du solvant (par vapeur) puis il y a imprégnation.

**b) Phase mobile :**

- C'est souvent un mélange de solvants : alcools (butanol - phénol) avec eau.  
La chromatographie sur papier est de moins en moins utilisée car elle demande plusieurs heures, voire plusieurs jours.

**2. Couche mince**

**a) Sur un support rigide**

- Plaques de verre
- Feuilles d'aluminium
- Feuilles de plastiques insolubles dans les solvants utilisés.

**b) Type de chromatographie**

→ **Chromatographie d'adsorption :**

**Phase stationnaire :**

- Silice (lorsqu'on veut séparer des constituants à caractère basique)
- Alumine (lorsqu'on veut séparer des constituants à caractère acide)

**Phase mobile (solvants) :**

- Cyclohexane
- (- Benzène : plus beaucoup utilisé)
- Toluène
- Chloroforme
- Ethanol
- Méthanol
- Eau
- Mélange de ces solvants

→ **Chromatographie de partage :**

**Phase stationnaire :**

- Silice
  - Silice greffée
  - Cellulose (sous forme de poudre)
- Ces phases doivent s'imprégner des vapeurs de la phase liquide.

**Phase mobile : mélanges**

- Chloroforme / méthanol (pour composés peu polaires)
- Butanol / acide acétique / eau
- Phénol / eau

→ **Chromatographie par échanges d'ions :**

- Ce sont souvent des celluloses sur lesquelles on a fixé des groupements fonctionnels.  
Ces chromatographies demandent peu de matériel, sont peu contraignantes et sont rapides (moins d'une heure).

**IV. MISE EN OEUVRE**

Les chromatographies peuvent être réalisées de différentes façons :

- ascendante,
  - descendante,
  - circulaire : Eh oui, c'est un rappel du bon vieux temps... où les profs de pharmacognosie testaient par semaine le souffle de 24 étudiants en 3ème année de pharma ! Ensuite, par l'intermédiaire d'une mèche, le solvant prenait un malin plaisir à saboter ce travail de maître... il allait tout remouiller... pour une humble tâche toutefois : séparer les constituants de ce dépôt,
  - bidimensionnelle : utilisée en analyse qualitative pour les acides aminés.
- On réalise deux migrations successives dans des directions différentes. Les deux solvants impliqués ont des propriétés de séparation différentes.

## V. APPLICATIONS

- Surtout en analyse qualitative.
- . Monographies.
- . Mise en évidence d'impuretés dans les médicaments de synthèse.
- . Biologie : aminoacidémie ou aminoacidurie.

- En analyse quantitative, la précision est moins importante : on peut mesurer la dimension des taches, éluer les taches et réaliser des dosages appropriés. Cette méthode est simple, rapide (1/2 h - 1 h), sensible, sans appareillage. C'est la plus utilisée par la pharmacopée française (dernière édition ?... date de publication ?...) --> C'était seulement un test pour voir si vos neurones s'étaient bien reposés !

## ELECTROPHORESE

### I. DEFINITION

Méthode de séparation basée sur le déplacement de particules chargées, dans un milieu liquide, sous l'influence d'un champ électrique.

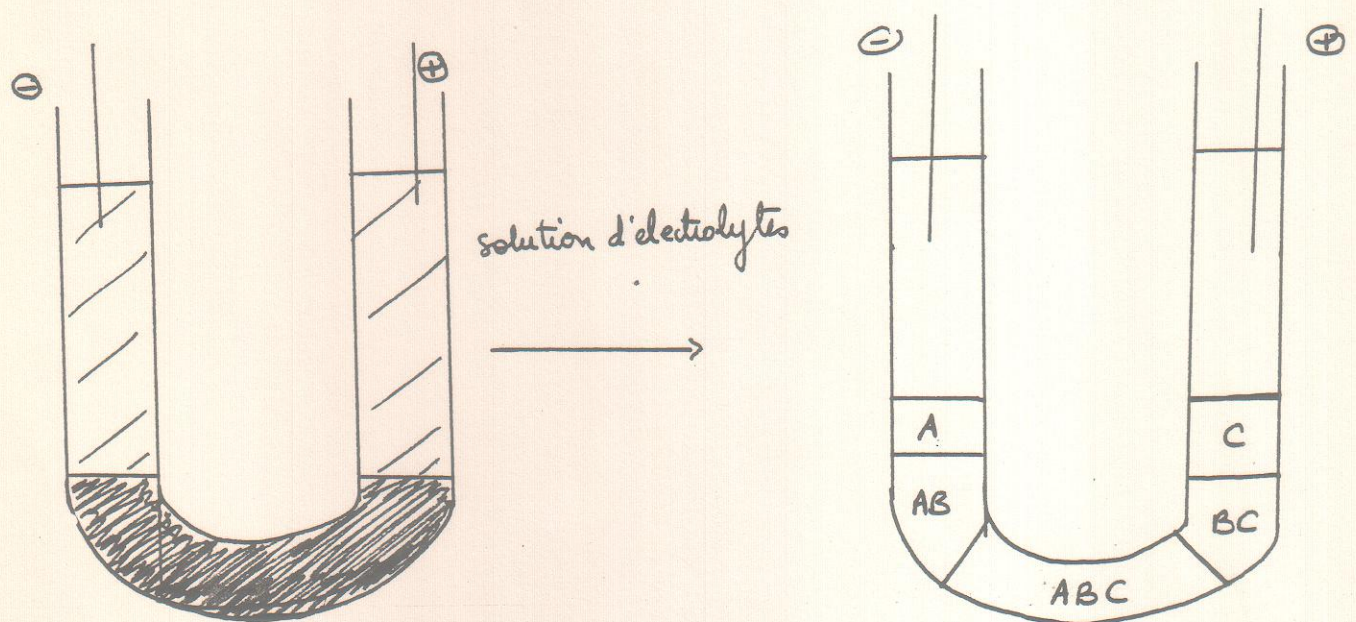
Les particules chargées peuvent être :

- des ions :  $\text{Ca}^{2+}$ ;  $\text{Fe}^{3+}$ ;  $\text{Ni}^{2+}$ ,
- des acides aminés,
- des macromolécules --> étude des protéines,
- des cellules.

On distingue l'électrophorèse de frontière et l'électrophorèse de zone.

### II. ELECTROPHORESE DE FRONTIERE = EN VEINE LIQUIDE

#### 1. Principe :



Le tube en U à faces parallèles est rempli d'une solution d'électrolytes. Au fond, on dépose le mélange de composés à séparer.

On applique une ddp de 100 à 150 V entre les deux électrodes, ce qui permet la séparation des composés du mélange : ils se sont déplacés dans la veine liquide puis séparés puisqu'ils ne se déplacent pas à la même vitesse.

On parle de frontière, car on a pas de séparation complète.

#### 2. Aspects théoriques

Ce qui provoque le déplacement des composés à des vitesses différentes...

##### a) La charge de la particule (Q)

L'origine de cette charge est l'ionisation du composé :  $\text{R-COOH} \rightarrow \text{RCOO}^-$   
 $\text{R-NH}_2 \rightarrow \text{R-NH}_3^+$

Cette dernière dépend :

- de la nature des composés, en pH alcalin migre vers l'anode (COO-)
- du pH :  $R - \begin{matrix} / \text{COOH} \\ \text{CH} \\ \backslash \text{NH}_2 \end{matrix}$  en pH acide migre vers la cathode (NH3+)
- de la force ionique,
- de l'environnement : s'il y a présence de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la solution, des complexes peuvent se former ce qui changera la charge de la particule,
- de la température : elle augmente l'ionisation.

**Le point isoionique** : est le pH pour lequel la molécule a autant de charges (+) que de charges (-).

**Le point isoélectrique** est le pH pour lequel la molécule n'a aucune mobilité.

La molécule a autant de charge (+) que de charge (-) si la molécule se trouve dans un milieu pur. Si l'environnement présente d'autres ions que des OH- et des H+, comme du Na+ ou du Ca++, il est difficile d'obtenir une protéine pure et les points isoioniques et isoélectriques sont différents.

**b) Le potentiel électrocinétique ( $\xi$ )**

Il résulte de phénomènes d'adsorption (Cf document n° 2).

La particule solide est la protéine } on a provoqué une ionisation des COOH  
On est placé en milieu alcalin }  
On a donc la protéine sous la forme COO-.

Des ions  $\text{K}^+$  vont venir entourer la molécule et la neutraliser. A nouveau des ions négatifs vont venir neutraliser les charges (+). On trouve par suite une couche contenant des charges (+) et (-). On parle de double couche Helmholtz.

- Dans un solvant pur :  $\xi = \frac{1}{\epsilon} \cdot \frac{Q}{r}$   
Q = charge particule  
 $\epsilon$  = constante diélectrique du solvant  
r = rayon de la particule.

- Dans une solution d'électrolytes :  $\xi' = \frac{\xi}{1 + A r \sqrt{\mu}}$   
A = constante pour une température et un milieu donné  
 $\mu$  = force ionique de la solution d'électrolytes.

**c) Mobilité électrophorétique**

Elle est caractéristique d'une molécule donnée.

- Dans un milieu non ionique  
Sur la particule, une force F s'exerce :  $F = E \times Q$  E = champ électrique  
Q = charge particule

Le champ provoque la migration de la particule avec une certaine vitesse. Mais il s'exerce une force de frottement due à la viscosité du milieu :

$F' = 6 \pi r \eta v$   $\eta$  = viscosité  
 $v$  = vitesse particule

A un certain moment  $F = F'$  et la vitesse devient constante :

$E \times Q = 6 \pi r \eta v$   
 $v = \frac{E \times Q}{6 \pi r \eta}$

La mobilité : est la vitesse de la particule pour un champ électrique de 1 volt/cm :

$\mu_0 = \frac{v}{E} = \frac{Q}{6 \pi r \eta}$

Comme  $Q = \sum \epsilon \cdot r \Rightarrow$

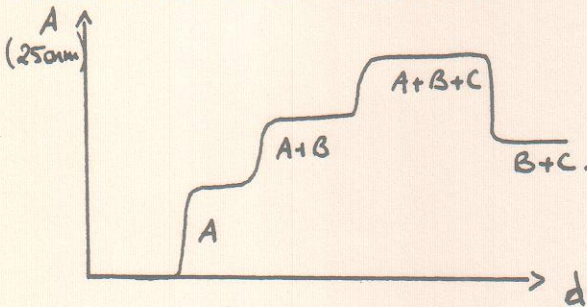
$$\mu_0 = \frac{\sum \epsilon \cdot \epsilon}{6 \pi \eta}$$

- Dans un milieu ionique :

$$\mu = \frac{\sum \epsilon' \cdot \epsilon}{6 \pi \eta} = \frac{\epsilon}{6 \pi \eta} \times \frac{Q}{\epsilon \lambda (1 + A \lambda V \mu)} = \frac{\mu_0}{1 + A \lambda V \mu}$$

### 3. Mise en oeuvre : Cf document n° 1 (voir principe)

Pour interpréter on utilise la spectrométrie UV : on balaye le tube avec un faisceau (en fait on déplace le tube devant ce faisceau).



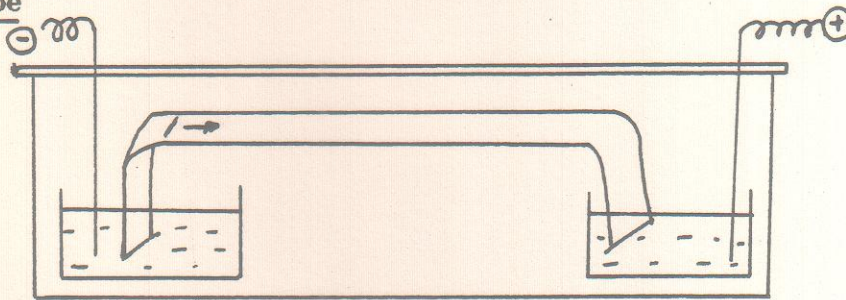
### 4. Applications

Elles sont peu nombreuses.

On utilise cette méthode quand on veut connaître la mobilité électrophorétique d'une particule.

## III. ELECTROPHORESE DE ZONE (sur support)

### 1. Principe



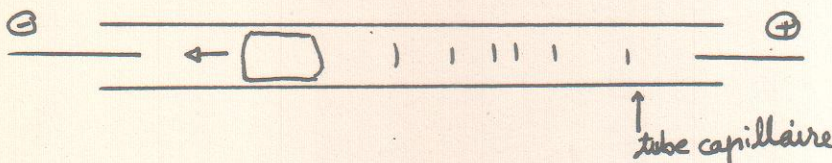
Un support joue le rôle de veine liquide : il plonge dans deux bacs contenant une solution d'électrolytes. Ce support est également imbibé de cette solution.

On fait par suite un dépôt du mélange à séparer. Dans les conditions les plus courantes, la migration s'effectue vers l'anode (on travaille en milieu alcalin). A la fin de l'électrophorèse, on obtient des zones avec des composés complètement séparés et non plus des frontières.

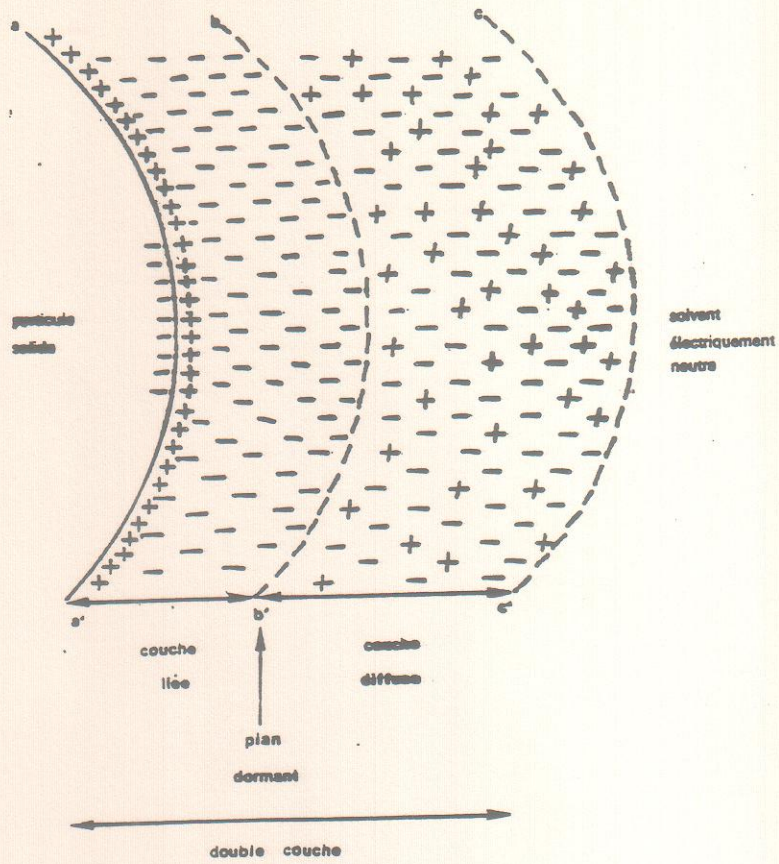
### 2. Déplacement électrophorétique

#### a) Phénomène principal

→ Le mouvement d'électroendosmose

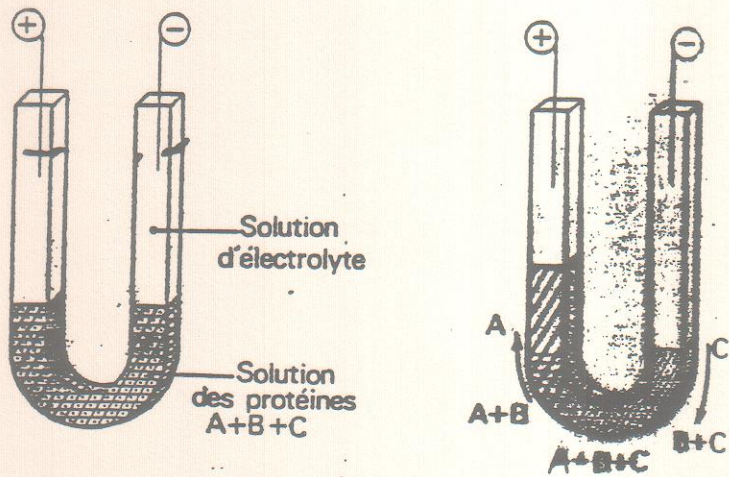


Electrophorèse  
Schéma n°2



3. MISE EN ŒUVRE

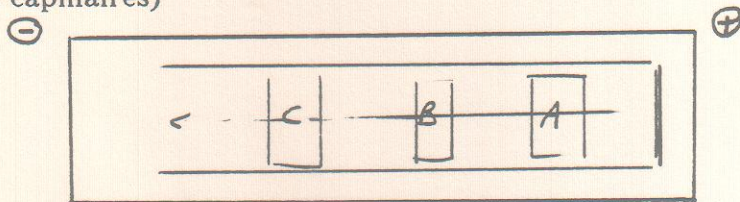
schéma n°1



4. APPLICATIONS

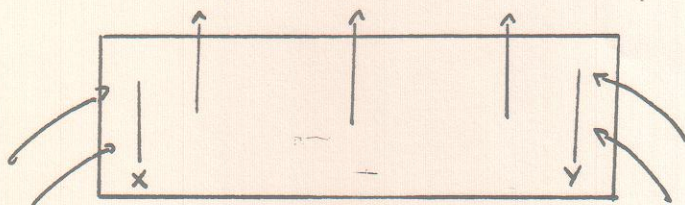
La bulle d'air se déplace vers le pôle négatif. Pour expliquer ce phénomène, on considère que la surface du tube capillaire possède des charges (-). Les électrolytes présents dans la solution vont chercher à neutraliser ces charges. Il y a donc une répartition inégale des charges dans cette veine liquide. Les charges (+) vont se déplacer vers la cathode et il y a ainsi un déplacement de toute la veine liquide dans ce sens.

Ce phénomène observé dans les tubes capillaires est pareillement observé sur le support (série de tubes capillaires)



#### → L'évaporation :

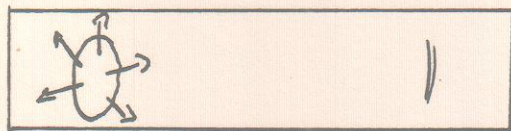
On a un échauffement par effet joule : il y a remontée de solution par capillarité.



Selon le dépôt, il y aura accélération ou décélération du déplacement des composés du mélange à séparer.

#### → La diffusion

Il y a étalement de la zone.



#### → La nature du support

Certains supports possèdent des groupements ionisés qui vont interagir avec des molécules que l'on veut séparer.

### 3. Mise en oeuvre

#### a) Appareillage

- On se place dans une enceinte fermée.
  - Un générateur de courant continu permet d'appliquer une ddp entre les deux électrodes.
- On travaille avec des ddp de 100 V généralement.
- Deux bacs.

#### b) Solutions d'électrolytes

On utilise des solutions tampons pour avoir un pH déterminé.  
On travaille surtout en milieu alcalin vers pH environ 8 ou 9.  
On utilise fréquemment des tampons à base de Barbitol.

#### c) Le support

- Papier (n'est plus utilisé).
- Acétate de cellulose (le plus utilisé). Ce sont des bande d'acétate de cellulose pur.
- Gel d'agarose (également très utilisé).
- Gel d'amidon.
- Gel de polyacrylamide.

#### d) Mode opératoire

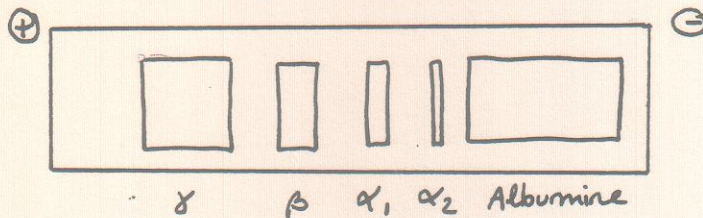
- La bande support est imbibée de la solution d'électrolytes.
- Les gels ont généralement été dissous dans cette solution, lors de leur formation.
- On dépose quelques  $\mu\text{l}$  ou des fractions de  $\mu\text{l}$  sur la bande et on applique rapidement la ddp pour limiter la diffusion.
- Lorsque la migration est terminée, on enlève et on sèche le support.

#### e) Révélation

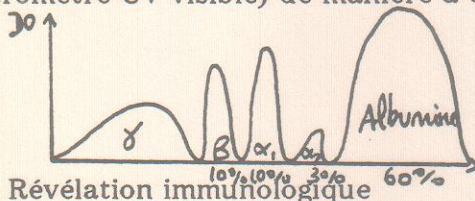
- **Qui utilisent les propriétés chimiques des protéines** : colorants comme :
  - . le rouge ponceau --> coloration des protéines en rouge,
  - . le noir amide --> coloration des protéines en bleu (et oui !),
  - . le bleu de coomassie.

La bande est plongée dans une solution de ces colorants pendant quelques minutes. Puis on passe le support d'électrophorèse dans des solvants successifs de manière à n'avoir que la coloration correspondant à la fixation du colorant sur les protéines à étudier.

On obtient 5 fractions pour les protéines sériques :



On réalise une densitométrie de ces bandes (que l'on fait défiler devant la fenêtre d'un spectromètre UV visible) de manière à obtenir :

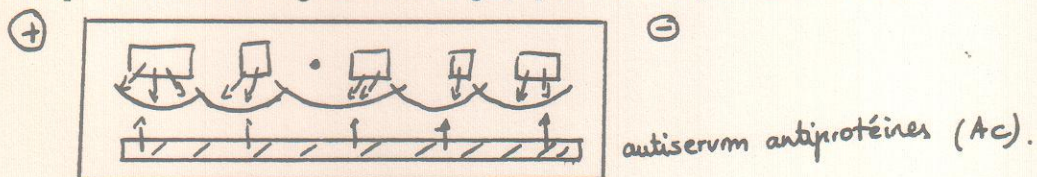


le résultat est donné en pourcentage de la surface totale.

- Révélation immunologique

. par immunoelectrophorèse : on utilise un gel d'Agarose au niveau duquel s'effectue la séparation des protéines (dépôt sous forme d'un point).

On découpe ensuite une rigole dans le gel, que l'on remplit d'un antisérum antiprotéines.



On met à profit le phénomène de diffusion. A un certain moment il se forme un complexe Ag-Ac insoluble et qui, par conséquent, précipite.

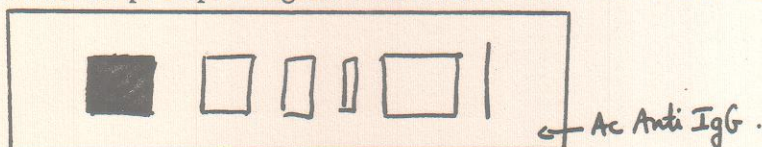
On obtient des arcs de précipitation : chaque arc correspondant à une protéine particulière. On précipite les protéines avec l'alcool, on lave pour éliminer l'excès de protéines, complexes, on les révèle avec des colorants.

Dans chaque zone il y a plusieurs protéines dont on obtient plusieurs arcs (si on emploie un sérum polyvalent : car on peut utiliser un antisérum spécifique d'une protéine).

. Par immunofixation

On imprègne la totalité du support avec un antisérum spécifique.

Il se forme un précipité Ag-Ac seulement au niveau d'une bande.



Cette méthode permet de révéler spécifiquement une protéine.



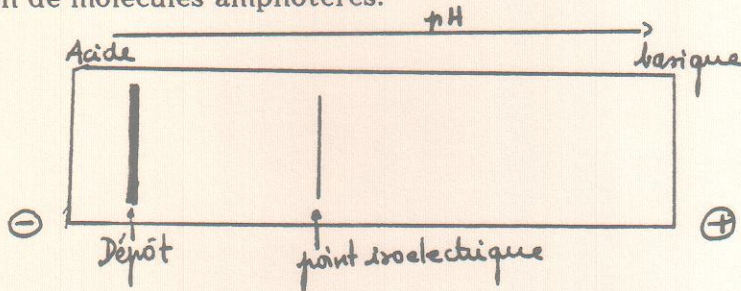
4. Applications

- Protéines simples, glycoprotéines, lipoprotéines.
- Séparation de sucres.

IV. AUTRES TECHNIQUES

1. Electrofocalisation = focalisation exoélectrique

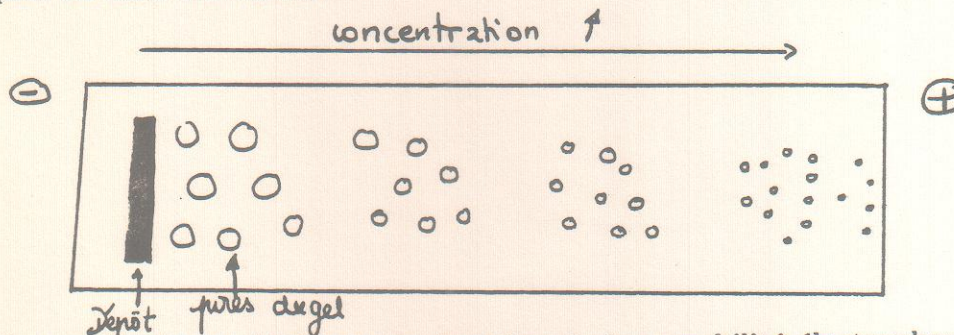
On réalise sur un support, qui est habituellement un gel, un gradient de pH par introduction de molécules amphotères.



Les protéines se déplacent jusqu'au point correspondant à leur pH isoélectrique. Cette méthode donne des bandes très fines car la diffusion ne peut s'appliquer.

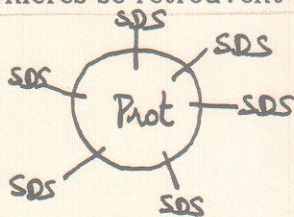
2. Electrophorèse en gradient de densité

On réalise un gradient de densité du gel (de polyacrylamide). On peut le faire sur des plaques ou dans des tubes.



Les molécules se déplacent en fonction de leur mobilité électrophorétique. Il se produit en outre un phénomène de filtration (ce phénomène dépend donc de la taille des molécules).

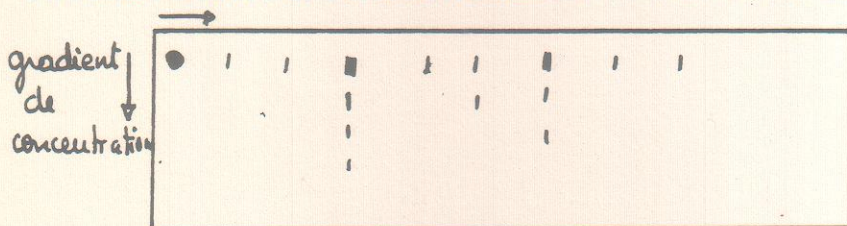
En présence de dodécylsulfate de Na (SDS) qui se fixe de manière solide aux protéines, ces dernières se retrouvent toutes avec la même charge.



Le déplacement des protéines ne dépendra plus que de leur taille.

3. Electrophorèse bidimensionnelle

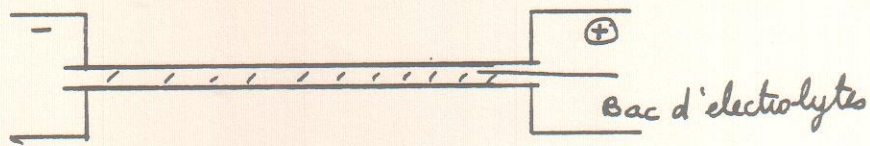
On réalise d'abord une électrofocalisation : obtention de bandes très fines.



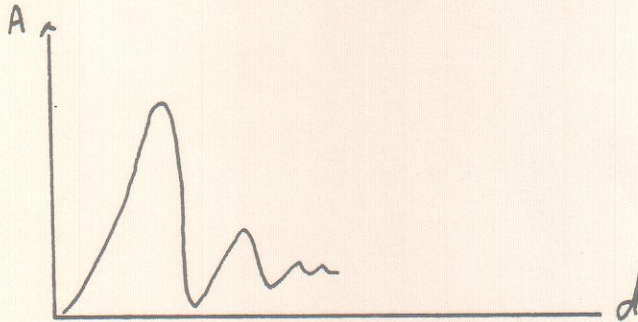
Puis on réalise une électrophorèse en gradient de concentration dans un sens différent.

#### 4. Electrophorèse capillaire

L'appareillage est très sophistiqué et se rapproche de celui de l'HPLC.  
On prend un tube capillaire fin rempli d'une solution d'électrolyte.



On provoque l'écoulement du tube à la cuve d'un détecteur de type chromatographie. On obtient un électrophoregramme (sensibilité importante).



THE END