

INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
LYON

CHIMIE ANALYTIQUE

3^{ème} ANNÉE

**METHODES SEPARATIVES
ET
SPECTROSCOPIE MOLECULAIRE**

FASCICULE 2

D. DERUAZ

1993 - 1994

IMPRESSION: AAEPL
Association Amicale des Etudiants en Pharmacie de Lyon.
8 Av. Rockefeller, 69 373 LYON CEDEX 08 Tel: 78/74/40/37.

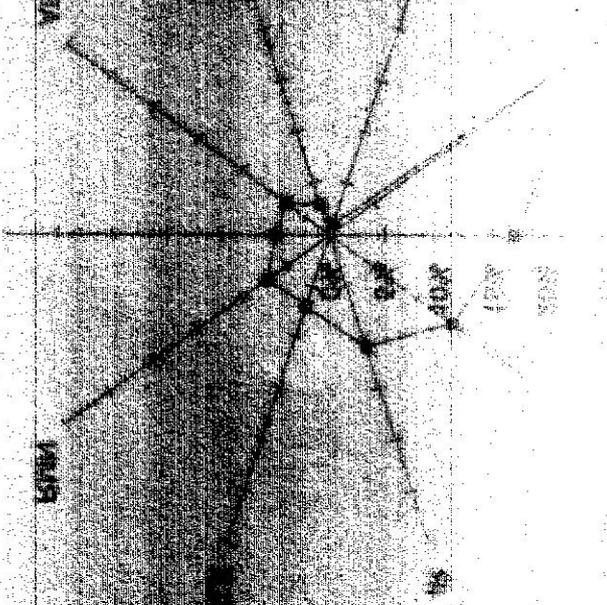
ACQUINO EPISTOLA

VITELLES NELLUM

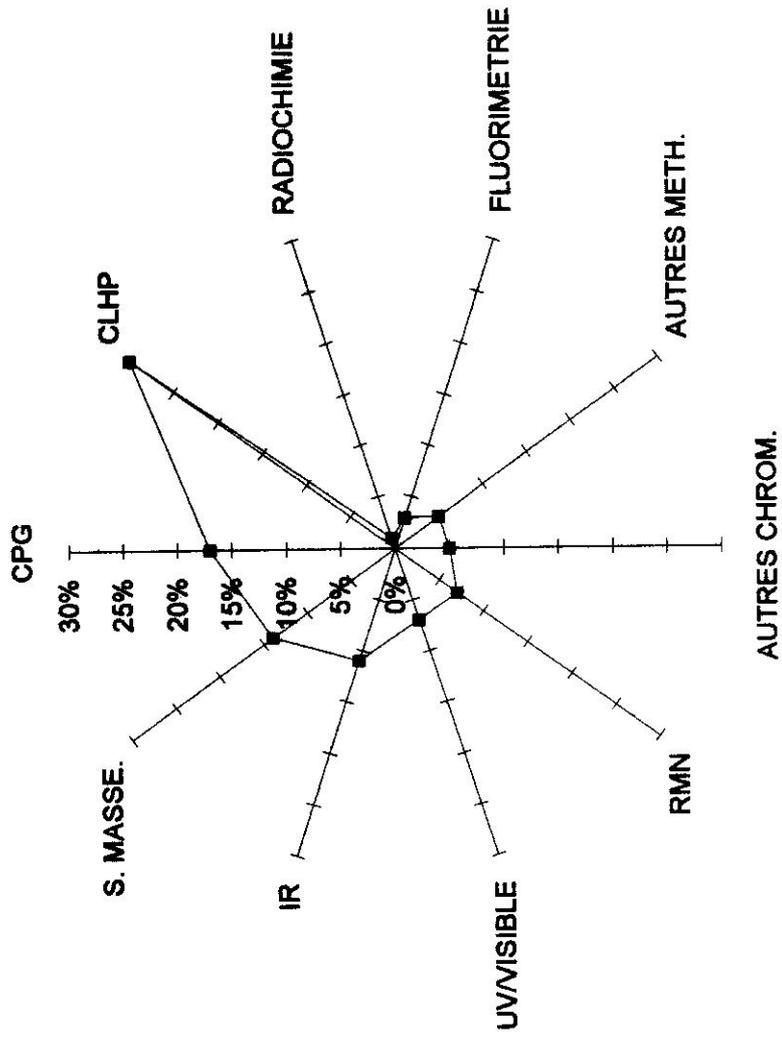
EPHRA

DE
OPERATION

EVANGELIUM



ANALYSE MOLECULAIRE EN %



EXTRACTION PAR UN SOLVANT

I - EXTRACTION UNIQUE

La séparation "extraction par solvant" est basée sur les différences de solubilité des substances dans deux solvants non miscibles. En général, un des solvants est l'eau, l'autre : le benzène, CCl_4 , CHCl_3 , l'éther-diéthylique.

On définit le *coefficient de partage* K_p , pour une espèce X comme la constante d'équilibre thermodynamique pour le partage de X entre les deux phases.

$$\lambda = [\text{X}]_B / [\text{X}]_A$$

Par exemple, si l'une des phases est l'eau (e) et l'autre un solvant organique (o) :

$$\lambda = [\text{X}]_o / [\text{X}]_e$$

Le rendement est alors:

$$\rho = Q_B/Q_A = 1 - 1/(1+\alpha) = \alpha/(1+\alpha)$$

Lorsque X se dimérise (ou se dissocie) dans l'un et/ou l'autre des solvants, on utilise un terme plus commode : le *coefficient de distribution* D_c . C'est le rapport des concentrations totales dans les deux phases.

$$D_c = [\text{Conc. tot. de toutes les formes de X}]_B / [\text{Conc. tot. de toutes les formes de X}]_A$$

Si X est un monomère indissocié dans les deux phases, $D_c = \lambda$.

A - X se dissocie dans la phase aqueuse.

Prenons un acide HA. Dans la phase organique, on a HA. Dans la phase aqueuse on a :



$$\text{Alors, } D_c = [\text{HA}]_o / ([\text{HA}]_e + [\text{A}^-]_e)$$

ou

$$D_c = \lambda \cdot [\text{H}^+]_e / ([\text{H}^+]_e + K_a)$$

B - X se dimérise dans la phase organique.

Alors $2\text{X} = \text{X}_2$ avec une constante d'équilibre $K_d = [\text{X}_2]_o / [\text{X}]_o^2$.

Le coefficient de distribution est :

$$D_c = ([\text{X}]_o + 2[\text{X}_2]_o) / [\text{X}]_e = 1 + 2K_d\lambda^2[\text{X}]_e$$

II - EXTRACTION SEQUENTIELLE

On suppose un équilibre simple des quantités $C_B V_B$ et $C_A V_A$ des formes de X dans les phases B (volume V_B) et A (volume V_A) .

on appelle :

f_B la fraction de X dans la phase B

f_A la fraction de X dans la phase A. $f_A = 1 - f_B$.

$$V_r = V_B / V_A$$

$$f_B = C_B V_B / (C_B V_B + C_A V_A)$$

On divise par $C_A V_A$

$$f_B = D_C V_r / (1 + D_C V_r) \text{ soit } f_A = 1 / (1 + D_C V_r) = 1/(1+\alpha)$$

Pour n extractions on a pour f_A : $1/(1+\alpha)^n$

Le rendement est alors:

$$\rho = 1 - 1/(1+\alpha)^n$$

Détermination des conditions optimales. Voir cours.

$$\log(1-\rho) = -n \log[1 + (\lambda V_b)/(n V_a)]$$

EXEMPLE

On procède à quatre extractions successives de 30 ml d'une solution 0.1 M de X dans du CCl_4 avec quatre quantités de 10 ml d'eau. $\lambda = 5$. Quelle est la répartition de X entre CCl_4 et les dernières portions d'eau.

on a f_B pour l'eau et f_A pour CCl_4

$$V_r = 10/30 = 1/3. D_C = \lambda = 5$$

$$f_A = 1 / (1 + 5/3) = 0.375$$

$$\text{Pour quatre extractions } f_0^4 = (0.375)^4 = 1.98\%$$

$$\text{Pour trois extractions } f_0^3 = (0.375)^3 = 5.27\%$$

EXERCICES

I - Si un acide faible se partage entre le benzène et l'eau avec un $\lambda = 100$, calculer le coefficient de distribution de cet acide pour un pH de solution aqueuse = 7 et un $K_a = 10^{-6}$ pour l'acide en phase aqueuse. Dans la phase organique cet acide est monomère.

Rep : 9.09

II - Pour rechercher, en aval d'une usine chimique, un composé organique A on prélève un échantillon d'eau. ($V = 2L$). La concentration de A dans l'eau de la rivière est trop faible pour être mesurée directement, il faut procéder à une préconcentration. A est très soluble dans l'éther $\lambda = 500$ et A est monomère dans les deux phases.

Si on utilise 25.00 ml d'éther, la concentration en A dans ce solvant est alors égale à $3.00 \cdot 10^{-3} \text{ Mol.L}^{-1}$.

- 1- Quelle était la concentration en A d'origine dans l'eau de la rivière ?
- 2- Quelle fraction de A resterait-il dans la quantité d'eau prélevée après 5 extractions successives avec 5.00ml d'éther ? Comparez cette valeur avec la fraction molaire du premierement.

Méthode de calcul et réponses

1

- a - calculer la fraction de A dans la phase aqueuse
- b - calculer la quantité de A dans l'eau de la rivière
- c - calculer la quantité de A dans l'éther
- d - calculer la concentration d'origine dans l'eau : Réponse = $4.3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

2

- a - calculer le rapport V_r du rapport des volumes
 - b - calculer la fraction d'origine dans l'eau
 - c - calculer la fraction après 5 extractions. Réponse = 0.0173 soit 1.73%.
- Le rendement est passé de 86.20% à 98.26%

CHROMATOGRAPHIE

Les méthodes chromatographiques datent du début du siècle (1903 phénomènes d'absorption et 1906 travaux du botaniste russe TWSETT, 1941 MARTIN et SYNGE chromatographie de partage, 1952 MARTIN et JAMES chromatographie en phase gazeuse).

Ce sont actuellement les plus importantes parmi celles de l'analyse immédiate. Elles ont pour but de séparer les constituants d'un mélange plus ou moins complexe, d'identifier chaque constituant ou d'aider à son identification et de déterminer quantitativement sa concentration dans le mélange.

GENERALITES

Principe

La séparation des constituants d'un mélange complexe par chromatographie est basée sur la réalisation, pour chacun d'eux, d'une suite continue d'équilibres entre deux phases.

L'une des deux phases est immobilisée. Elle est dite fixe ou stationnaire. L'autre est dite mobile car elle sert à faire parcourir cette phase par les constituants du mélange avec une vitesse déterminée. Chaque constituant du mélange est ainsi mis en contact avec les deux phases. Il se trouve entraîné par la phase mobile et lors de son parcours, il s'équilibre entre la phase mobile et la phase stationnaire un grand nombre successif de fois (figure 1). La vitesse de migration varie entre deux limites:

$V =$ celle de la phase mobile si l'équilibre est tel que le constituant ne se fixe pas sur la phase stationnaire.

$V = 0$ si l'équilibre est tel que le constituant se fixe en totalité sur la phase stationnaire.

Chaque constituant migre donc avec une vitesse qui lui est propre et si l'on fixe le temps de migration, il parcourt une distance finie ou bien, on fixe la distance et il migre alors pendant un temps qui lui est propre.

CLASSIFICATIONS

Classification selon la nature physique des phases.

La phase mobile est un fluide (liquide ou gaz). La phase stationnaire peut être un solide pulvérisé ou un liquide immobilisé par un support poreux. On distingue quatre types de chromatographie :

- chromatographie liquide-liquide
- chromatographie liquide-solide
- chromatographie gaz-liquide
- chromatographie gaz-solide

Les deux dernières sont appelées CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

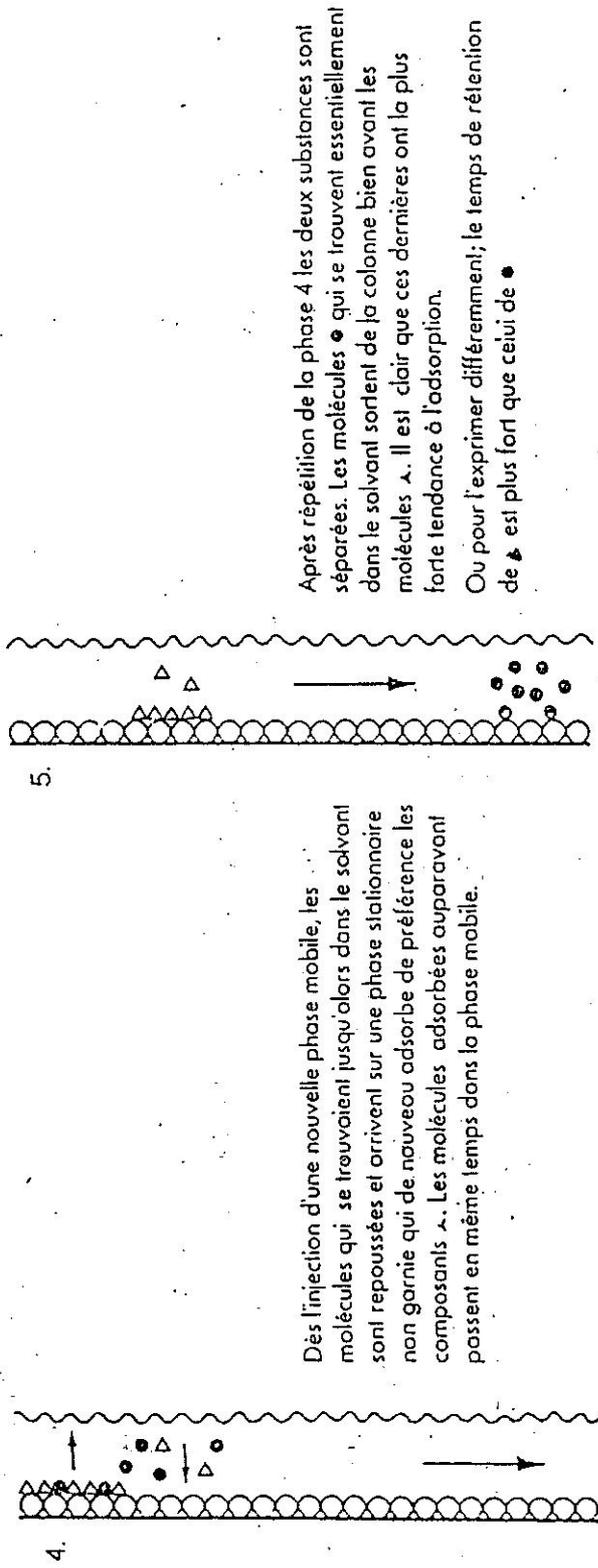
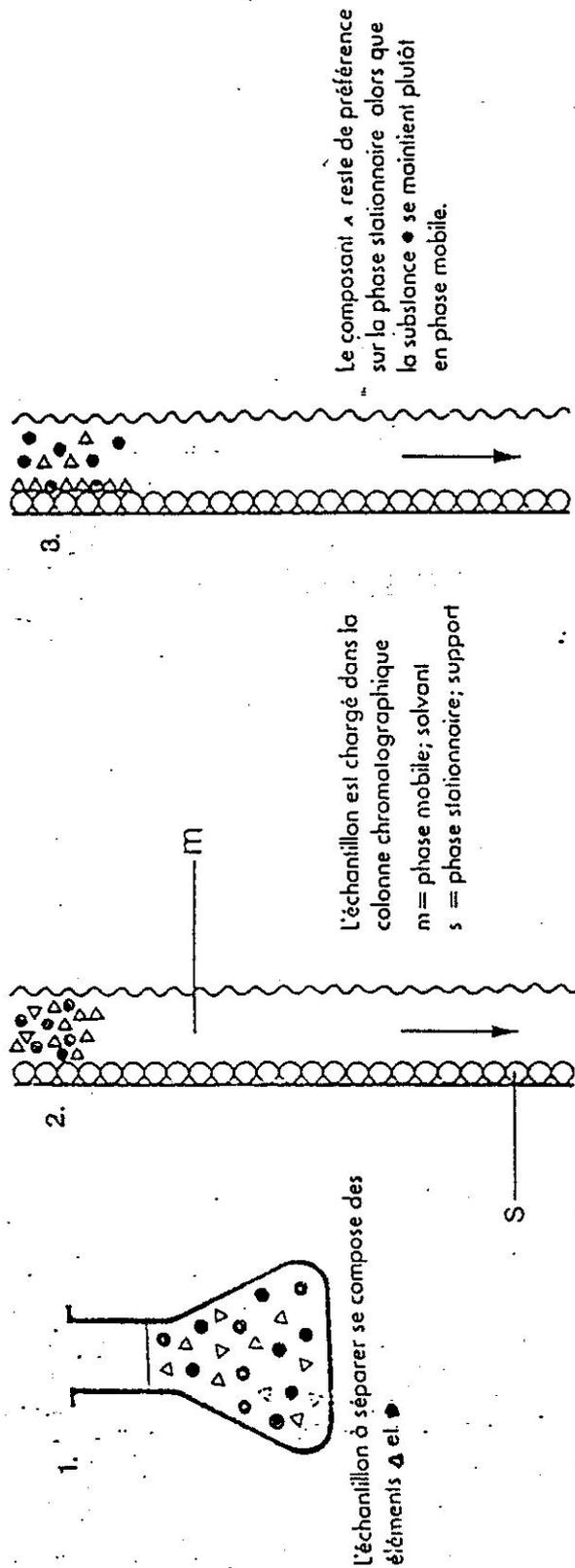


FIGURE 1

Classification selon le phénomène chromatographique (ou la nature de la phase stationnaire).

- chromatographie d'adsorption : la phase stationnaire est un solide doué de propriétés adsorbantes.
- chromatographie de partage : la phase stationnaire est un liquide non miscible à la phase mobile.
- chromatographie par échange d'ions : la phase stationnaire est une macro-molécule (résine) dont les groupements fonctionnels acides ou basiques permettent l'échange de leurs ions avec des ions de même signe du mélange à séparer.
- chromatographie d'exclusion-diffusion (séparation sur gel) : la phase stationnaire est un gel qui se comporte comme un tamis vis à vis des molécules ayant des poids et des structures différents.

Classification selon le phénomène physique mis en jeu (coefficient de partition K)

$$K = C_s / C_m$$

C_s = masse de soluté dans la phase stationnaire par unité de volume.

C_m = masse de soluté dans la phase mobile par unité de volume.

Classification selon le procédé utilisé:

- chromatographie sur colonne (CPG, CLHP)
- chromatographie sur papier (cellulose)
- chromatographie sur couche mince (CCM) : surface plane recouverte d'une mince couche (0.2 à 0.5 mm) de gel de silice, cellulose, alumine, résines.
- chromatographie par développement : les différentes substances restent sur la phase stationnaire où elles sont localisées (chrom. ascendantes, descendantes, circulaires)
- chromatographie d'élution : chaque substance est entraînée hors de la phase stationnaire.

Dans une séparation par chromatographie, on distingue trois temps:

- le dépôt de la solution sur la colonne ou le substrat qui supporte la phase stationnaire :
- le développement du chromatogramme
- l'élution

LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

I- INTRODUCTION

Cette méthode sépare des mélanges gazeux complexes par une suite continue d'équilibres entre une phase mobile gazeuse et une phase stationnaire liquide ou solide placée dans une colonne.

- phase stationnaire liquide : chromatographie de partage : CGL
- phase stationnaire solide : chromatographie d'adsorption : CGS

Dans les deux cas, c'est une chromatographie d'élution: les substances parcourent la longueur de la colonne et sont détectées à son extrémité. Elle sert pour l'analyse des gaz et de toutes molécules susceptibles d'être volatilisées.

II- APPAREILLAGE (figure 2)

Il comprend:

a - une source de gaz : azote, hélium, hydrogène ...

b - une chambre d'injection pour volatiliser l'échantillon

c - une colonne, remplie de phase stationnaire, placée dans un four et balayée par le gaz vecteur.

On distingue:

a- les colonnes remplies: elles sont en métal, en verre, en cuivre. Leur diamètre est compris entre 2 et 4 mm. Leur longueur de 1 à 2 m. Leur efficacité est comprise entre 2000 et 5000 plateaux théoriques.

b- Les colonnes capillaires : elles sont en verre ou en quartz. Leur diamètre est de 0.2 à 0.5 mm et leur longueur varie entre 20 et 150 m. Leur efficacité peut dépasser 50.000 plateaux théoriques. Par contre, elles ne peuvent pas supporter des quantités d'échantillons supérieures au micro gramme et il faut utiliser un injecteur diviseur.

d - un détecteur relié à un enregistreur, un intégrateur ou un système informatique.

Les détecteurs doivent avoir les caractéristiques suivantes :

a - bonne limite de détection (c'est la quantité de substance pour laquelle le rapport du signal au bruit de fond est égal à 3).

b - une bonne sensibilité (c'est la pente de la droite représentant le signal en fonction de la concentration).

c - un grand domaine de linéarité (domaine de concentration où la réponse du détecteur est directement proportionnelle à la concentration de l'échantillon).

d - un très faible volume mort et un temps de réponse très court (pour éviter toute perte de résolution. En général, on a volume = 1ul et $T_{rep}=0.1$ à 0.01 s.

Pour chaque composé élué, on a un signal assimilé à une courbe de Gauss dont la surface est proportionnelle à la concentration. La largeur de la base augmente avec le temps de rétention (figure 3).

III - PRINCIPAUX PARAMETRES (figure 4a et 4b)

A- Pour la rétention.

1 - Le temps de rétention (T_r) C'est le temps écoulé entre le moment de l'injection et celui où le signal atteint son maximum. T_0 = le temps d'élution d'un composé non retenu par la colonne (exemple l'air).

2 - Le volume de rétention (V_r). C'est le volume de phase mobile nécessaire pour éluer un composé.

$$V_r = V_m + K V_s$$

V_m = volume de phase mobile contenue dans la colonne

K = coefficient de partage entre la phase mobile et la phase stationnaire.

V_s = volume de la phase stationnaire

3 - Le facteur de capacité (K') ou coefficient de partage corrigé. C'est le rapport des quantités de substances qui se trouvent dans les deux phases.

$$K' = K V_s / V_m = (V_r - V_m) / V_m = (T_r - T_0) / T_0$$

Plus le composé est retenu, plus K' est grand.

B- Pour la séparation.

1- La sélectivité (α). Le facteur de sélectivité caractérise la distance entre les sommets de deux pics consécutifs. On le calcule à partir de T_0 et des T_r :

$$\alpha = (T_{r_2} - T_0) / (T_{r_1} - T_0) = K'_2 / K'_1$$

α dépend des coefficients de partage des solutés, donc de la nature de ces solutés et de la température de la colonne.

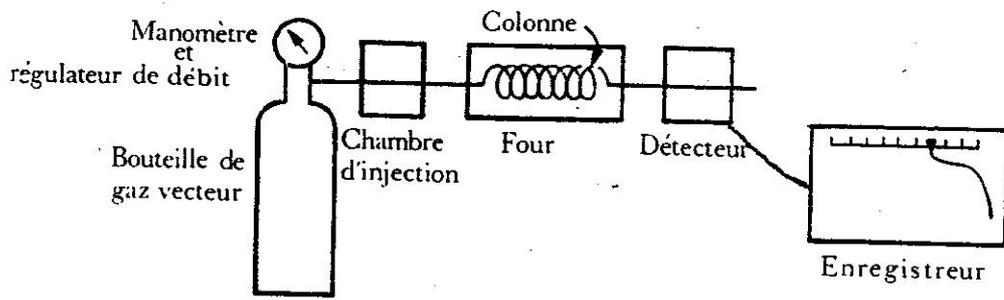


FIGURE 2

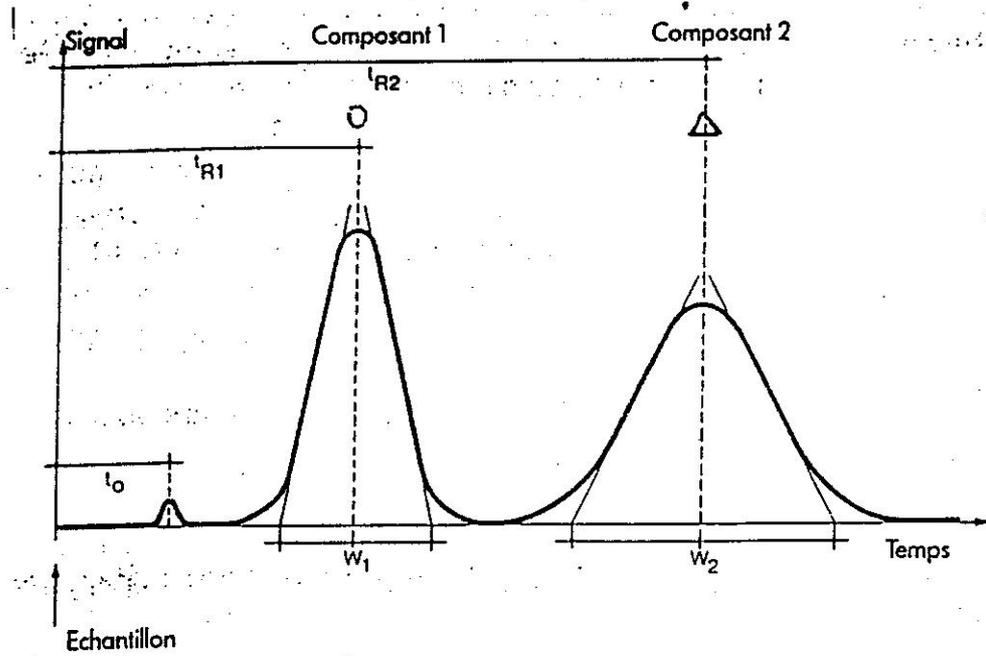


FIGURE 3

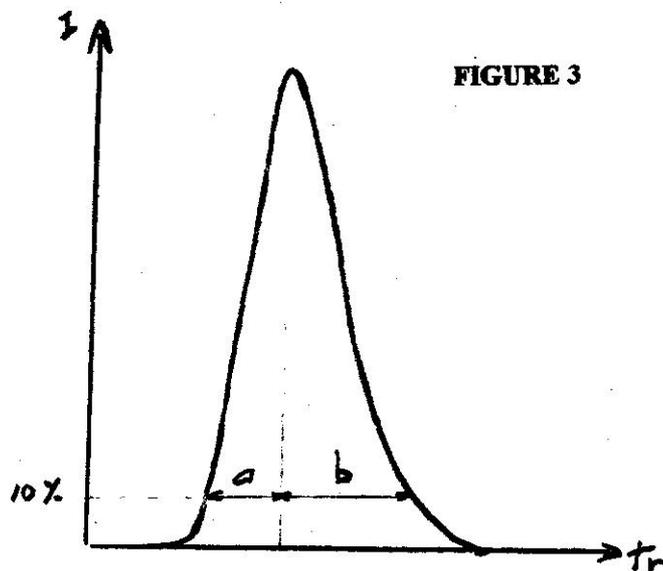


FIGURE 4 a

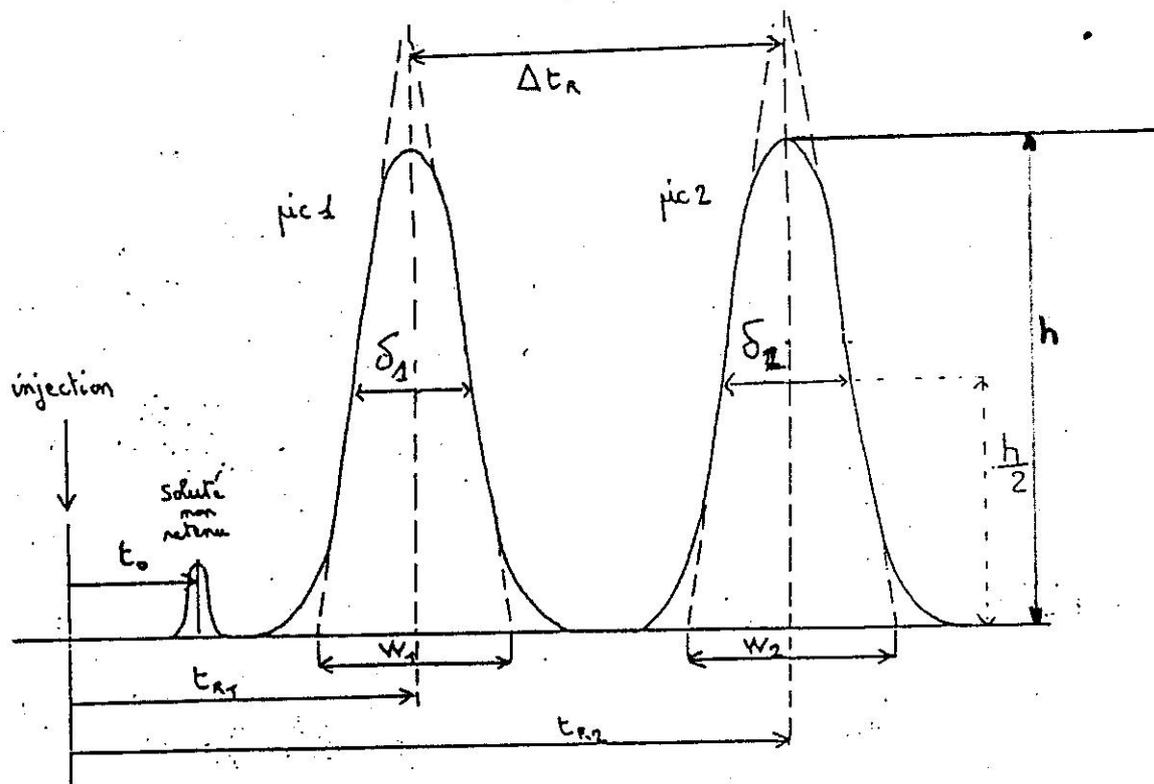


FIGURE 4b

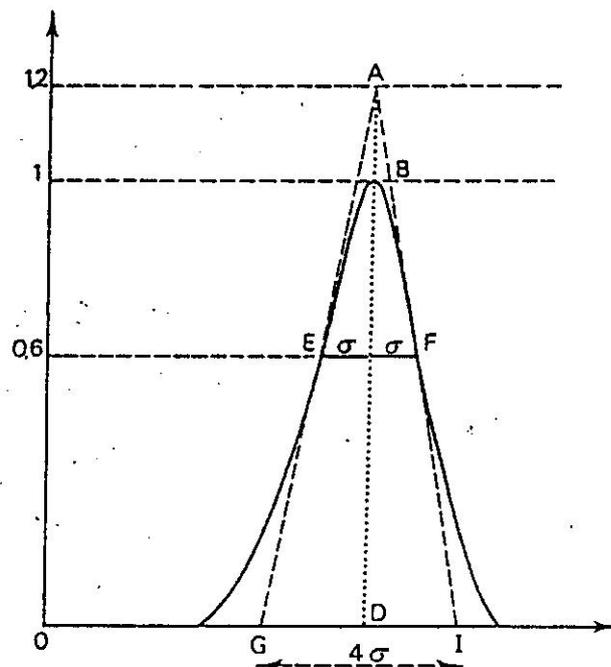


FIGURE 5

2 - La résolution (Rs).

Elle caractérise le degré de séparation de deux pics

$$R_s = 2(T_{r_2} - T_{r_1}) / (\omega_2 + \omega_1)$$

ω = distance entre les points d'intersection des tangentes d'inflexion (en mm) avec la ligne de base. Dans cette formule, on tient compte de la sélectivité ($T_{r_2} - T_{r_1}$) et de la largeur des pics (efficacité).

3 - L'efficacité.

Elle est définie par le nombre de plateaux théoriques N par unité de longueur de la colonne exprimée en mètres. C'est l'aptitude de la colonne à donner des pics très fins. La théorie des plateaux a établi que les pics d'éluion sont assimilables à des courbes de Laplace Gauss dont l'écart type σ , en unité de temps, est lié au nombre de plateaux théoriques (figure 5):

$$\sigma^2 = (T_r)^2 / N$$

On démontre que :

$$N = 16 (T_r / \omega)^2 = 5.54 (T_r / \delta)^2$$

δ = largeur du pic à mi-hauteur en mm.

On définit aussi la hauteur équivalente à un plateau théorique HEPT (H)

$$H = L / N$$

L = longueur de la colonne en mm. Plus H est faible, plus la colonne est efficace.

4 - La symétrie ou facteur de traînée.

C'est le rapport des largeurs a et b du signal à 10% de hauteur (figure 4a).

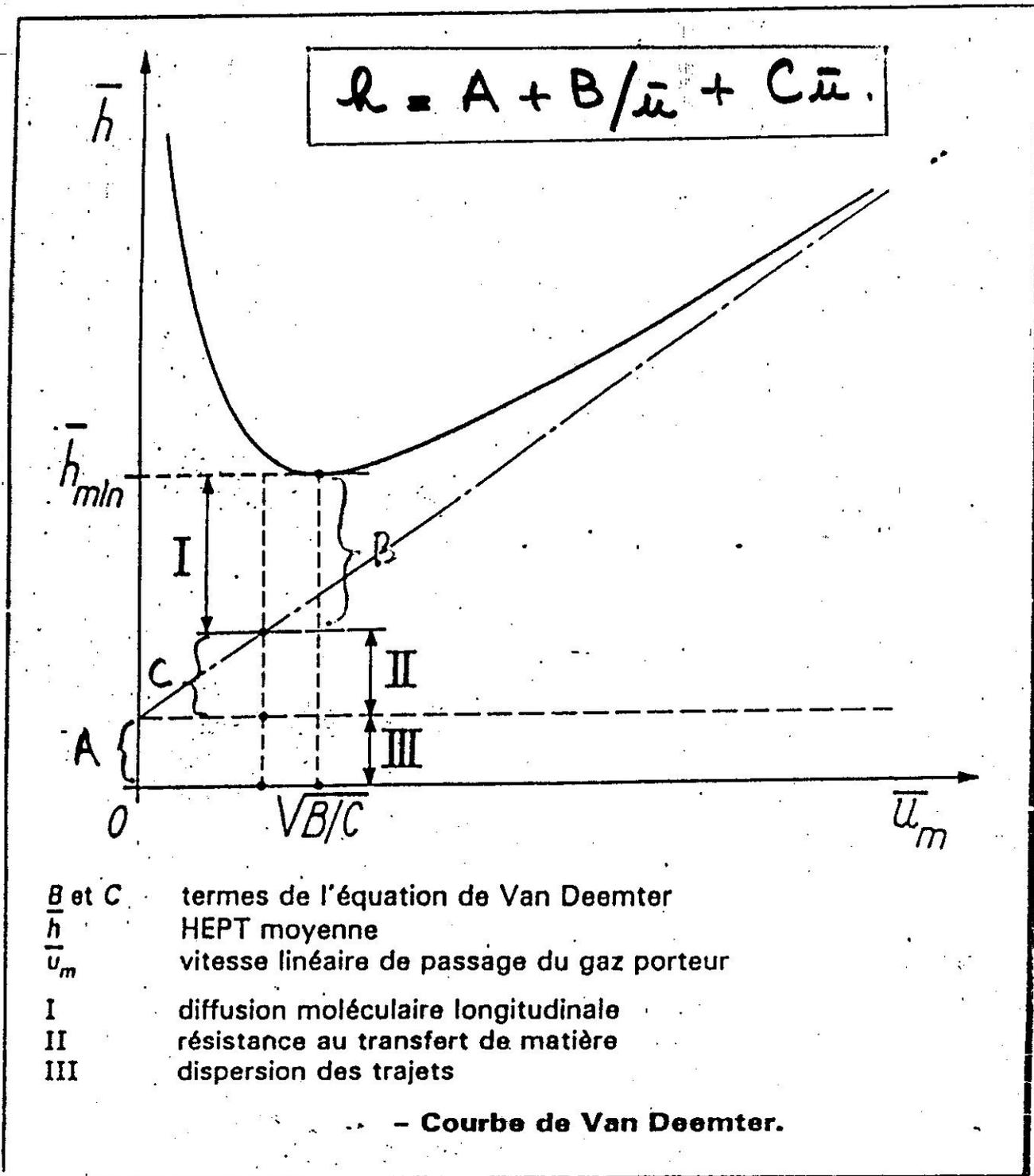
III- EQUATION DE VAN DEEMTER (figure 6)

Dans la théorie des plateaux, on néglige le fait que la chromatographie est un phénomène dynamique qui résulte du passage continu de la phase mobile sur la phase stationnaire. Dans la théorie cinétique, on lie le nombre de plateaux de la colonne (c'est à dire sa HEPT) à la vitesse d'écoulement de la phase mobile et à différents facteurs non utilisés par la théorie des plateaux.

1- Influence du débit.

$$HEPT = A + B/u + Cu$$

u = vitesse linéaire du gaz vecteur



Variation de l'efficacité en fonction du débit du gaz porteur.

FIGURE 6

A = diffusion turbulente

$$A = 2\lambda \times dp$$

λ caractérise les irrégularités de remplissage

dp = diamètre moyen des particules du support. On peut diminuer dp mais alors λ augmente.

B = diffusion moléculaire

$$B = 2\gamma Dg$$

γ = facteur de tortuosité. La tortuosité augmente avec les supports mal calibrés.

Dg = diffusion de l'échantillon dans le gaz vecteur. Dg est proportionnel à l'inverse de la racine carrée du poids moléculaire du gaz donc l'efficacité est meilleure avec un gaz dense.

C = résistance au transfert de masse

$$C = (8/\pi^2) \times (K'/(1+K')^2) \times df^2/Dl$$

df = épaisseur moyenne du film de phase stationnaire. Si on diminue df , on augmente K'

Dl = coefficient de diffusion du composé dans la phase stationnaire. Plus la viscosité de cette phase est faible pour une température donnée, plus la colonne est bonne.

Pour diminuer le facteur en K' , il faut utiliser une phase qui dissout facilement les solutés.

Représentation graphique de l'équation (figure 6)

C'est une hyperbole. Elle nous montre que la HEPT passe par une valeur minimale en fonction de u .

Pour cette valeur $H = A + 2(BC)^{1/2}$ pour une valeur optimale $u = (B/C)^{1/2}$.

Remarque: Dans la branche descendante, le terme B est prépondérant (diffusion moléculaire) : H croît avec u . Dans la branche ascendante, H croît aussi avec u car les temps de contact entre les deux phases sont de plus en plus courts et les équilibres s'établissent mal (résistance au transfert de masse).

Pour améliorer l'efficacité, on peut agir sur:

- la granulométrie.
- le débit du gaz vecteur.
- la nature du gaz vecteur.
- la viscosité de la phase stationnaire.
- l'épaisseur du film de la phase stationnaire.
- le diamètre de la colonne.

2- influence de la température

La HEPT varie avec la température de manière identique à celle constatée pour le débit.

$$HEPT = A' + B'/T + C'T$$

- H est minimale pour T optimale
- La température modifie la tension de vapeur des solutés (volatilité) et intervient sur la séparation (modification du coefficient de partage entre la phase stationnaire et la phase mobile). Si T croît, T_r et α diminuent.

Pour améliorer les séparations, on peut programmer la température. On commence par une température basse pour éluer les composés peu retenus et on l'élève progressivement pour analyser les autres substances, sous forme de pics plus étroits, et avec des temps de rétentions plus courts que ceux obtenus à T = constante.

IV- UTILISATIONS DE LA CPG

C'est une méthode utilisée à des fins analytiques qualitatives et quantitatives.

A- ANALYSE QUALITATIVE

Un composé peut être identifié par son temps de rétention, dans des conditions opératoires parfaitement fixées, en comparant ce dernier à celui d'un composé témoin par exemple. Pour éliminer les erreurs dues, parfois, à certaines variations des conditions opératoires (débit, température), on utilise les temps de rétentions relatifs :

$$T_r = T_r \text{ du composé} / T_r \text{ d'un composé pris comme référence.}$$

On utilise aussi:

1 - les indices de rétention de Kovats

Ils comparent le volume de rétention de la substance à identifier à ceux de deux alcanes linéaires qui sont élués près d'elle, ceci pour une phase stationnaire donnée. Cet indice est indépendant des conditions opératoires.

Si on injecte un mélange de n-alcanes sur une colonne quelconque en régime stable, on obtient un chromatogramme pour lequel les logarithmes des temps de rétention corrigés ($T_n - T_0$) croissent linéairement avec le nombre d'atomes de carbone des alcanes correspondants :

$$\log(T_n - T_0) = an + b$$

T_n = temps de rétention de l'alcane n

En reportant sur la droite le temps de rétention d'un composé X, on peut calculer son indice de rétention de Kovats sur la colonne considérée

Celui-ci est égal au produit par 100 du nombre de carbones de l'alcane théorique ayant le même temps de rétention corrigé.

Dans le cas où l'on ne dispose que de deux n-alcane qui l'encadrent, on utilise :

$$I_x = 100n + 100(\log t'_x - \log t'_{n-1}) / (\log t'_{n+1} - \log t'_{n-1})$$

↳ indice relatif

2 - Les constantes de Rohrschneider.

On caractérise chaque phase stationnaire en comparant les indices de Kovats de cinq composés témoins appartenant à des types structuraux différents, sur la phase étudiée d'une part et sur le squalane d'autre part (phase de référence).

Pour un composé X, les cinq cst. de Rohrschneider sont obtenues en divisant par 100 les différences observées pour chacune de ces substances entre son indice de Kovats sur le squalane ($IK_{squalane}$) et son indice sur la phase étudiée (IK_x)

$$L_{xj} = (IK_x - IK_{squalane}) / 100$$

Ces constantes permettent d'apprécier les forces d'interaction soluté phase/stationnaires car un indice élevé signifie que la phase retient fortement les composés qui portent la fonction organique correspondante.

Les indices de Kovats pour les cinq composés tests sont : 646 pour le benzène, 385 pour l'éthanol, 530 pour la butanone, 447 pour le nitrométhane, 691 pour la pyridine.

3- Les constantes de McReynolds.

On remplace trois des cinq substances témoins par leurs homologues supérieurs et on supprime la division par 100 de la différence des indices. Cette nouvelle classification est utilisée par la plupart des fabricants de colonnes.

Remarques

C'est une méthode longue. Il est préférable d'utiliser une technique de couplage.

B - ANALYSE QUANTITATIVE

Les pics d'élution sont assimilables à des courbes de GAUSS et leurs surfaces sont proportionnelles à la quantité de substance élue :

$$M_i = \alpha A_i$$

M_i : masse de la substance qui traverse le détecteur

A_i : surface du pic élué

α : facteur de réponse de l'appareil. Pour évaluer α , on injecte des quantités connues d'étalon.

1 - Mesure de l'aire des pics.

- Si le pic est étroit, la surface est proportionnelle à la hauteur du pic comprise entre la ligne de base et le sommet de signal.
- Si le pic est symétrique, on multiplie la largeur à mi-hauteur par la hauteur.

$$S = \delta_{50} \times h.$$

- Si le pic est asymétrique, on utilise

$$S = h \times (\delta_{15} + \delta_{85}) / 2$$

En général, cette opération est réalisée par un intégrateur électronique ou un ordinateur.

2 - Etalonnage interne

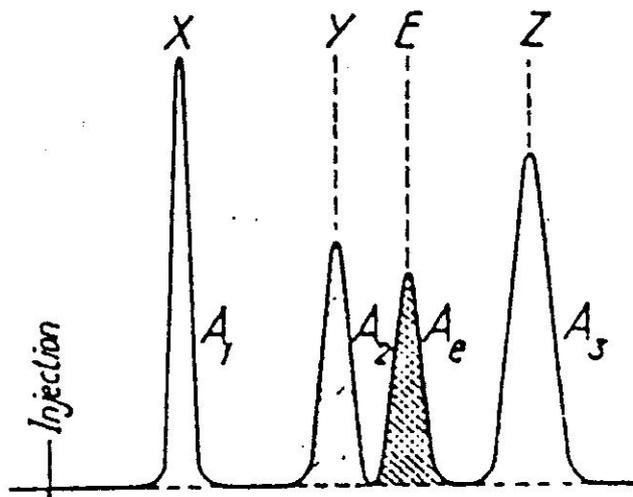
C'est la méthode la plus employée. L'étalon interne est ajouté en quantité connue au début de l'analyse à l'échantillon.

Cet étalon doit avoir les propriétés suivantes :

- avoir un temps de rétention voisin et donner un pic chromatographique complètement séparé des autres produits à doser.
- donner un pic de surface proche de celle du produit à doser.
- être pur, stable, sans interaction avec les produits du mélange.

Le rapport "surface du pic du produit à doser sur surface du pic étalon interne" comparé à une courbe d'étalonnage construite en mesurant les rapports des surfaces des pics obtenus avec des échantillons contenant des quantités connues de produit à doser, donnera la concentration inconnue. Il permet de s'affranchir de la reproductibilité parfois médiocre des injections.

Les limites de détection sont de l'ordre de quelques picogrammes. Il varie avec le type de détecteurs utilisés.



On a introduit m_e g d'étalon E dans la solution à analyser. Pour le produit Y, de masse m_2 et de coefficient de proportionnalité K_2 , on a :

$$\frac{m_2}{m_e} = \frac{K_2 A_2}{K_e A_e}$$

Si on prend $K_e = 1$, on a :

$$K_{2,e} = \frac{m_2 A_e}{m_e A_2}$$

I - Etalonnage. Pour la détermination du coefficient de réponse entre l'étalon et l'inconnu on a :

$$M_e = \alpha_e A_e \text{ et } M_i = \alpha_i A_i$$

avec α_e = coefficient de réponse de l'étalon et α_i = coefficient de réponse de l'inconnu :
alors

$$M_i/M_e = (\alpha_i/\alpha_e) \times (A_i/A_e) = \alpha_{ie} \times (A_i/A_e)$$

$$\alpha_{ie} = M_i A_e / M_e A_i$$

II - Mesure. On connaît α_{ie} , A_i et A_e . On calcule : $M_i = \alpha_{ie} \times (M_e \cdot A_i) / (A_e)$

3 - Etalonnage externe

Si un constituant est à doser dans un mélange et si les volumes injectés sont reproductibles, le tracé de la courbe d'étalonnage Réponse = f(concentration) permet de doser le constituant dans un mélange inconnu. Les étalons doivent être purs. On calcule par la méthode des moindres carrés la droite de régression $Y = aX + B$ et la mesure de Y_{inconnu} donné par X inconnu est alors facilement calculé : $X_i = (Y_i - B) / A$.

Il faut que la concentration X_i soit à l'intérieure des concentrations utilisées pour construire la gamme d'étalonnage et injecter 3 fois minimum chaque point, 5 fois si on veut utiliser l'Analyse de Variance (ANAVAR).

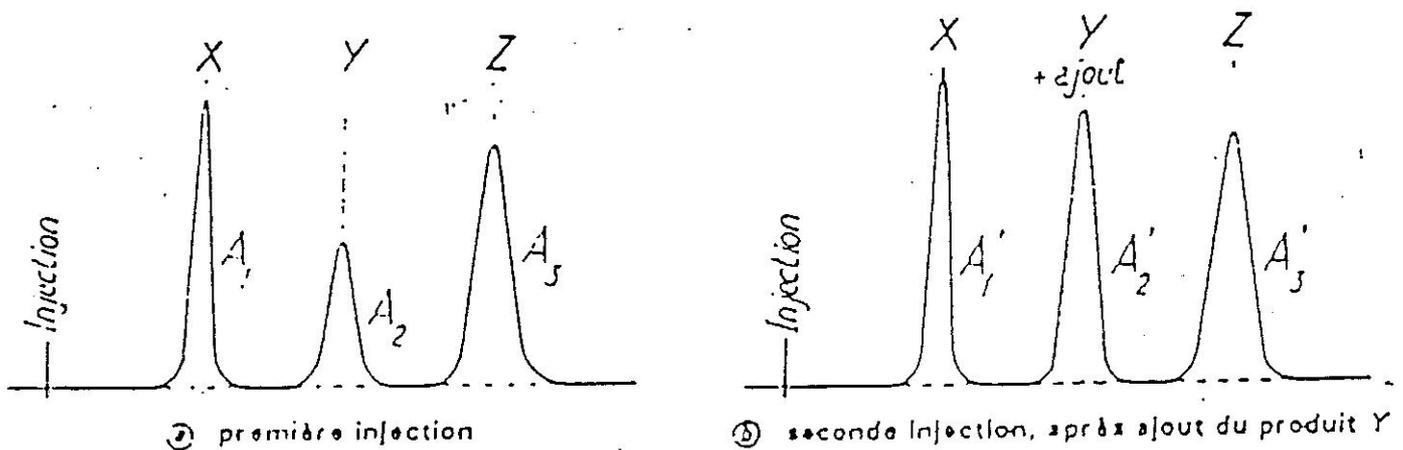
4 - Méthode des ajouts dosés

On ne peut l'utiliser que si le détecteur à une réponse linéaire.

La technique consiste à ajouter, dans des parties aliquotes de la solution inconnue, des quantités déterminées et croissantes de l'élément à doser. La courbe obtenue, en portant en ordonnées les réponses et en abscisses les quantités ajoutées, permet par extrapolation de déterminer la valeur du blanc, c'est à dire de l'élément sans ajout (voir exemple). Les quantités ajoutées sont à choisir en fonction de la valeur du blanc et doivent être voisines de 1, 2, 3 , fois la teneur à mesurer. On peut travailler aussi avec un seul ajout (voir plus bas)

Cette méthode doit être utiliser avec beaucoup de précautions (réponses parasites par exemple)

Avantages : pas besoins d'étalons nombreux, rapidité.



On a ajouté dans la solution γ % du produit Y.
Pourcentage de Y dans la solution inconnue :

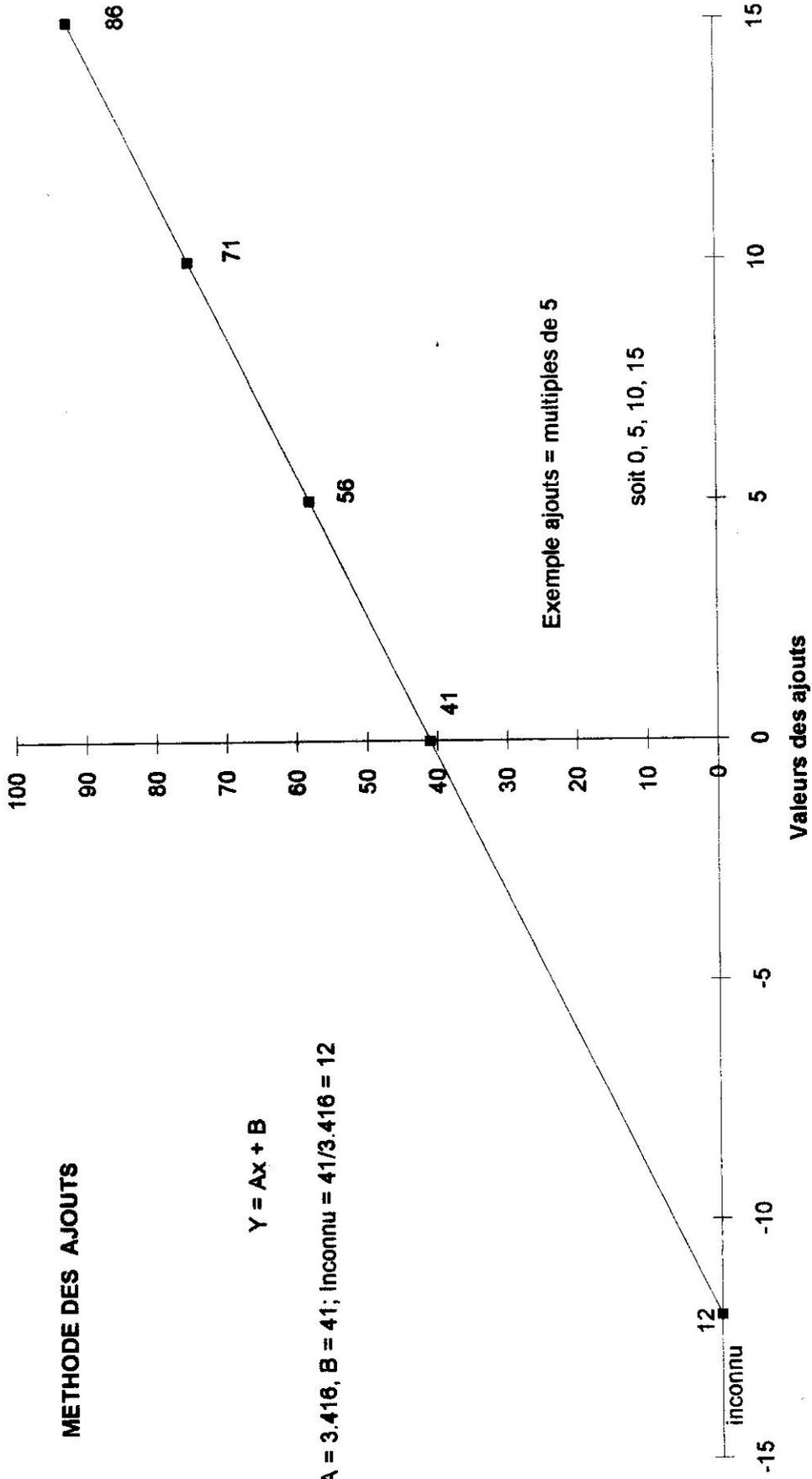
$$\gamma(\%) = \frac{\gamma A_2}{A_2 - A_1} \times \frac{A_1}{A_3} \times 100$$

METHODE DES AJOUTS

$$Y = AX + B$$

$$A = 3.416, B = 41; \text{inconnu} = 41/3.416 = 12$$

Réponse



V- APPLICATIONS

Les applications de la chromatographie en phase gazeuse ne cessent de se développer. Parmi les plus courantes, on peut citer:

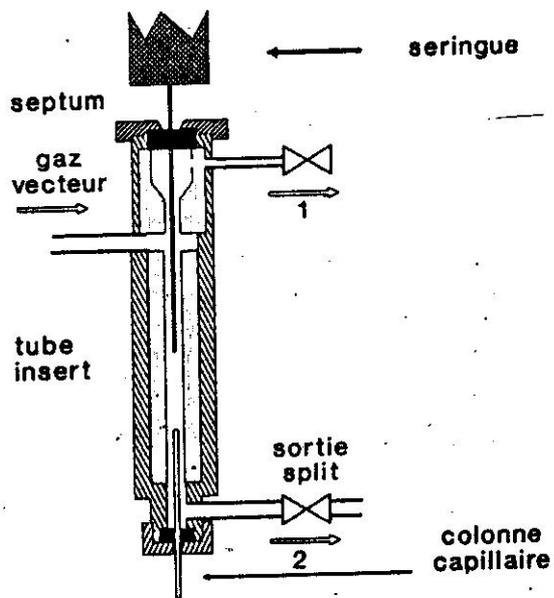
- 1 - en pharmacologie : dosage des principes actifs et métabolites dans les liquides biologiques, études de pharmacocinétique, surveillance thérapeutique, antiépileptiques, barbituriques, tranquillisants.
- 2 - en toxicologie : pesticides, médicaments et stupéfiants dans les liquides biologiques, alcools, polyols, vapeurs organiques, gaz sulfureux.
- 3 - en biologie clinique : stéroïdes, acides aminés, lipides,
- 4 - analyse alimentaire : huiles, acides gras, conservateurs, arômes.
- 5 - analyse industrielle : hydrocarbures aliphatiques et aromatiques, amines, gaz naturels
- 6 - cosmétologie : huiles essentielles.

VI - CONCLUSION

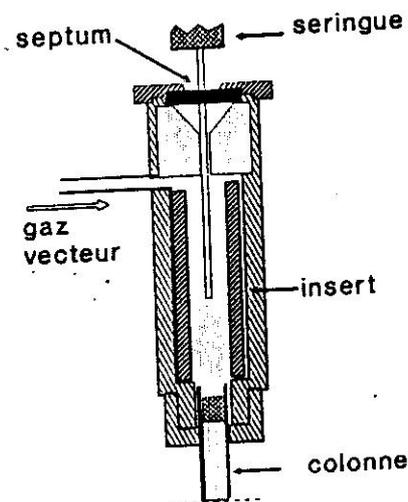
La chromatographie en phase gazeuse possède des qualités de sensibilité et de spécificité qui la place dans les premiers rangs des techniques de séparation.

C'est une technique très souple car l'opérateur peut agir sur de nombreux facteurs pour améliorer les séparations (température du four, débit du gaz vecteur, phase stationnaire).

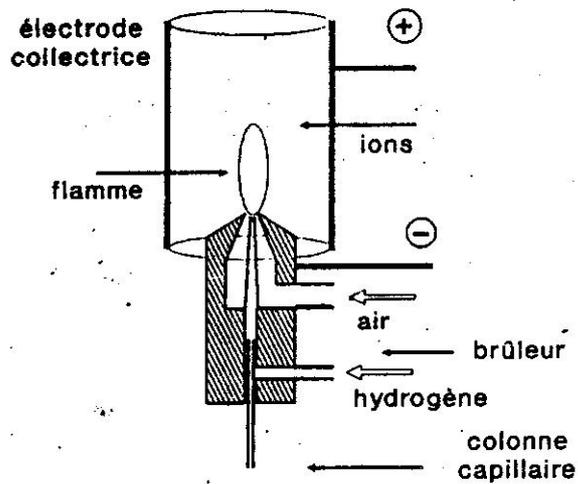
C'est une technique d'analyse rapide et son utilisation a pris un essor considérable avec les couplages spectrométrie de masse et infra-rouge.



INJECTEUR DIVISEUR POUR COLONNE CAPILLAIRE



INJECTEUR POUR COLONNE REMPLIE



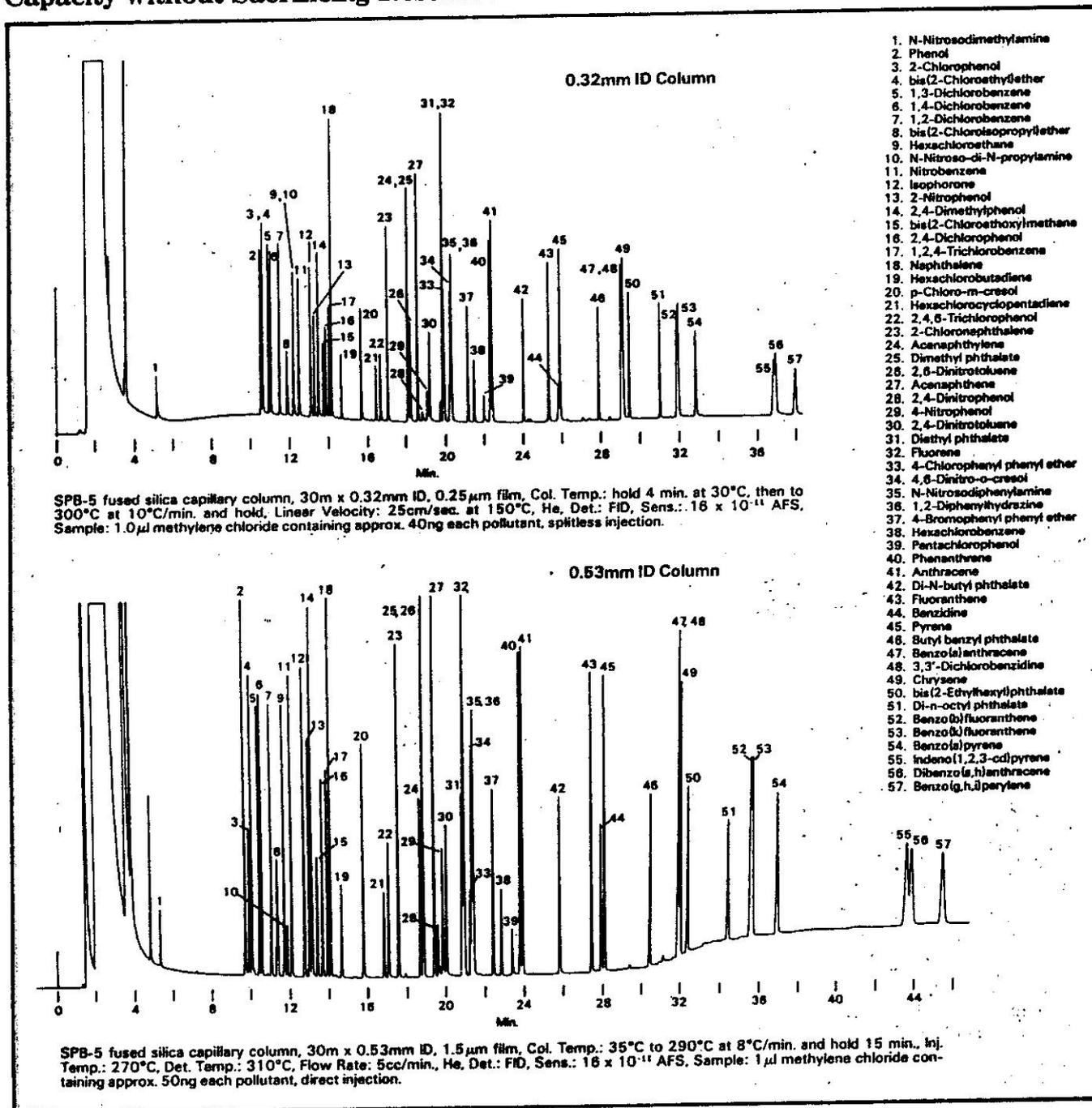
DETECTEUR A IONISATION DE FLAMME

Environmental Analyses (Water)

You Get More Capillary Column Choices at Supelco

Our complete range of column IDs lets you select the column you need for *your* specific analysis.

A 0.53mm ID Column Increases Sample Capacity without Sacrificing Resolution



0.32mm ID and 0.53mm ID SPB-5 columns provide similar resolution of acid and base/neutral pollutants for EPA Method 625. And you can use 0.53mm ID columns in packed column chromatographs.

In a GC-MS system with a high capacity pump or jet separator, a 0.53mm column combines large sample capacity (up to 2000ng/component) with rapid analyses and good resolution.

SPB-5 fused silica capillary columns,

30m x 0.32mm ID, 0.25 μ m film

Cat. No. 2-4048 \$463

30m x 0.53mm ID, 1.5 μ m film

Cat. No. 2-5305 \$532

EXEMPLE

ANALYSE QUALITATIVE DE LA CAFEINE ET DE SES METABOLITES

COLONNE OV 1701

Longueur = 50 m

Diamètre interne = 0.25

Epaisseur du film = 0.2 μm

Débit du gaz vecteur = 0.75 ml/min

1 - Caféine

2 - 1,3 DMX

3 - 1,7 dmx + 3,7 DMX

4 - IBMX (étalon)

5 - ATMU

6 - 3-MMX

7 - 1-MMX

8 - 7-MMX

9 - 1,3-DMAU

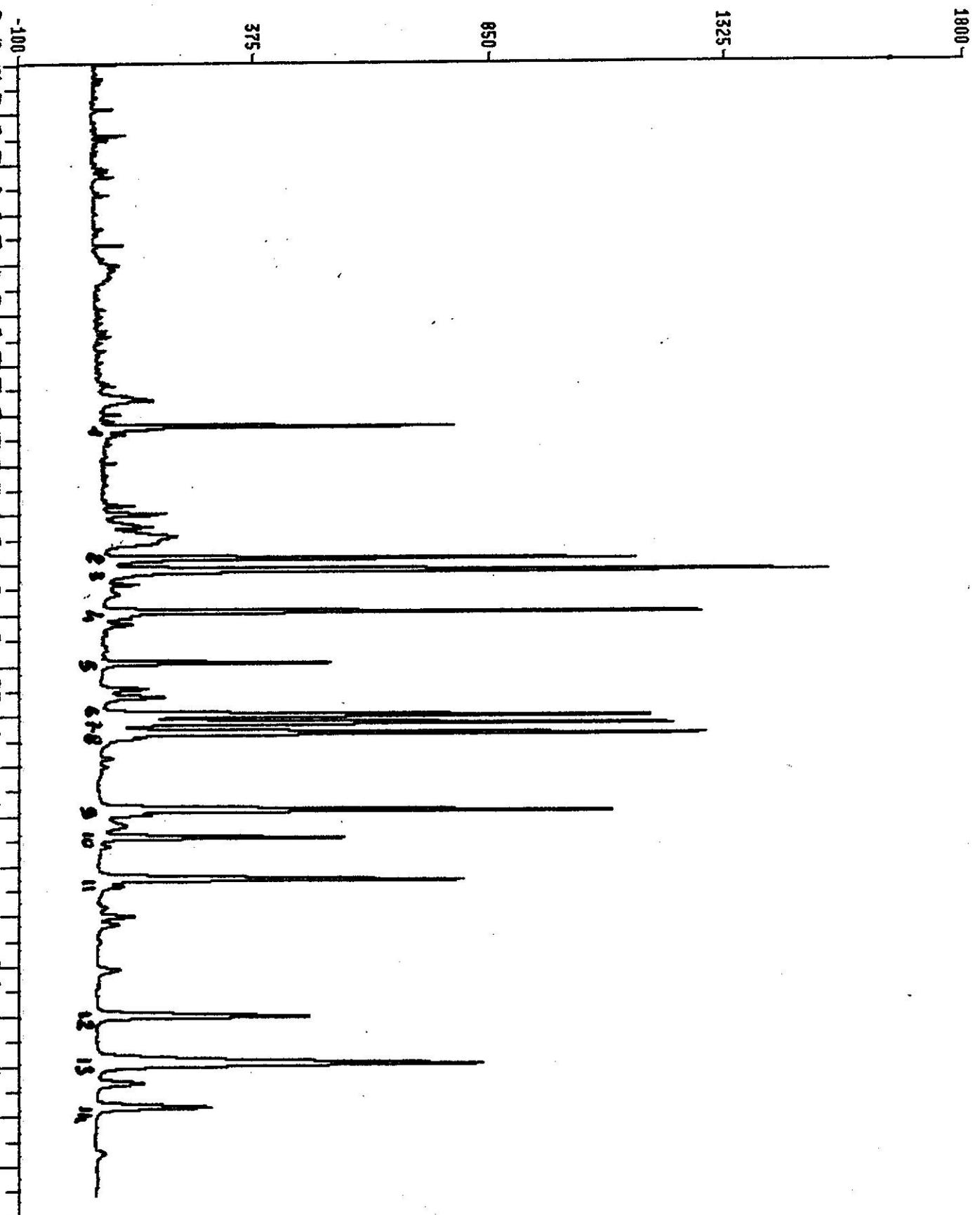
10 - 1,7-DMAU

11 - 3,7-DMAU

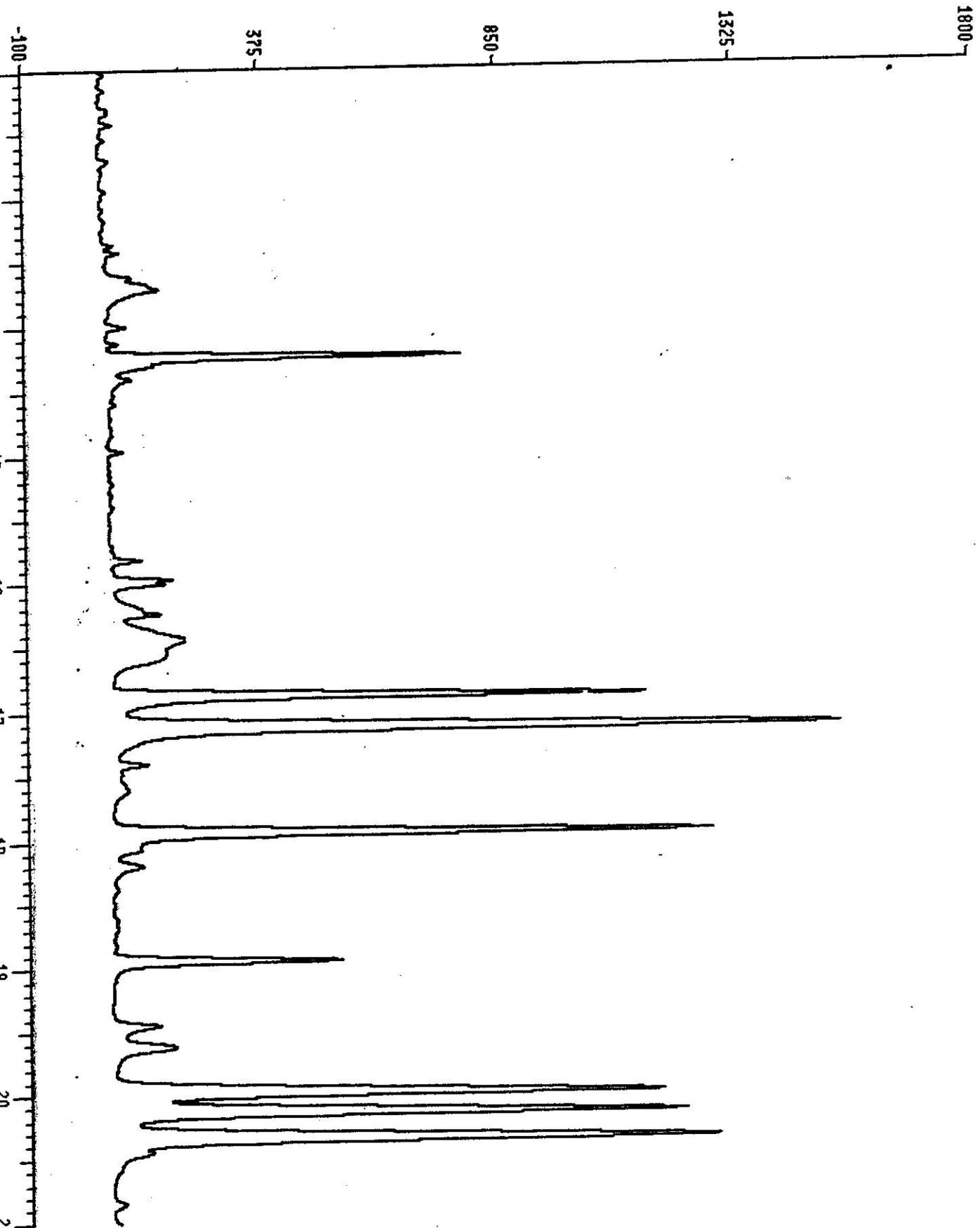
12 - 1-MMAU

13 - 3-MMAU

14 - 7-MMAu



nd of plot. Time = 7.00 to 30.00 minutes Chart speed = 0.87 cm/min



End of plot. Time = 12.00 to 21.00 minutes Chart speed = 2.21 cm/min

EXERCICES

I - Pour tester une colonne capillaire du type CP Sil 5, on utilise un mélange étalon. Le chromatogramme est représenté sur la figure 1.

le pic N° 1 correspond à l'octanal
le pic N° 2 correspond à au 1-octanol
le pic N° 3 correspond à au N-undécane
le pic N° 4 correspond à au 2,6-diméthylphénol
le pic N° 5 correspond à à l'acide octanoïque
le pic N° 6 correspond à à la 2,6-diméthylaniline
le pic N° 7 correspond à au naphthalène
le pic N° 8 correspond à au N-dodécane
le pic N° 9 correspond à au N-tridécane
le pic N° 10 correspond à à l'acide décanoïque

La colonne a une longueur de 25 m, un diamètre intérieur de 0.33 mm, une épaisseur de film de phase stationnaire de 0.13 μm et un diamètre extérieur de 0.45 mm.

La température de la colonne est 100 °C pendant toute l'analyse, celle de l'injecteur de 270 °C et celle du détecteur FID de 260 °C. Le rapport de split est fixé à 100 et la quantité injectée de 1 μl . La vitesse du gaz vecteur = 28.0 cm/s. La sensibilité limite du détecteur est de 10^{-11}A .

I - Mesurer sur le chromatogramme les temps de rétention, les largeurs à mi-hauteur δ et les largeurs ω pour les composés élués.

II - Calculer la résolution entre le N-undécane et l'acide octanoïque. Quelle longueur de colonne faudrait-il pour avoir entre ces deux pics un recouvrement de 1 % c'est à dire une résolution de 1,5 ?

III - Calculer le nombre de plateaux pour le pic N° 8. Calculer la hauteur d'un plateau théorique.

IV - La réponse du détecteur FID est proportionnelle au nombre de moles des éluats. Sachant que le pic N° 8 correspond à 25 ng injectés, quelle est la quantité injectée qui correspond au pic N° 9 ?

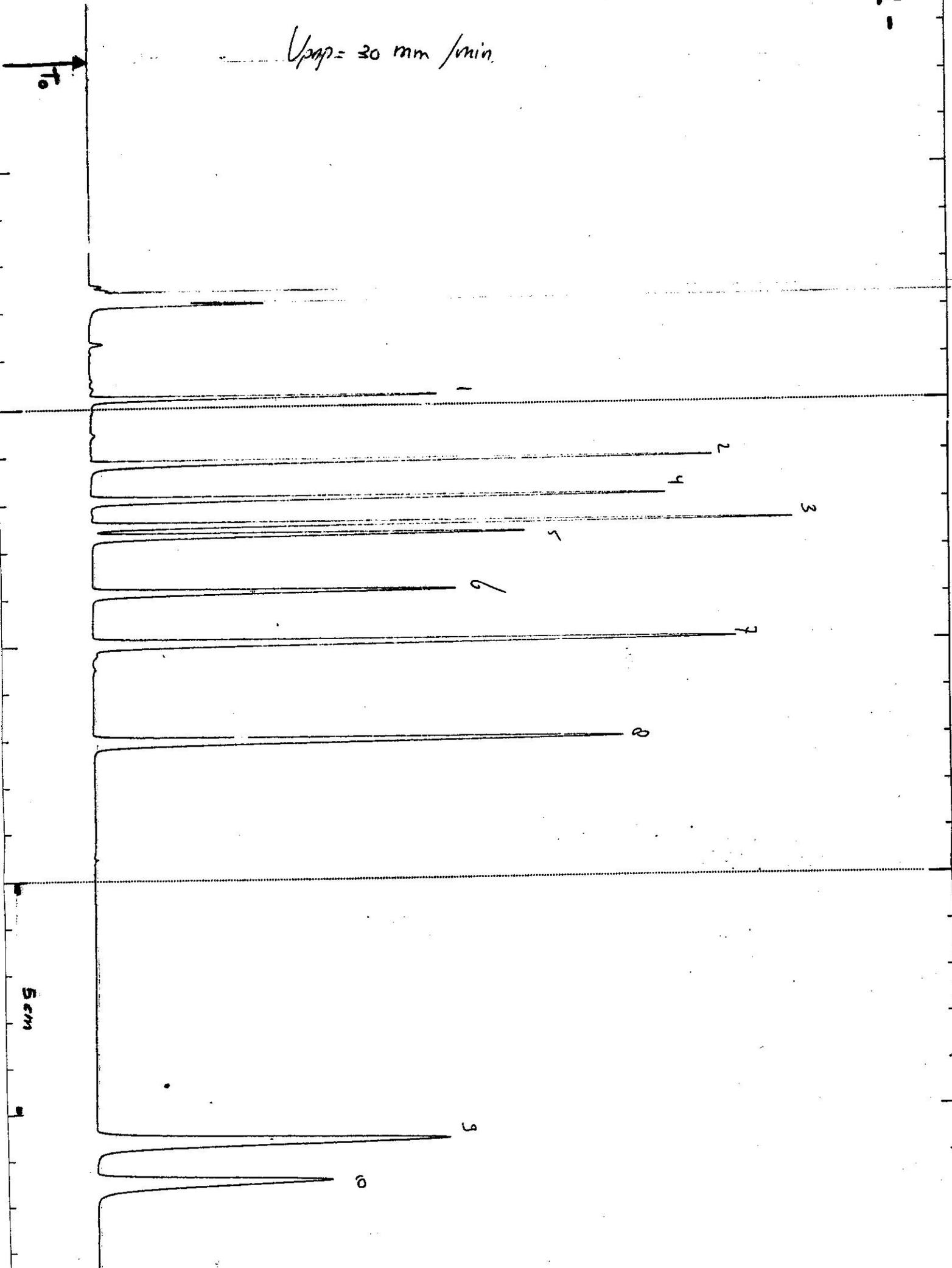
V - Pour doser quantitativement la 2,6-diméthylaniline on réalise une gamme d'étalonnage :

ng/ml	5	15	25	35	45
surfaces	12.42	37.26	62.01	86.93	111.77

Déterminer sa concentration ?

VI - Quelles réflexions vous inspire la forme des deux derniers pics élués ?

$v_{\text{app}} = 30 \text{ mm/min}$



II - ETALONNAGE EXTERNE

On désire doser de la caféine dans les urines par CPG après extraction .

Pour cela, on trace une gamme d'étalonnage qui comprend quatre concentrations 1, 2, 4, 8 ng/ml que l'on injecte trois fois.

Pour augmenter la précision on ajoute aux solutions un étalon interne bien séparé de la caféine. les résultats sont les suivants (les surfaces sont en unité arbitraire)

surfaces	1		2		3	
	caf.	étal.	caf.	étal.	caf.	étal.
1	345	1574	369	1588	387	1610
2	651	1610	630	1618	670	1720
4	1312	1665	1223	1667	1437	1669
8	2594	1745	2477	1744	2715	1746

Un échantillon de caféine de concentration inconnue donne pour trois injections:

caféine	étalon interne
1046.5	1782
1026	1620
974.7	1296

Calculer la concentration de cet échantillon :

- sans utiliser l'étalonnage interne.
- en utilisant l'étalonnage interne.
- Quelle est la différence en % entre les deux résultats ?

III - ETALONNAGE INTERNE

Pour doser un échantillon A par CLHP on utilise la méthode de l'étalon interne. Soit E cet étalon. On détermine le coefficient de réponse de A par rapport à E en injectant trois fois un mélange de A et de E. La concentration de A = 1 mg/ml et celle de E = 0.9 mg/ml.

Les résultats sont les suivants:

1^{ère} injection: Hauteur A :31mm. 1/2largeur A : 5mm .Hauteur E :41mm. 1/2largeur I : 4mm

2^{ème} injection: Hauteur A :30mm. 1/2largeur A : 5mm .Hauteur E :40mm. 1/2largeur I : 4mm

3^{ème} injection: Hauteur A :29mm. 1/2largeur A : 5mm .Hauteur E :39mm. 1/2largeur I : 4mm

Pour quantifier une solution inconnue de A on injecte le mélange contenant A inconnu et une solution de E de concentration 0.9 mg/ml. On a :

Hauteur A :45mm. 1/2largeur A : 5mm .Hauteur E :40mm. 1/2largeur I : 4mm

- Calculer le coefficient de réponse de A par rapport à E
- Quelle est la concentration de A

CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

La chromatographie en phase liquide sur colonne a connu, depuis 1970, un essor considérable grâce à l'amélioration des phases stationnaires et des détecteurs.

I - GENERALITES

La séparation chromatographique résulte de la distribution dynamique des solutés à analyser entre deux phases non miscibles, la phase stationnaire et la phase mobile qui est liquide. On travaille en chromatographie d'élution uniquement. L'échantillon est déposé au sommet d'une colonne qui contient la phase stationnaire et la phase mobile va faire migrer les différents constituants de l'échantillon, ceci d'autant plus lentement que leur affinité pour la phase stationnaire est plus grande.

1 - Mécanismes de rétention .

a - Adsorption.

La phase stationnaire est un solide adsorbant. La séparation est fondée sur les différences d'adsorption des molécules du mélange par la phase fixe: c'est une chromatographie liquide solide CLS.

b - Partage.

La phase stationnaire est un liquide immobilisé par un solide qu'il imprègne. C'est une chromatographie liquide liquide CLL.

c - Echange d'ions.

La phase stationnaire est un solide ayant des propriétés d'échangeur d'ions. Il est généralement poreux et renferme, dans ses pores, une phase liquide.

d - Exclusion - Diffusion - Filtration sur gel.

La phase stationnaire est un solide poreux. La dimension des pores est voisine des dimensions de certaines des molécules à séparer.

2 - Paramètres fondamentaux.

Ce sont les mêmes que ceux décrits dans le chapitre Chromatographie en Phase Gazeuse auxquels on doit ajouter :

la perte de charge de la colonne

Elle représente la différence de pression entre le haut et le bas de la colonne. En première approximation, la loi de DARCY nous donne:

$$\Delta P = nLv/K^{\circ}$$

ΔP = la perte de charge en barye (1barye = 10^{-6} bar)

n = la viscosité de la phase mobile en poises

L = la longueur de la colonne en cm

v = la vitesse linéaire de la phase mobile en cm/s

K° = la constante de perméabilité de la colonne. Elle est fonction du diamètre des particules et de la porosité interstitielle.

Plus la granulométrie est fine, plus la pression doit être forte.

II - APPAREILLAGE. (figure 1 et 2)

Il se compose :

a - d'un réservoir de solvant.

b - d'une pompe qui assure le débit de la phase mobile

c - d'un système d'injection des échantillons. On utilise des vannes d'échantillonnage ou vanne à boucle (figure).

d - d'une colonne qui contient la phase stationnaire placée dans une enceinte thermostatée.

Entre la pompe et la colonne, on place un capillaire métallique de section intérieure comprise entre 0.25 et 0.50 mm pour limiter les volumes morts.

e - d'un détecteur relié à un enregistreur couplé à un enregistreur, un intégrateur ou un système informatique.

Pour éviter les fuites, il faut des jonctions parfaites entre les différents constituants.

- Les colonnes

Elles sont cylindriques, rectilignes, en acier inoxydable et parfaitement lisses intérieurement.

Leur longueur varie de 10 à 50 cm et leur section = 0.5 cm environ. La phase stationnaire est retenue par un disque inoxydable fritté.

On utilise aussi, depuis quelques temps, des colonnes classiques de plus faible diamètre (0.5 à 1mm) et des colonnes capillaires remplies en verre, d'un diamètre de l'ordre de 50 à 200 μm , de longueur de 10 à 100 m ou des colonnes à tube ouvert (diamètre: 20 à 30 μm) analogues à celles utilisées en CPG.

III - COMPARAISONS AVEC LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Ce sont des méthodes d'analyse complémentaires.

- La CPG est limitée par le fait que 20% seulement des molécules organiques connues sont utilisables par cette technique sans modification chimique préalable (dérivation). Elle présente des difficultés dès que la substance est peu volatile ou sensible à une élévation de température.

- La CPG est moins onéreuse et plus sensible (quelques picogrammes).

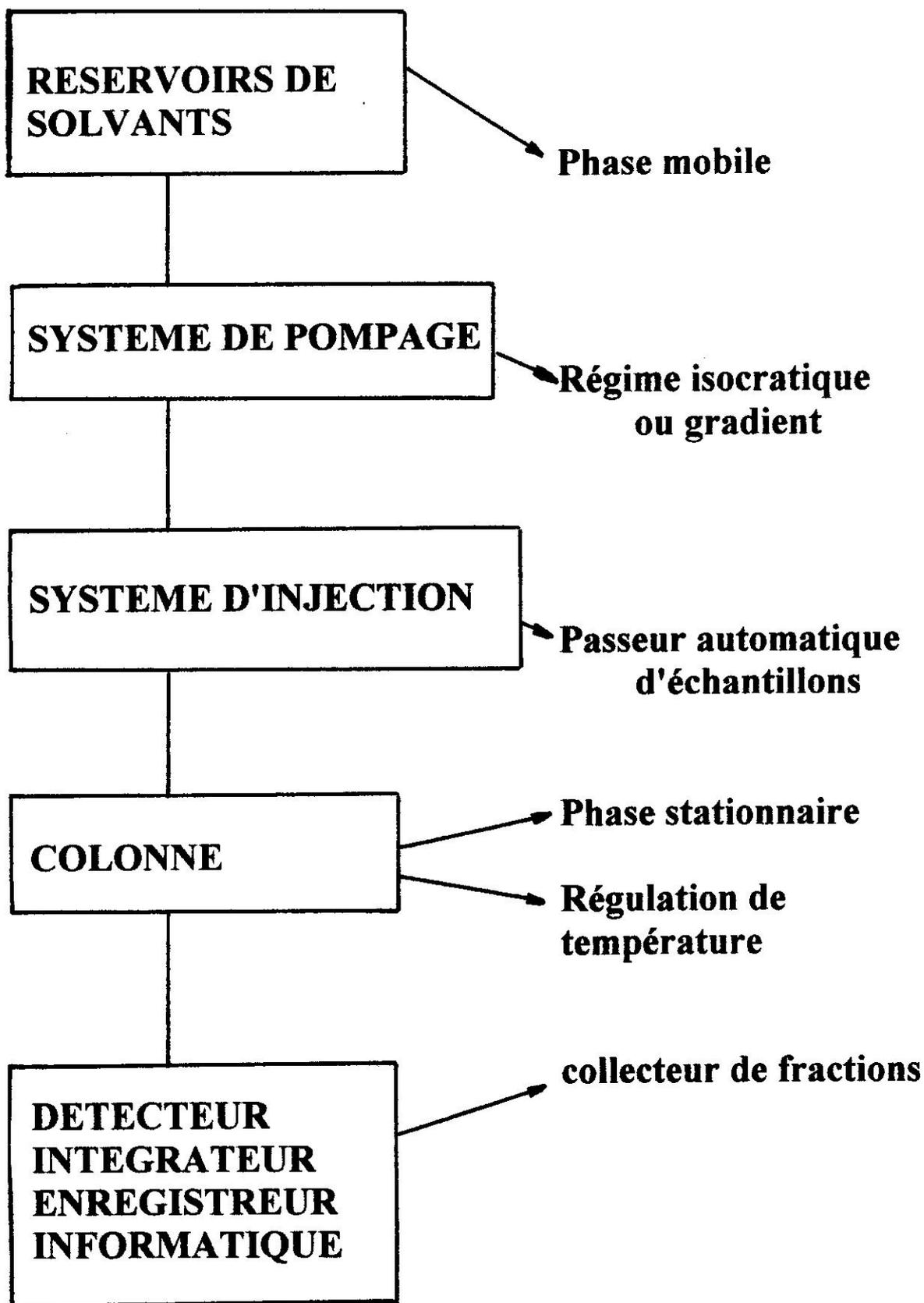


Figure 1

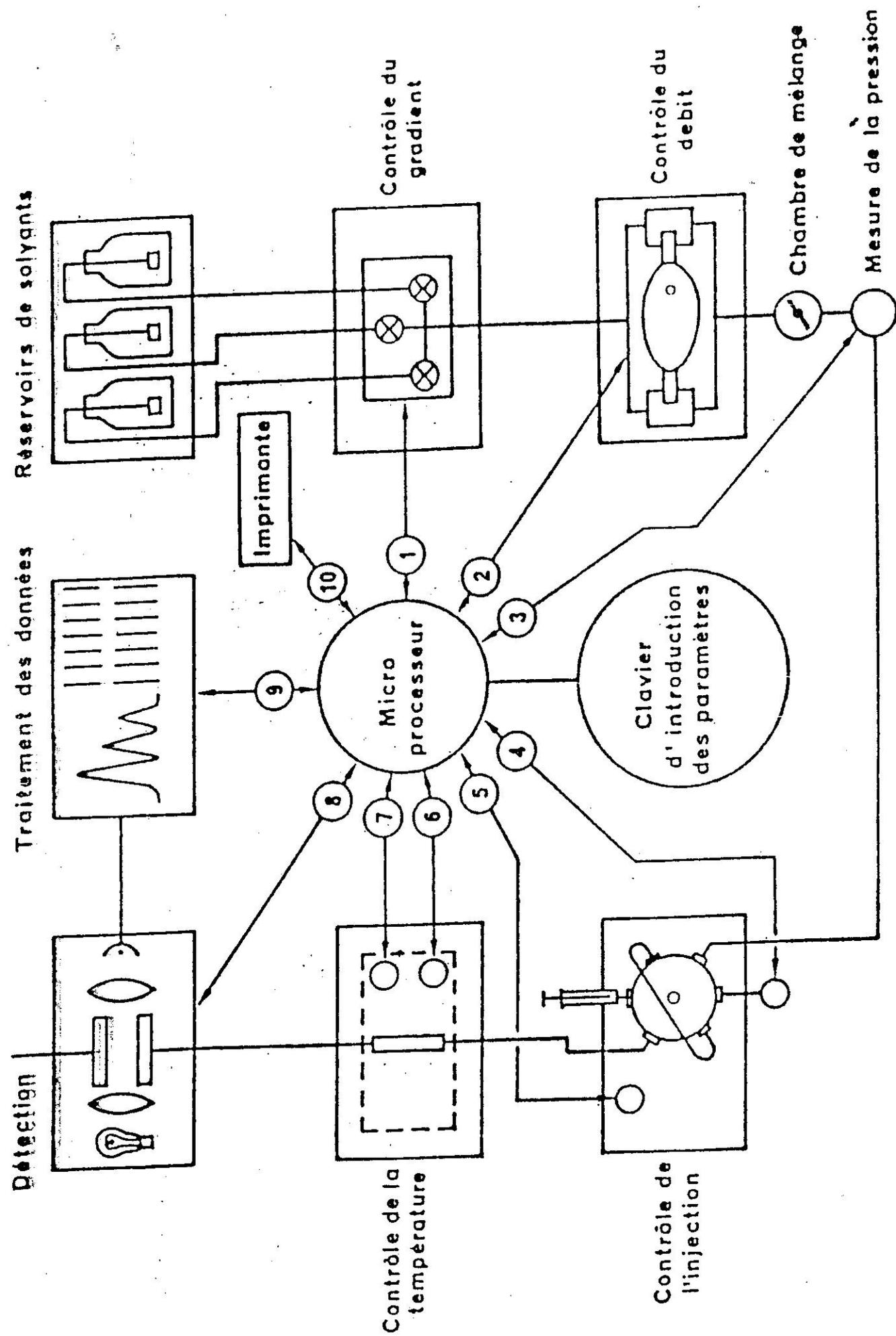


Schéma de principe d'un chromatographe en phase liquide piloté par un microprocesseur (d'après un document Spectra-Physics).

FIGURE 2

- En CPG, il y a interaction uniquement entre soluté et phase stationnaire alors que pour la CLHP s'ajoutent les interactions de la phase mobile avec le soluté et avec la phase stationnaire.

- La CLHP n'est pas limitée par les contraintes de volatilité et de température. Ses limites de détection sont de l'ordre du nanogramme avec un détecteur UV-VIS et de 100 picogrammes avec un fluorimètre.

IV - TECHNIQUES

a - régime isocratique.

L'échantillon déposé en haut de la colonne est entraîné par une phase mobile de composition constante.

b - régime gradient d'élution.

La composition de la phase mobile change en cours d'analyse, ce qui modifie la force d'élution. La composition et la chronologie des mélanges (2 ou 3 constituants) sont programmées :

- soit pour mieux séparer des composés très voisins.
- soit pour rapprocher des composés de comportements chromatographiques très différents.

L'inconvénient de cette technique est qu'il faut attendre que le mélange revienne à sa composition initiale avant une nouvelle injection. (méthode que l'on peut rapprocher de la programmation de température en CPG)

V - TYPES DE CHROMATOGRAPHIE

On distingue quatre types de chromatographie (figure 3) :

- chromatographie d'adsorption
- chromatographie de partage (figure 4)
- chromatographie d'échange d'ions
- chromatographie d'exclusion-diffusion

Remarques

Les phénomènes d'échange entre la phase stationnaire et la phase mobile ne sont jamais uniques. Par exemple, en chromatographie d'adsorption, il y a, de façon limitée, des phénomènes de partage.

FIGURE 3

L'ECHANTILLON EST SOLUBLE DANS

HEPTANE BENZENE	DICHLOROMETHANE	ALCOOL ACETONITRILE	EAU neutre	acide bases
ADSORPTION sur supports polaires	PARTAGE CLASSIQUE	PARTAGE A POLARITE de phases inversées		
SYSTEME CHROMATOGRAPHIQUE				
PHASE STATIONNAIRE	SILICE	SILICE GREFFEE	SILICE GREFFEE	
		- CN, - NO ₂ , - NH ₂	- C ₂ , - C ₈ , - C ₁₈	
PHASE MOBILE (dans l'ordre d'augmentation de la force éluante)	Hexane, Isooctane, Chloro- forme dichlorométhane (avec addition d'alcool)	Hexane - ou dichlorométhane: Hexane dichlo- rométhane (+ isopropanol): Ex. : 95/5	EAU - acétonitrile EAU - méthanol	Solution tampons -acétonitrile Solution tampons -méthanol EAU - acétoni- trile + contre ion EAU - méthanol + contre ion
ORDRE D'ELUTION DES COMPOSES	Les moins polaires d'abords	Les moins polaires d'abords	Les plus polaires d'abords	
L'éluion peut-être accélérée en :	augmentant la polarité de la phase mobile	augmentant la polarité de la phase mobile Ex. : en augmentant le Z de dichlorométhane et d'isopropa- ou no1	en diminuant la polarité de la phase mobile	

	PARTAGE CLASSIQUE (en phases normales)	PARTAGE en PHASES INVERSEES
POLARITE DU SOLVANT	FAIBLE	FORTE
POLARITE DE LA PH. STAT.	MOYENNE à FORTE	TRES FAIBLE à MOYENNE
POLARITE DES SOLUTES	MOYENNE à (FORTE)	FAIBLE à MOYENNE (+ solutés ionisés)
ORDRE D'ELUTION	LES MOINS POLAIRES D'ABORD	LES PLUS POLAIRES D'ABORD
EFFET PRODUIT PAR L'AUGMENTATION DE LA POLARITE DU SOLVANT	 Tr	 Tr

FIGURE 4

Une même substance peut être analysée de plusieurs façons et, bien souvent, c'est du matériel dont on dispose qui décide du choix.

Choix de la méthode.

Dans les domaines biochimiques et pharmaceutiques, on utilise à plus de 75 % la chromatographie de partage à polarité inversée (figure 4) car :

- les silices greffées avec des groupements peu polaires sont très stables et faciles à employer.
- des molécules assez polaires sont analysables par cette méthode.
- la plupart des molécules insolubles dans l'eau le sont dans l'acétonitril ou le méthanol.

VI - ANALOGIES AVEC LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Il existe des règles plus ou moins empiriques qui, dans une certaine mesure, permettent des transpositions entre les deux méthodes. Ces règles lient les R_f et les facteurs de capacités K' .

Pour avoir une comparaison valable, il faut :

- que la phase stationnaire utilisée en CCM soit la plus proche possible de celle projetée en CLHP.
- que la phase mobile possède les qualités exigées en CLHP. C'est une approche peu onéreuse qui fait gagner du temps.

VII - UTILISATION DE LA CLHP.

1 - Analyse qualitative.

Le temps de rétention est caractéristique d'un soluté dans des conditions expérimentales déterminées : c'est un élément de décision.

Comme il est possible de recueillir le produit à identifier au moment de l'apparition de son pic d'éluion, on possède, là, une technique semi-préparative ou préparative (avec certains types de colonnes), pour analyser des produits purifiés chromatographiquement par d'autres méthodes d'analyses comme la Spectrométrie de Masse, l'Infra-Rouge ou la RMN.

2 - Analyse quantitative.

Les méthodes sont identiques à celles de la CPG.(cf. ce chapitre)

VIII - APPLICATIONS

- Etudes pharmacocinétique (AMM)
- Surveillance des traitements (antiépileptiques, certains antibiotiques, INH,.....)
- Toxicologie d'urgence (barbituriques.....)

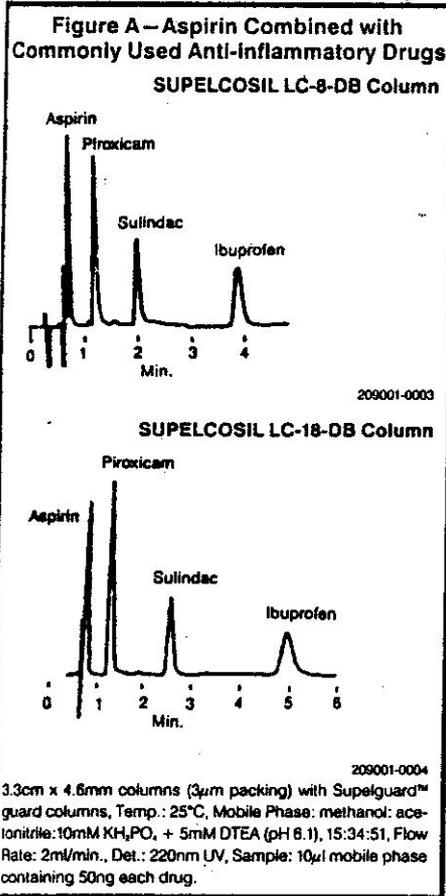
- Lipides totaux, acides gras, phospholipides,....
- Stéroïdes (cortisol, aldostérone, oestrogènes, androgènes)
- Glucides (séparations des sucres)
- Amines biogènes (adrénaline,.....)
- Acides aminés (analyse séquentielle des protéines)
- Peptides (antibiotiques polypeptidiques, hémoglobines)
- Acides nucléiques
- Porphyrines
- Vitamines

IX - CONCLUSION

C'est une technique de routine pour les laboratoires industriels et hospitaliers comme la CPG. Elle présente l'avantage sur cette dernière de pouvoir analyser des molécules de plus haut poids moléculaire et assez polaires sans traitement chimique de l'échantillon, mais sa sensibilité est plus basse.

Applications pharmaceutiques

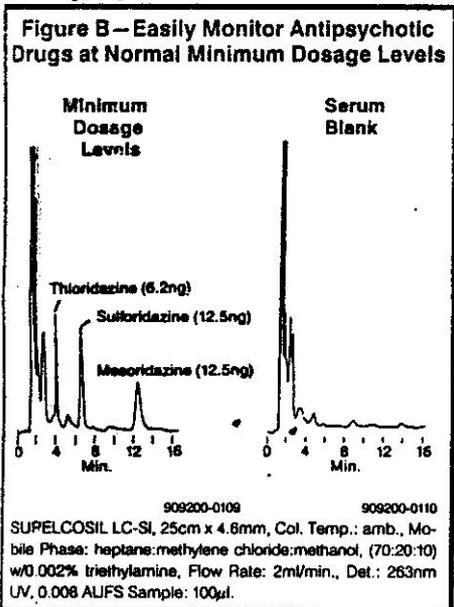
Anti-inflammatory Drugs



SUPELCO SIL™ LC-8-DB
 3x3 column, 3µm packing, 3.3cm x 4.6mm
 Cat. No. 5-8976

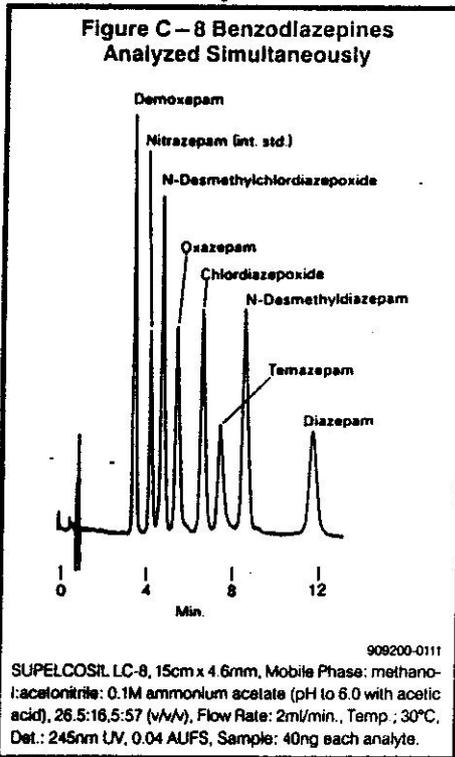
SUPELCO SIL LC-18-DB
 3x3 column, 3µm packing, 3.3cm x 4.6mm
 Cat. No. 5-8978

Antipsychotics



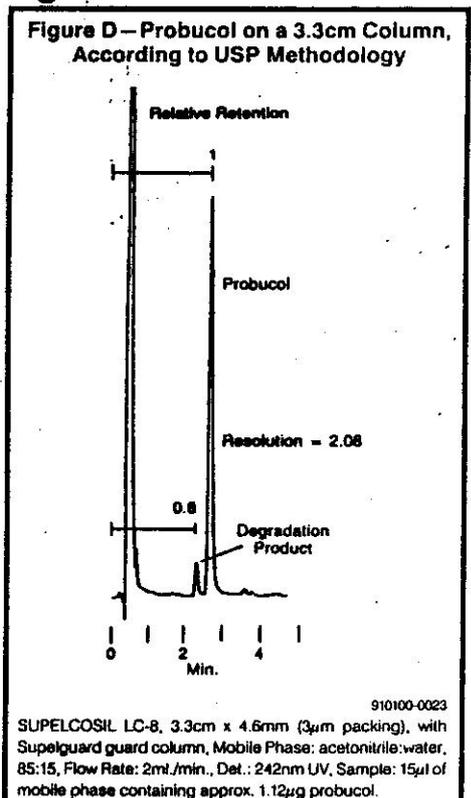
SUPELCO SIL LC-SI Column
 5µm packing, 25cm x 4.6mm
 Cat. No. 5-8295

Benzodiazepines



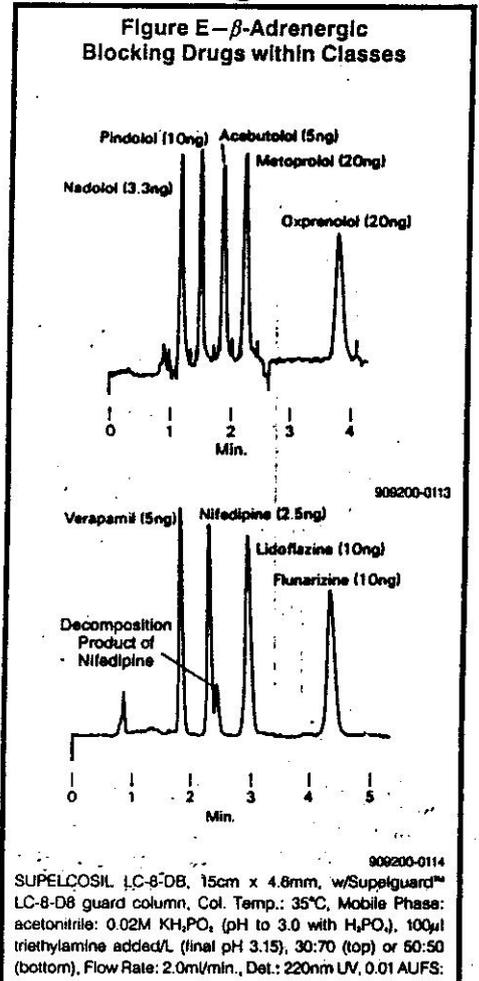
SUPELCO SIL LC-8 Column
 5µm packing, 15cm x 4.6mm
 Cat. No. 5-8220

Cholesterol-Reducing Agents



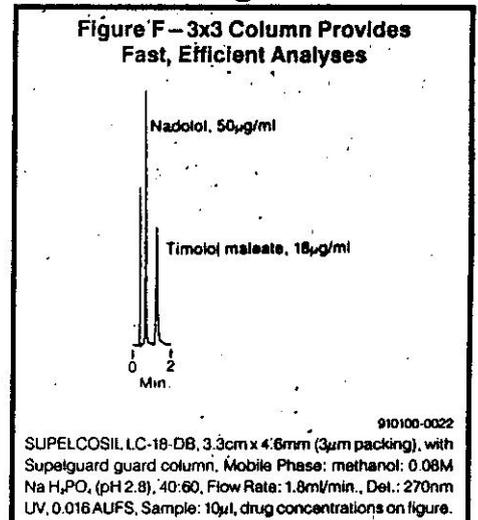
SUPELCO SIL LC-8
 3x3 column, 3µm packing, 3.3cm x 4.6mm
 Cat. No. 5-8975

Cardiac Drugs



SUPELCO SIL LC-8-DB Column
 5µm packing, 15cm x 4.6mm
 Cat. No. 5-8347

Cardiac Drugs



SUPELCO SIL LC-18-DB
 3x3 column, 3µm packing, 3.3cm x 4.6mm
 Cat. No. 5-8978

CHROMATOGRAPHIE PLANAIRE

On l'appelle aussi chromatographie sur couche mince (CCM).

Cette méthode s'est développée en raison, principalement, de sa simplicité et de sa rapidité.

I - DESCRIPTION DE LA METHODE

On utilise une couche mince de substrat solide, répartie sur une plaque de verre. Le substrat est mis en suspension dans de l'eau (acidifiée ou alcalinisée). Cette suspension est étalée sur une plaque de verre en une couche mince d'épaisseur uniforme de l'ordre de 0.3 mm. Les composés à séparer sont déposés à la surface de ce film solide à un cm du bord.

Le mélange de solvant est placé dans la cuve fermée, suffisamment longtemps à l'avance, pour que l'atmosphère de cette dernière soit saturée par les vapeurs de solvants (une à plusieurs heures). La plaque de verre est alors introduite dans la cuve et maintenue verticalement par un support, son extrémité plongeant dans quelques mm de solvant.

Ce dernier s'élève le long de la couche mince par capillarité et on arrête la migration lorsque le solvant est à une hauteur suffisante. La plaque est séchée et on mesure les R_f des composés révélés, par fluorescence, par radioactivité s'il s'agit de molécules marquées au carbone 14 ou par une réaction colorée caractéristique développée sur la plaque après pulvérisation d'une solution d'un réactif. On peut, aussi, ajouter un sel fluorescent à la phase stationnaire. Il suffit, alors, d'éclairer la plaque avec une lampe à vapeur de mercure pour voir apparaître des taches sombres aux endroits où se trouvent les composés qui absorbent la radiation excitatrice.

Il existe aussi des systèmes de cuve horizontales. (figure 1)

II - SYSTEME DE PHASES.

a - Phases stationnaires :

- le gel de silice
- le Kieselguhr (terre silicée)
- l'alumine
- la poudre de cellulose (DEAE-cellulose, basique)
- comme en CLHP, il existe des silices greffées par des chaînes aux structures variées

attachées par des fonctions covalentes aux fonctions silanols de la phase (des groupements alkyles : RP-2, RP-8, RP-18, des fonctions organiques comme les groupements cyanopropyles, aminopropyles)

Ces phases sont additionnées de 5% de plâtre pour assurer l'adhésion sur la plaque.

b - Phases mobiles

Ce sont des mélanges monophasiques de plusieurs solvants de constitution très variable.

Exemples : phase normale hexane/acétone 80:20 v/v, phase inverse acétone/eau 60:40 v/v

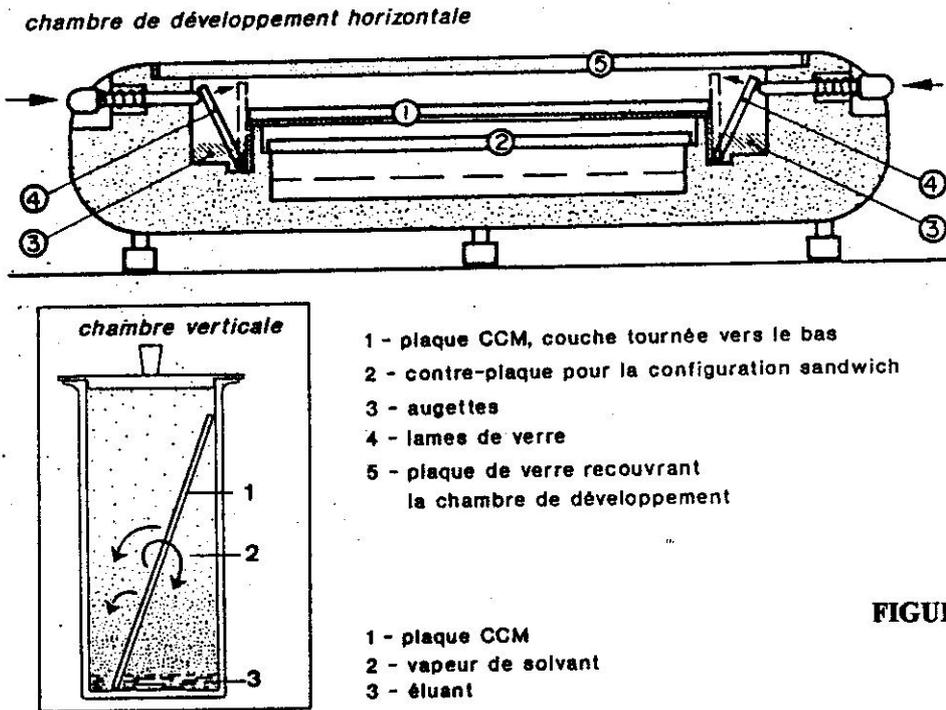


FIGURE 1

Figure 5.2 - Chambres de développement. a) cuve horizontale; b) cuve classique (reproduit avec l'autorisation de la société Merck).

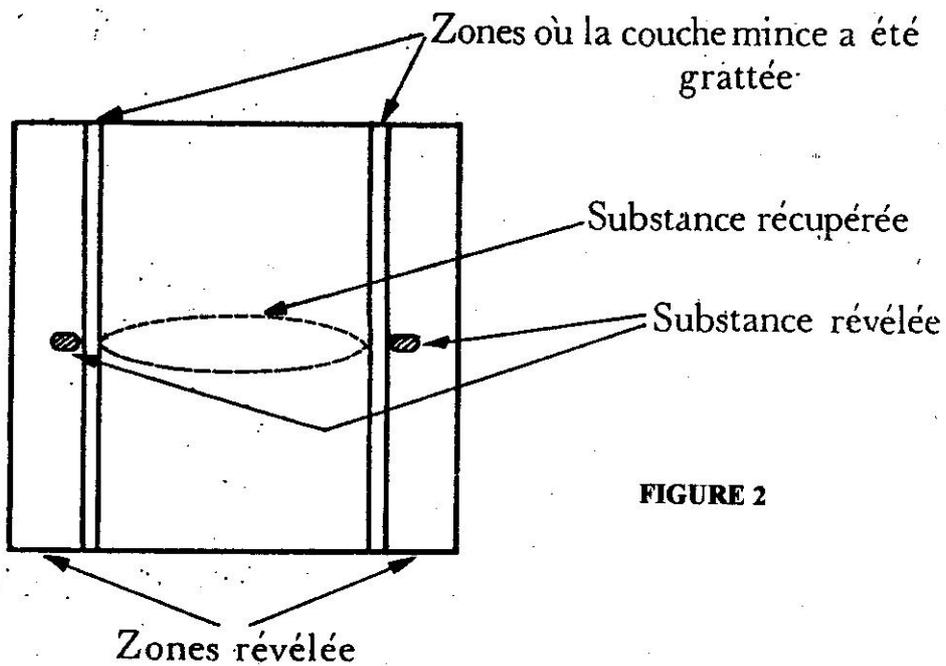


FIGURE 2

III - MECANISME DE LA SEPARATION.

Selon la nature des phases stationnaires et mobiles utilisées, la séparation peut être due à :

- un phénomène d'adsorption sur le support
- un phénomène de partage avec le solvant
- un phénomène d'échange d'ions

Dans la plupart des cas, plusieurs mécanismes se superposent mais l'un prend le pas sur les autres. Il faut tenir compte :

- de la nature des substances à séparer (caractère acide, neutre, alcalin, amphotère)
- de la phase stationnaire qui peut être activée ou désactivée par des traitements préliminaires, de son caractère (acide, neutre, alcalin) et qui peut réagir avec les solutés.
- de la phase mobile (pouvoir de solvant vis à vis des composés).

En général avec :

- le gel silice, il y a adsorption et partage
- le Kieselghur, il y a partage
- l'alumine, il y a adsorption

IV - APPLICATION QUALITATIVE. EXPRESSION DU Rf

Au départ, le mélange est déposé sous forme de petites taches circulaires et chacun des composants migre avec une vitesse qui dépend de son coefficient de partage. A la fin, on obtient des taches plus ou moins circulaires, symétriques et élargies.

Par définition :

$$R_f = D_s / D_f$$

D_s = distance parcourue par la substance

D_f = distance parcourue par le front de solvant mesuré à partir du centre du dépôt.

Si V_s et V_m sont les volumes de phase stationnaire et mobile contenus dans la plaque, on peut exprimer R_f en fonction du coefficient de partage corrigé

$$K' = kV_s/V_m \quad (K = \text{coefficient de partage}) :$$

$$R_f = 1/(1 + K')$$

En fait le coefficient K' n'est pas constant tout au long de la migration car le volume de phase mobile absorbé diminue avec la distance. Si dv_m décroît, K' augmente et le R_f mesuré est plus faible que le R_f théorique

$$R_f \text{ théorique} = k R_f \text{ mesuré. } (k = 1.1 \text{ à } 1.5)$$

On utilise aussi les Rx mesurés par rapport à un étalon X car cette valeur est plus reproductible que les Rf.

La méthode est applicable à des quantités de l'ordre du micro gramme.

V - APPLICATION QUANTITATIVE

On procède par densimétrie sur la plaque ou on partage celle-ci en trois parties inégales. Sur la plus large, on dépose une bande du mélange pour augmenter la quantité recueillie et, sur chacune des deux autres, une tache qui servira à révéler. On gratte le centre de la plaque (préservé du réactif) et on extrait l'éluat avec le minimum de solvant possible pour l'analyser par spectrométrie de masse, RMN, IR,....etc. on peut recueillir ainsi plusieurs milligrammes de substance. (figure 2)

VI - AVANTAGES DE LA METHODE

a - la séparation est rapide

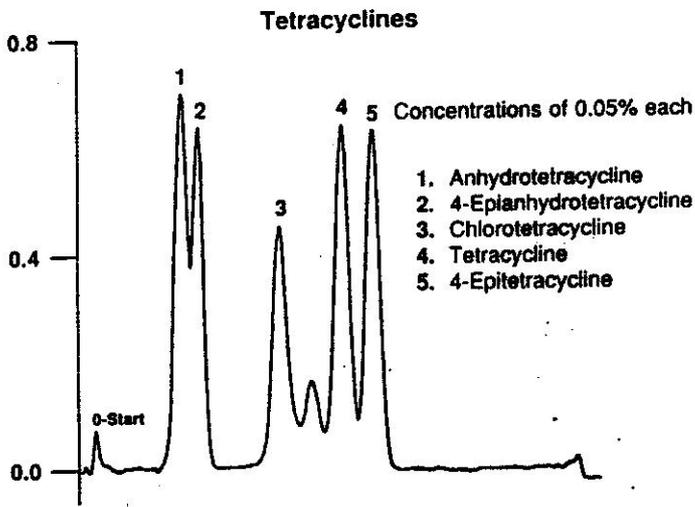
b - la robustesse du substrat autorise l'utilisation de révélateurs comme l'acide sulfurique concentré, l'acide phosphorique chaud, le permanganate de potassium en solution sulfurique, l'anhydride chromique,.. etc. pour les réaction de caractérisation.

Propriétés des principales couches minces utilisées
(les mécanismes indiqués entre parenthèses présentent moins d'importance).

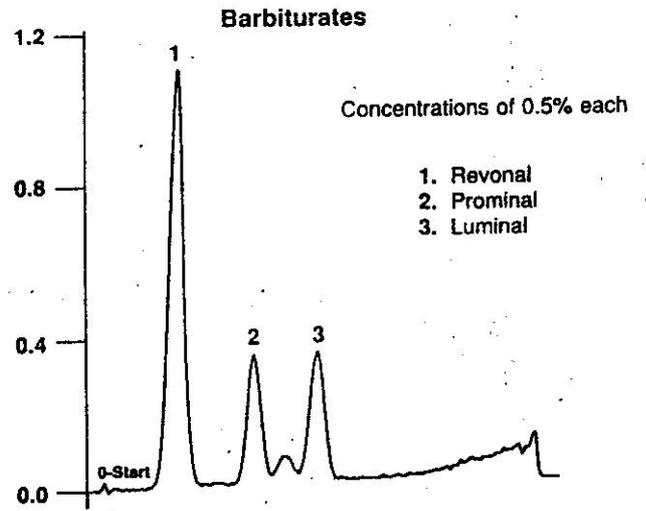
Nature de la couche mince	Propriétés			Substances séparées
	Réaction	Pouvoir adsorbant	Mécanismes intervenant dans la séparation	
Gel de silice	Acide	Actif	Adsorption-Partition (échanges d'ions)	Pratiquement toutes
Alumine	Basique	Active	Adsorption (partition (échanges d'ions))	Substances basiques. Stéroïdes
Kieselguhr	Neutre	Inactif	Partition	Sucres
Hydroxyde de calcium	Basique	Faiblement actif	Adsorption	Caroténoïdes, tocophérols
Sulfate de calcium		Faiblement actif	Adsorption	Acides gras, glycérides
Cellulose (poudre)	Neutre	Nulle	Partition (échanges d'ions)	Amino-acides. Colorants
Polyamides	Neutre	Inactif	(Échanges d'ions)	Flavones
Résines échangeuses d'ions	Acide ou basique		Échange d'ions (partition)	Acides nucléiques et dérivés.

TLC Plates for Reverse-Phase and Normal Phase TLC

Determine Polarity By Eluant Selection

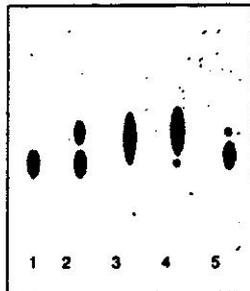


TLC Plate: Silica Gel RP18/UV₂₅₄
 Catalog No: 811071
 Eluent: 0.5M Oxalic acid/Methanol/Acetonitrile, 8/2/2 (v/v/v)
 Migration Distance: 7.3cm in 25min
 Sample Volume: 250μL
 Detector: Dual wavelength scanner 450/600nm
 Activate layer at 105-110°C (5min)



TLC Plate: Silica Gel RP18/UV₂₅₄
 Catalog No: 811071
 Eluent: Methanol/Water, 45/55 (v/v)
 Migration Distance: 8.5cm in 35min
 Sample Volume: 1μL
 Detector: UV 254nm

Chromatogram of DOPA Samples



1. L-DOPA
2. D,L-DOPA
3. D-DOPA
4. 3% L-DOPA in D-DOPA
5. 3% D-DOPA in L-DOPA

TLC Plate: Chiralplate
 Catalog No: 811058
 Sample volume: 2μL of a 1% solution
 Developing solvent: CH₃OH, 0.1N HCl 1:1
 Methanol, Water, Acetonitrile (50:50:30 V/V/V)
 Developing time: 45-60 minutes
 Visualization: 0.1% Ninhydrin Spray Solution

LES GRANDS PRINCIPES

La chromatographie

Aller à l'essentiel

■ Les chromatographes ont beaucoup évolué ces dernières années, dans le sens d'une amélioration de performances mais aussi vers une plus grande simplicité d'utilisation. Autrefois réservé aux laboratoires, cet outil exige un grand savoir-faire et il voit s'étendre ses applications dans l'analyse chimique en ligne sur les procédés de fabrication industriels.

Les appareillages proposés sur le marché font appel à une large diversité de techniques, qu'il n'est bien évidemment pas question de détailler ici.

Cette Fiche est dans l'esprit de celles publiées jusqu'ici. Elle n'a d'autre objectif que de vulgariser et ne s'adresse pas aux spécialistes de la chromatographie. Elle intéressera ceux qui en aient entendu parler... sans oser en demander plus.

La chromatographie est une méthode d'analyse chimique basée sur la séparation d'un composé en ses divers constituants. Certains attribuent son invention à Runge en 1855: il eut en effet l'idée d'utiliser les propriétés de diffusion d'un papier absorbant pour séparer les constituants d'une solution.

Mais le nom de *chromatographie* ("description par la couleur") est apparu beaucoup plus tard, en 1903 exactement, et c'est au botaniste russe Tswett qu'on le doit. Il eut l'intuition de filtrer de la chlorophylle en solution dans l'éther de pétrole à travers une colonne remplie d'adsorbant, et observa que les composants se déposaient de haut en bas dans la colonne, et ceci en formant des zones colorées bien séparées. Cette découverte n'eut pas immédiatement les prolongements que l'on pouvait en attendre. Elle fut en effet redécouverte entre 1930 et 1940 et connaît depuis un développement continu.

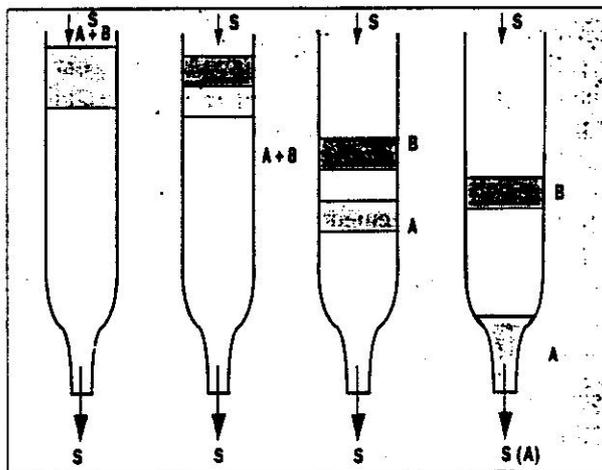
D'une manière générale, la chromatographie utilise les différences entre les constantes d'équilibre des constituants

d'un mélange lors de leur partage entre une *phase mobile* dans laquelle ils sont solubles et une *phase fixe* ou *stationnaire* qui exerce sur eux un effet retardateur.

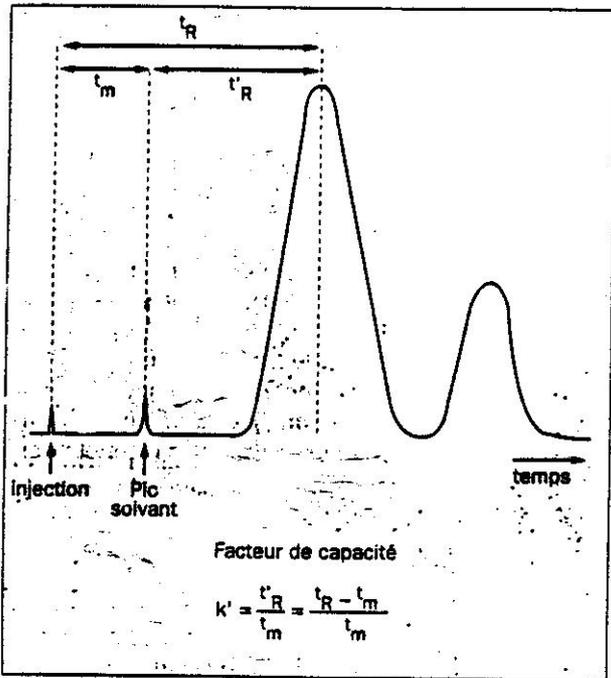
Une séparation pour commencer

Voyons tout cela sur un exemple. Considérons un mélange de deux constituants A et B dissous dans un solvant S. Introduisons cette solution au sommet d'une colonne contenant la phase fixe. La quantité A + B doit être très faible par rapport à ce que peut retenir la totalité de la phase stationnaire. Les deux substances se fixent alors par échange en haut de la colonne, sur une très faible longueur. Il se forme ainsi une zone ayant les mêmes proportions de A et de B que la solution.

Par la suite, la colonne sera soumise à une percolation par un solvant (qui peut être identique à S, mais cela n'a rien d'obligatoire). Cette étape, appelée *élution*, se traduit par une migration de la zone vers le bas de la colonne. Le solvant frais (ou *éluant*) dissout en effet progressivement les substances fixées



Principe du processus de séparation de deux composés à l'aide d'une colonne de chromatographie. On "joue" sur les variations des temps de rétention en fonction des composés.



Le facteur de capacité constitue un paramètre important pour caractériser la rétention d'un composé par une colonne de séparation.

temps de rétention t_R , on obtient le temps de rétention relatif t'_R , appelé aussi temps de rétention réduit. Ce temps t'_R mesure le temps passé par la substance sur la phase stationnaire, et il est donc lié au phénomène de rétention proprement dit.

Surface du pic. Les autres éléments importants d'un chromatogramme sont la largeur ω de la base du pic, la largeur δ du pic à mi-hauteur et la surface du pic. Pour obtenir ω , il faut tracer la tangente à chaque pente du pic et repérer l'intersection de ces tangentes avec la ligne de base: ω est le temps qui sépare ces deux points.

De même que la hauteur H du pic, la surface S du pic permet de mesurer la concentration de la substance. Ces paramètres sont inter-dépendants. On a en effet $S = H \cdot \delta$. La surface du pic est utilisée dans le calcul quantitatif.

Le facteur de capacité. Afin de pouvoir comparer les chromatogrammes de séparations obtenues sur des colonnes différentes avec des conditions d'éluants différentes, on utilise une grandeur sans dimension appelée *facteur de capacité*, qui permet de s'affranchir des para-

sur la colonne pour les abandonner un peu plus loin sur les portions vierges de celle-ci. Ces échanges se passent au travers de chaque grain de phase stationnaire et sont régis par les coefficients de partage de A et B. Ceux-ci n'ayant aucune raison d'être identiques, la vitesse de migration de la zone est différente pour ces deux composants. La colonne se charge progressivement en A vers le bas, si c'est A qui a le coefficient de partage le plus favorable à la dissolution dans la phase mobile, et en B vers l'arrière. Bientôt, la zone se dédouble et la séparation est effective entre A et B. Une technique, parfois utilisée au niveau de la préparation, consiste à isoler effectivement, en les sortant de la colonne, les sections contenant les produits séparés, et à extraire chacun d'eux par un solvant convenable. Mais, dans la majorité des cas, on procède au développement par élution. On fait passer une quantité suffisante d'éluant pour que le contenu des zones A et B, lorsque celles-ci sont parvenues au bout de la colonne, y soient détectées, puis éventuellement récupérées.

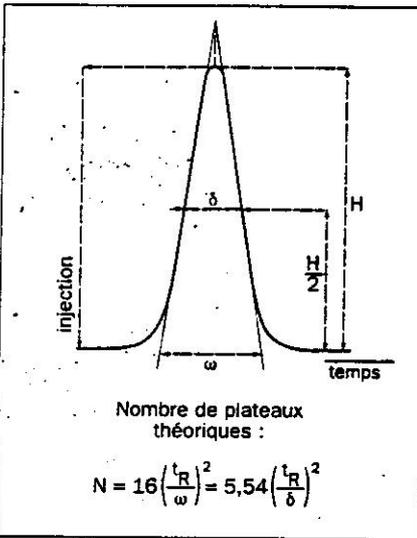
Quelques définitions

De nombreux paramètres sont utilisés pour caractériser une analyse par chromatographie.

Temps de rétention. Le temps t_R que met une substance, de l'injection jusqu'à la sortie de la colonne, s'appelle *temps de rétention*. Le temps de rétention dépend beaucoup de l'éluant, autrement dit de la phase mobile. Ainsi, un constituant peut être plus ou moins retenu par l'ajout d'un éluant d'une plus grande force. De plus, la rétention d'une substance dépend du choix de la phase stationnaire.

Si la quantité d'échantillon injectée est suffisamment petite, on obtient pour chaque composé élué un pic symétrique et gaussien. Le temps de rétention est le temps qui s'écoule entre l'instant d'injection du mélange et l'instant correspondant au sommet du pic.

La hauteur du pic permet d'obtenir la concentration de la substance éluee. Les molécules du soluté ne passent pas tout le temps t_R dans la phase stationnaire. Elles consacrent le temps t_m à parcourir les vides et interstices de la colonne. En pratique, cette durée comporte également le temps de balayage des volumes de l'injecteur, du détecteur et des tuyaux de raccordement, volumes qu'il convient de réduire au maximum, mais qui ne peuvent être complètement éliminés. Ce temps t_m , qui est en quelque sorte le temps de rétention d'un composé non retenu, est appelé *temps mort*. En soustrayant ce temps mort t_m du



Le nombre de plateaux théoriques permet de mesurer l'efficacité d'une colonne chromatographique. Pour le calculer, il faut effectuer des mesures sur les pics du chromatogramme. L'allure de chaque pic variant d'un composé à l'autre, le nombre de plateaux théoriques dépend du composé auquel on s'intéresse.

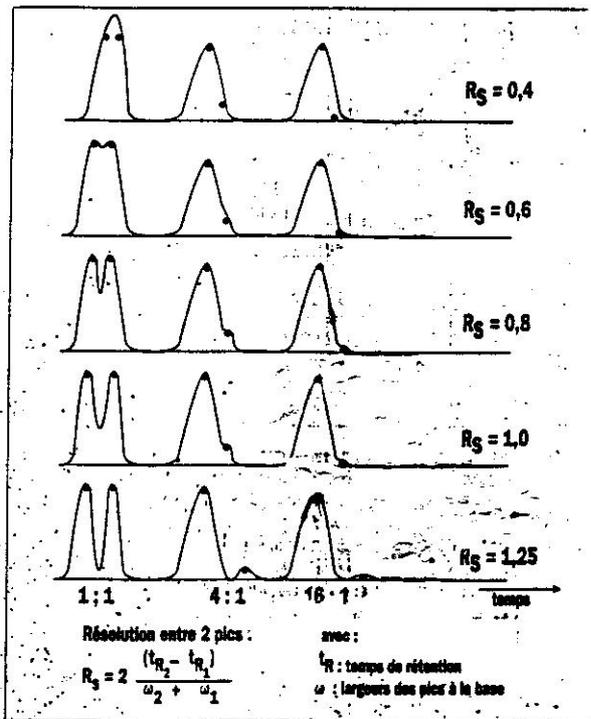
mètres géométriques d'une colonne. Dénomme k' , le facteur de capacité est défini très simplement à l'aide de la relation $k' = t'_R/t_m$, dans laquelle t'_R désigne bien sûr le temps de rétention réduit et t_m le temps mort.

Au lieu d'utiliser le temps de rétention et le temps mort pour définir le facteur de capacité, on peut utiliser le volume d'élution V_R d'un composé et le volume d'élution V_m d'une substance inerte (solvant). k' est alors obtenu par la relation $k' = (V_R - V_m)/V_m$ et il correspond au rapport entre la quantité de soluté dans la phase stationnaire et la quantité de soluté dans la phase mobile. Il caractérise donc bien la rétention d'un composé. Lorsque $k' = 0$, le composé n'est pas retenu sur la phase stationnaire. Lorsque k' est inférieur à 1 et d'une façon générale pour les faibles valeurs de k' , cela signifie que les composés ne sont que très peu retenus sur la colonne. Les pics correspondants sortent très près du pic inerte. Le domaine optimal de séparation se situe pour un k' variant de 1 à 15.

Nombre de plateaux théoriques. L'efficacité d'une colonne est démontrée lorsque tous les pics du chromatogramme apparaissent séparés. Une mesure quantitative de cette efficacité est donnée par le nombre de plateaux théoriques.

L'appellation de ce terme mérite une explication. Au lieu de considérer le déplacement réel, continu, de la phase mobile, on admet que celle-ci progresse par transferts successifs et se met en équilibre avec la phase stationnaire entre deux transferts, ce qui permet de découper fictivement la colonne en un certain nombre de zones où les équilibres sont réalisés et que l'on appelle plateaux théoriques. La théorie établit que, après un certain parcours dans la colonne, les pics d'élution peuvent être assimilés à des courbes de Gauss, dont l'écart-type σ (exprimé en unités de temps) est lié au nombre N de plateaux théoriques parcourus, suivant la relation $\sigma^2 = t_R^2/N$. En utilisant les caractéristiques de la courbe de Gauss, on peut calculer le nombre N de plateaux théoriques en mesurant la largeur du pic à la base du pic (ω), ou bien la largeur à mi-hauteur (δ). On a : $N = 16(t_R/\omega)^2 = 5,54(t_R/\delta)^2$. Etant donné que l'on obtient avec une

La résolution est un paramètre permettant de définir la qualité de la séparation entre deux pics.



colonne efficace des pics plus fins, donc avec des largeurs ω et δ plus faibles, la valeur de N sera plus importante que sur une colonne non efficace (du moins pour un même temps de rétention). **La résolution.** Le but d'une analyse chromatographique est d'obtenir, dans un temps le plus court possible, des pics séparés. La séparation entre deux pics est d'autant meilleure que la résolution R est grande. Par définition, la résolution est le quotient entre la différence des temps de rétention entre deux pics et la moyenne des largeurs de ces pics à la

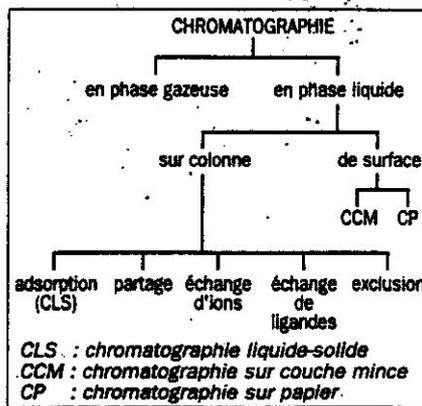
base. Dans les bonnes séparations, les valeurs de R sont supérieures à 1. Des valeurs plus grandes que 1,5 ne sont pas toujours recherchées car cela ne fait qu'augmenter le temps de l'analyse et n'apporte aucune information supplémentaire intéressante. Même des valeurs de $R = 0,5$ permettent encore de donner des informations sur le nombre de composés, mais ne permettent plus de le quantifier correctement.

Pour mesurer la qualité d'une séparation on utilise aussi le facteur de sélectivité α , défini comme étant le rapport entre les temps de rétention relatifs t'_R de deux pics.

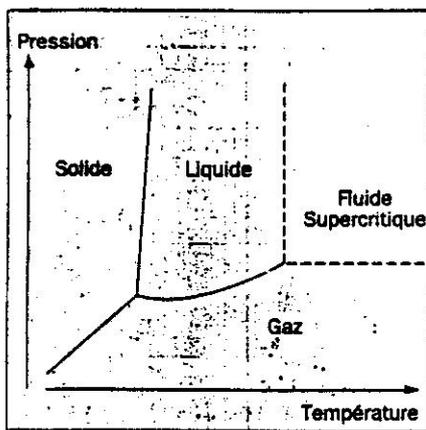
De multiples techniques...

On distingue deux grandes classes de chromatographie, la chromatographie en phase liquide et la chromatographie en phase gazeuse. Dans le premier cas la phase mobile est un liquide ; dans le second, il s'agit d'un gaz. La chromatographie en phase liquide (CPL) est apparue en 1903, bien avant la chromatographie en phase gazeuse (CPG), qui a été inventée en 1951.

A ces deux classes est venue s'ajouter ces dernières années la chromatographie supercritique, pour laquelle la phase mobile est "supercritique" (ni liquide



La chromatographie peut avoir de multiples variantes. Les appareils faisant appel à des colonnes pour séparer les composés sont de loin les plus répandus.



Ce diagramme de phase est presque classique. Simplement, il comporte une zone (localisée par les pointillés), pour laquelle il n'y a pas de changement de phase pour passer de l'état gazeux vers l'état de "fluide supercritique". C'est la même chose pour passer de l'état liquide vers l'état de "fluide supercritique". Les chromatographes supercritiques, apparus récemment, exploitent cette propriété.

ni gazeuse). Celle-ci a été inventée en 1962 par Klesper et ce n'est qu'en 1982 que le premier chromatographe supercritique a fait son apparition sur le marché.

Il y a plusieurs différences essentielles entre la chromatographie en phase liquide (CPL) et la chromatographie en phase gazeuse (CPG). La première, c'est que les coefficients de diffusion dans les liquides sont 10^4 à 10^5 fois plus petits que dans les gaz. Du coup, l'efficacité des colonnes de la CPL est *a priori* moins bonne et les séparations prennent plus de temps.

Autre différence, la viscosité des liquides est environ 100 fois plus grande que celle des gaz. La perte de charge est donc plus importante en CPL qu'en CPG, et les pressions nécessaires pour réaliser l'injection sont plus importantes. Ajoutons que la CPL travaille à une température bien moins élevée que la CPG, et se pratique le plus souvent à la température ambiante. Il n'y a donc pas de transformation chimique des solutés alors qu'en CPG on observe parfois des réactions d'isomérisation, de pyrolyse ou de polymérisation.

Pendant longtemps, la CPG a pris le des-

sus sur la CPL, parce que plus simple, souvent plus rapide et plus sensible. La chromatographie en phase liquide n'en a pas moins fait des progrès considérables grâce à la miniaturisation des colonnes et la détection en continu des fractions. Par ailleurs, la préparation de l'échantillon avant son injection est devenue plus simple qu'en CPG. Ceci étant, elle souffre encore de l'absence de détecteurs aussi universels que ceux utilisés pour la CPG.

Quant à la chromatographie supercritique, complexe à utiliser, elle est restée cantonnée jusqu'ici aux applications de recherche.

...complémentaires

La chromatographie en phase liquide est bien adaptée à l'analyse de substances peu volatiles, notamment celles dont la masse moléculaire est importante et les substances ionisées. Elle convient également bien aux substances thermolabiles, c'est-à-dire aux molécules sensibles à une élévation, même modérée, de la température (ce qui est le cas de nombreux composés organiques ou d'intérêt biologique). La liste des composés analysés par la CPL est immense : citons les protéines, les acides nucléiques, les vitamines, les produits pharmaceutiques, les lipides, les colorants, les drogues, les pesticides, les acides aminés, les stéroïdes, les polymères synthétiques, les liquides physiologiques, les explosifs et propergols, les produits chimiques industriels, les produits pétroliers, etc.

Le champ d'application de la chromatographie en phase gazeuse est lui aussi immense : les liquides vaporisables correspondent à la majorité des applications.

Pour ce qui est de la chromatographie supercritique enfin, elle se révèle intéressante pour les molécules thermolabiles, les molécules "chirales" (qui ont les mêmes propriétés physiques mais des propriétés chimiques différentes) et pour les molécules polaires.

Sources : *Encyclopédie Universalis, ouvrages de Rosset/Caude/Ardy et Tranchant parus chez Dunod, catalogue Merck.*

Jean-François Peyrucat

De multiples méthodes de détection

Une des raisons du succès de la chromatographie en phase gazeuse est qu'il existe de nombreux procédés de détection des variations de composition d'un effluent gazeux. Parmi les détecteurs, les catharomètres, qui mesurent la conductibilité thermique du gaz, sont parmi les plus utilisés. On emploie aussi très couramment les détecteurs à ionisation de flamme, basés sur la formation d'ions collectés au moyen de deux électrodes. Les détecteurs thermo-ioniques utilisent un principe assez semblable (on ajoute un composé alcalin dans la flamme). Citons aussi les détecteurs à capture d'électrons, basés sur une ionisation du gaz vecteur par une source radioactive. Il existe aussi les détecteurs à photométrie de flamme, les détecteurs à ionisation d'argon ou d'hélium, les détecteurs électrochimiques, les détecteurs infrarouge et bien d'autres. Le couplage CPG-spectromètre de masse est en plein essor : celui-ci permet, outre la détection des fractions, l'identification des produits par leur spectre de masse ou par le pic le plus lourd. La chromatographie supercritique utilise les mêmes types de détecteurs que la CPG. Quant à la chromatographie en phase liquide, la détection des fractions est le plus souvent faite par absorption UV (ultraviolet) ou par réfractométrie. On trouve aussi les détecteurs à absorption IR (infrarouge) et visible, les détecteurs fluorimétriques, les détecteurs électrochimiques, les détecteurs radioactifs, les détecteurs à émission de flamme, les détecteurs par diffusion de la lumière. On trouve aussi le couplage CPL-spectromètre de masse.

**SPECTROSCOPIE
ULTRAVIOLET VISIBLE**

ENERGIE ELECTRONIQUE
SPECTROSCOPIE ULTRAVIOLET VISIBLE

Le domaine de la spectroscopie ultraviolet visible correspond à des énergies plus importantes que l'infra rouge. Ce sont les niveaux d'énergie électronique qui sont concernés. Le domaine des longueurs d'onde correspond à l'intervalle de 800 à 400 nm pour le visible, 400 à 200 nm pour l'ultraviolet "quartz" et au-delà de 200 nm pour l'ultraviolet lointain. En spectroscopie pratique classique le domaine accessible correspond à l'intervalle

800 ————— 200 nm

Pour analyser dans le visible les cellules peuvent être en verre ; dans l'ultraviolet "quartz" les études nécessitent l'utilisation de la silice (transparente en rayonnement ultraviolet).

I) THÉORIE

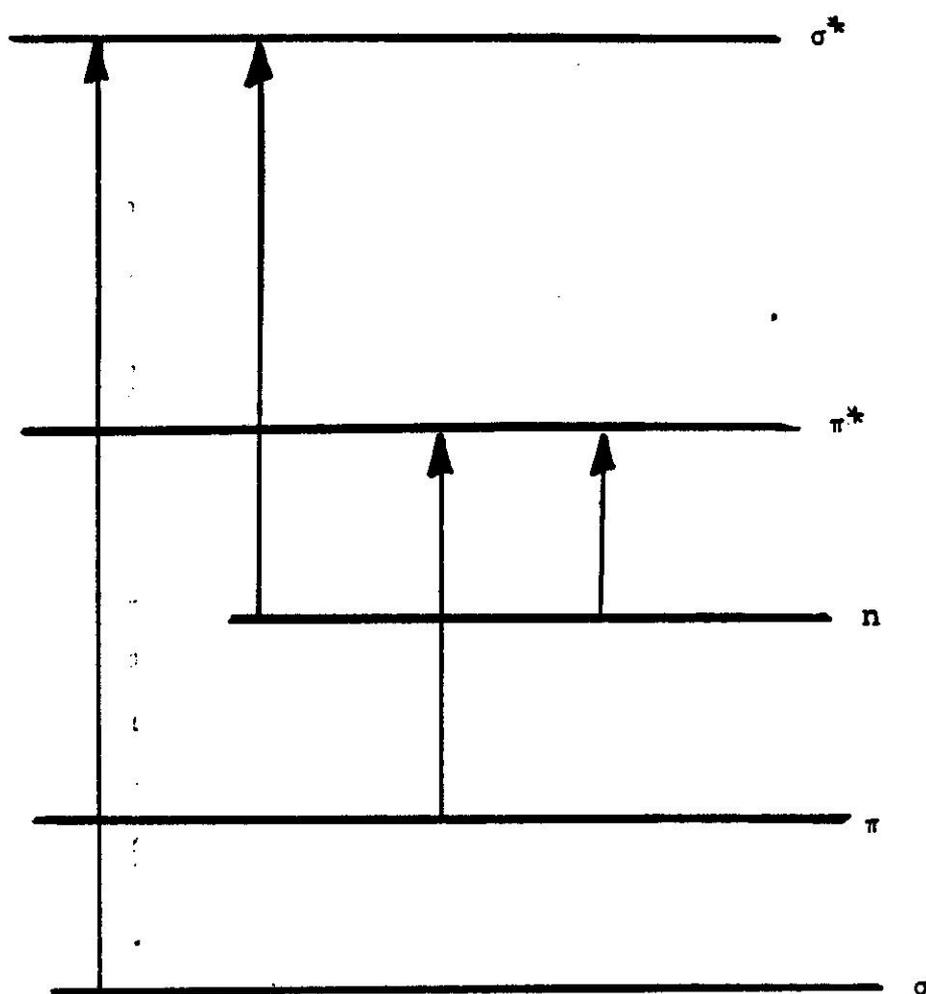
Lorsque des atomes forment une liaison chimique leurs électrons occupent une nouvelle orbitale : une orbitale moléculaire.

Rappelons qu'il existe des orbitales liantes, antiliantes et non liantes. A une orbitale liante de faible énergie correspond une orbitale antiliante de très haute énergie formant l'état excité.

Il existe donc des orbitales liantes σ et π et antiliantes σ^* et π^*

Les électrons de valence qui ne participent pas à la liaison sont des électrons n (non liants). Dans les molécules organiques, on les rencontre principalement dans les orbitales atomiques de l'azote, de l'oxygène, du soufre et des halogènes.

La répartition en énergie de ces différentes orbitales est représentée sur la fig. ()



Les transitions électroniques sont dues à l'absorption d'un quantum d'énergie U.V visible par des électrons des orbitales n π ou σ et à

leur passage à une orbitale antiliante d'énergie supérieure.

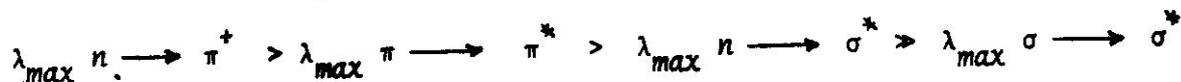
Les transitions possibles sont donc les suivantes



La fig () montre qu'au point de vue énergétique le classement par ΔE croissant est le suivant :



Le classement en longueur d'onde décroissante pour les maxima d'absorption est donc le même



Prenons quelques exemples

- Les hydrocarbures saturés ne possèdent que des chaînes carbonées et donc que des orbitales σ .

Les seules transitions possibles sont des transitions $\sigma \longrightarrow \sigma^+$
Ces transitions de très haute énergie sont responsables d'absorption dans l'ultraviolet lointain.

ex : propane : 135 nm.

N'absorbant pas dans l'UV quartz, ces composés constituent de bons solvants pour la spectroscopie UV classique.

- Les composés comme le méthanol $\text{CH}_3 - \text{OH}$ ou la triméthylamine $(\text{CH}_3)_3 - \text{CNH}_2$ possèdent des orbitales σ , σ^+ et n (sur l'hétéro-atome)

il existe donc des transitions $n \longrightarrow \sigma^+$

λ_{\max} = 183 nm Méthanol

λ_{\max} = 227 nm Triméthylamine

- Les dérivés carbonés insaturés possèdent des orbitales π et π^+ et présentent des transitions $\pi \longrightarrow \pi^+$

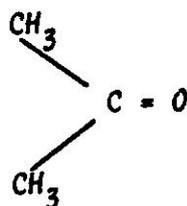
Butadiène

λ_{\max} 217 nm



- Les dérivés insaturés à hétéro-atome présentent des orbitales π , π^+ et n et présentent des transitions $\pi \longrightarrow \pi^+$ et $n \longrightarrow \pi^+$

La transition $n \longrightarrow \pi^+$ apparaît à la plus grande longueur d'onde et présente une absorptivité molaire faible.



$\pi \longrightarrow \pi^+$	λ_{\max} 190 nm	ϵ : 1000
$n \longrightarrow \pi^+$	λ_{\max} 280 nm	ϵ : 14

II - NOMENCLATURE DESCRIPTIVE

Les bandes d'absorption qui apparaissent sur les spectres UV visibles peuvent être dénommées de façon descriptive par les lettres E, K, B, R.

Les bandes E ou Ethyléniques apparaissent dans les dérivés insaturés. Elles correspondent à des transitions $\pi \longrightarrow \pi^+$ d'intensité forte (ϵ grand). On les rencontre aussi dans l'absorption du noyau benzénique.

Les bandes B ou Benzénoïdes, sont visibles sur les spectres de composés possédant un noyau aromatique. Elles correspondent à des transitions



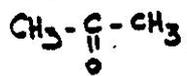
Les bandes R ou Radicalaires correspondent aux transitions de faible intensité $n \longrightarrow \pi^+$ (cétone, aldéhydes, etc ...)

Enfin les bandes K (Konjugviate) ou de conjugaison apparaissent dans les dérivés où existe une conjugaison

exemple

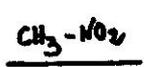
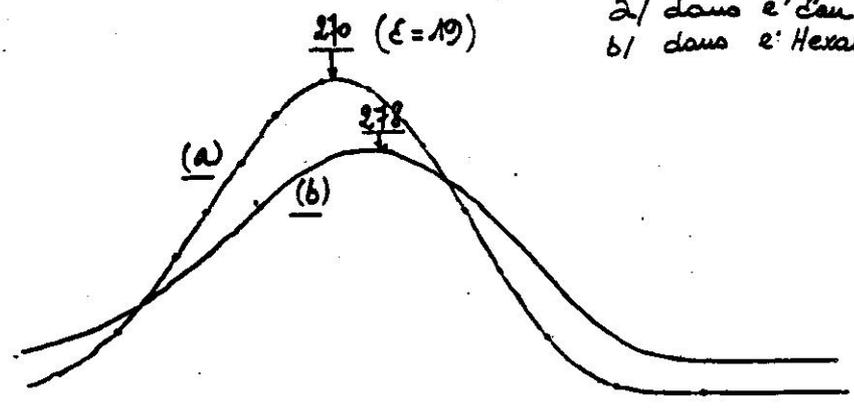
Par ordre d'énergie croissante l'ordre des bandes est R B K E

par ordre de longueur d'onde croissante il est E K B R



Acetone

a/ dans e' Eau
b/ dans e' Hexane



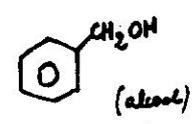
Nitromethane

(alcool)

$\epsilon = 19$

Bande R
 $n \rightarrow \pi^*$

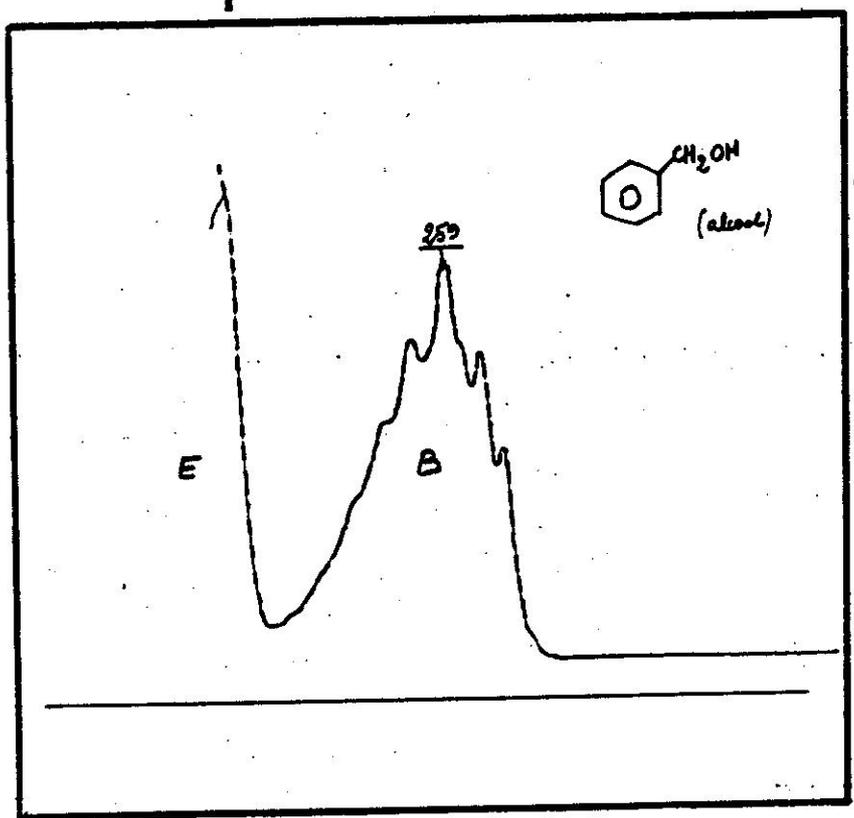
273

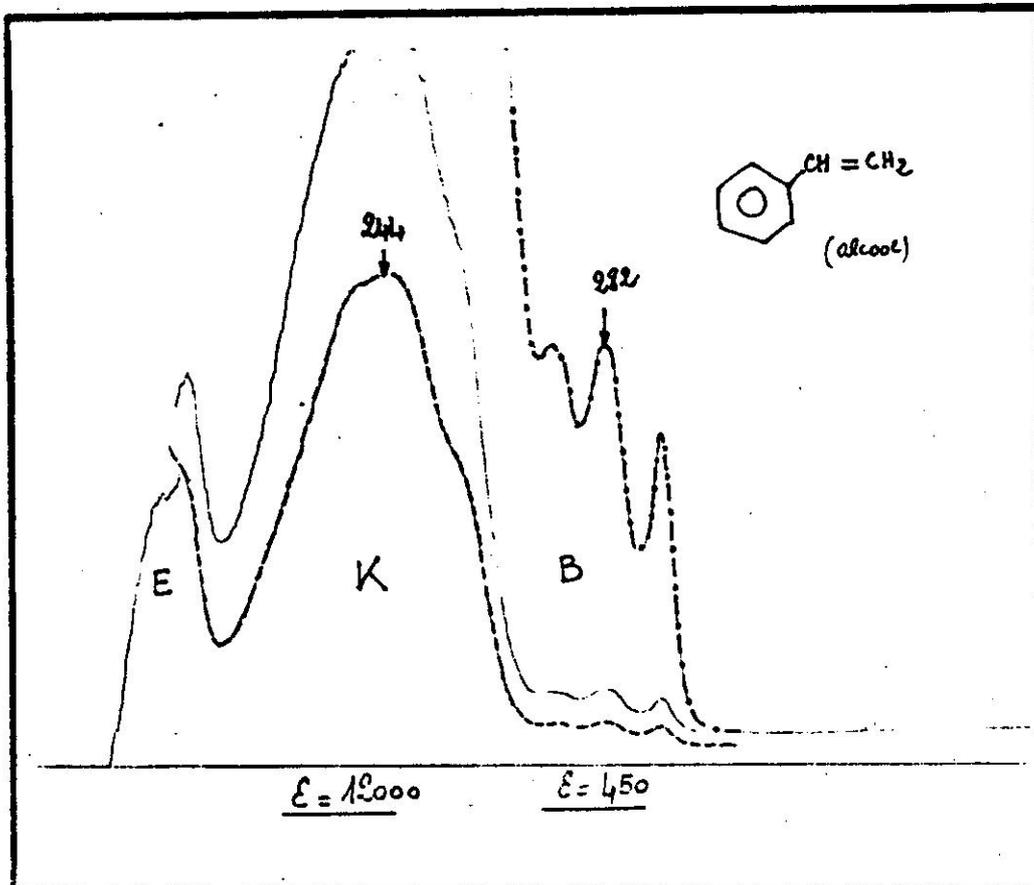
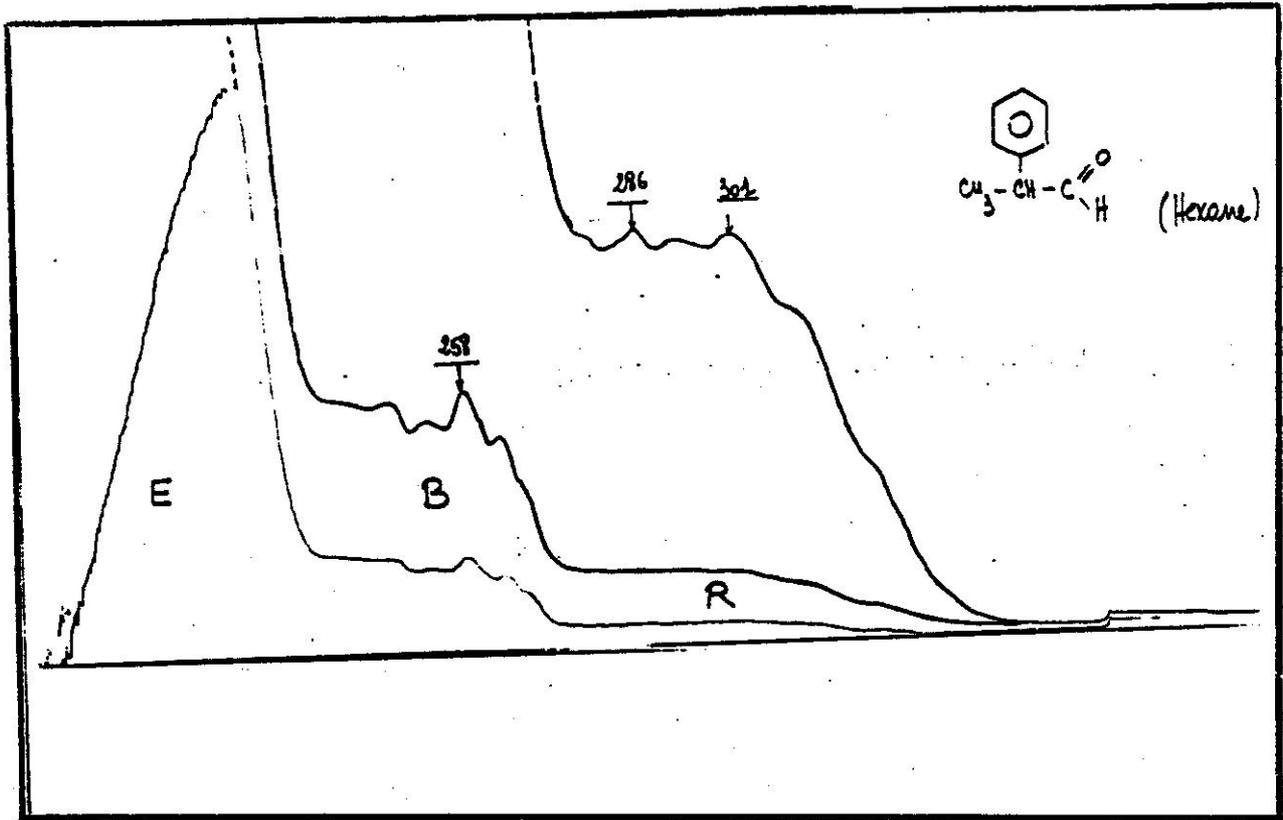


259

E

B





III - GROUPEMENTS CHROMOPHORES ET AUXOCHROMES

Un groupement chimique susceptible d'absorber dans le domaine UV-visible est un chromophore (qui porte la couleur)

ex.: le groupement carbonyle est un chromophore.

Des groupements fonctionnels comme OH ; NH₂, qui possèdent des électrons non liants, mais n'absorbent pas au-dessus de 200 nm et qui liés à un chromophore en modifie les caractéristiques d'absorption sont des Auxochromes.

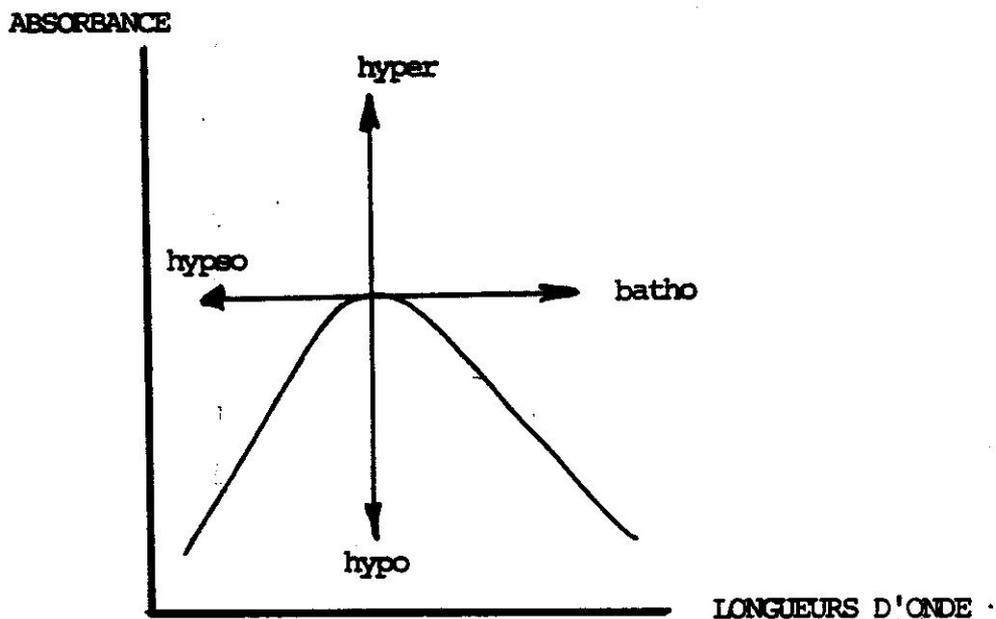
Ils peuvent modifier l'absorption en position ou en intensité.

- position : si le glissement de la bande d'absorption a lieu vers les grandes longueurs d'onde, le glissement est Bathochrome

s'il a lieu dans les courtes longueurs d'onde, il est Hypochrome.

- Intensité : Si l'intensité est augmentée, l'effet est hyperchrome.

Si l'intensité est diminuée, l'effet est hypochrome.



IV - FACTEURS MODIFIANT LA POSITION DES BANDES D'ABSORPTION

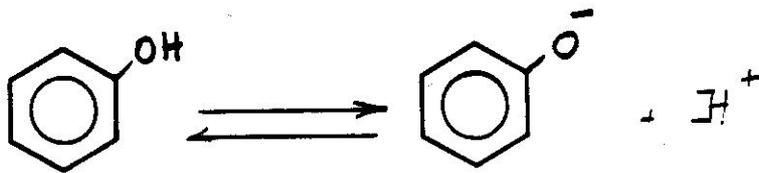
A - EFFET DE pH

En transformant la structure des espèces absorbantes, le pH peut induire des modifications dans la position et l'intensité des bandes d'absorption.

- Cas des Phénols

Les phénols présentent comme le benzène une bande E et une bande B. Le groupement auxochrome OH provoque le déplacement bathochrome de la bande B du benzène.

En milieu alcalin, le phénol se transforme en ion phénate.



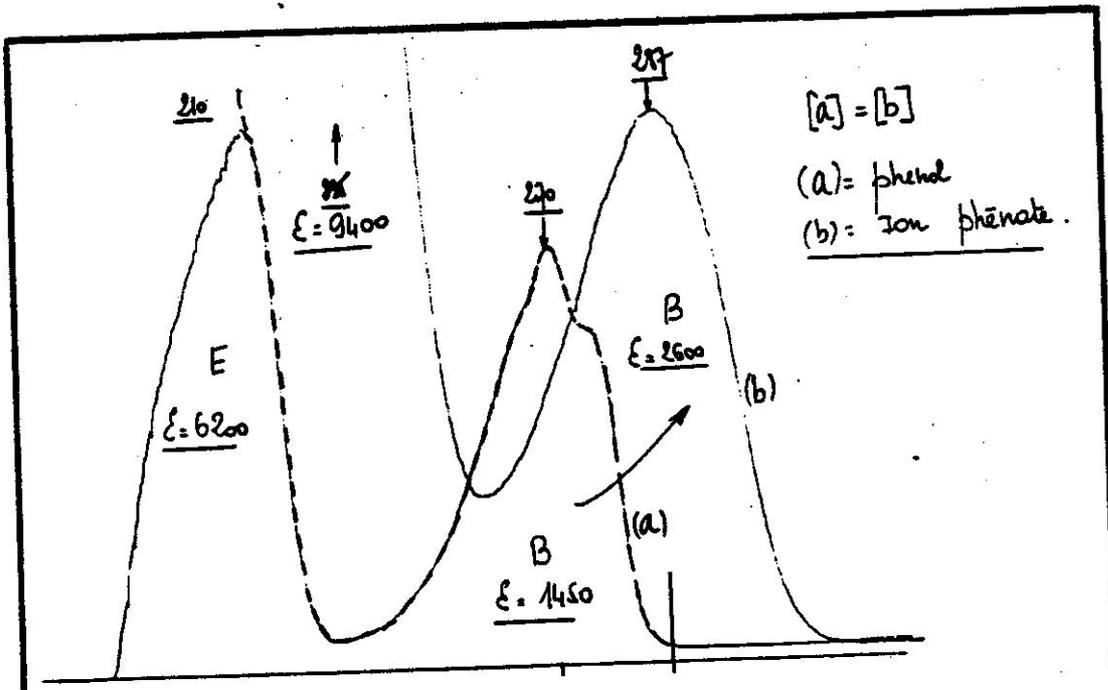
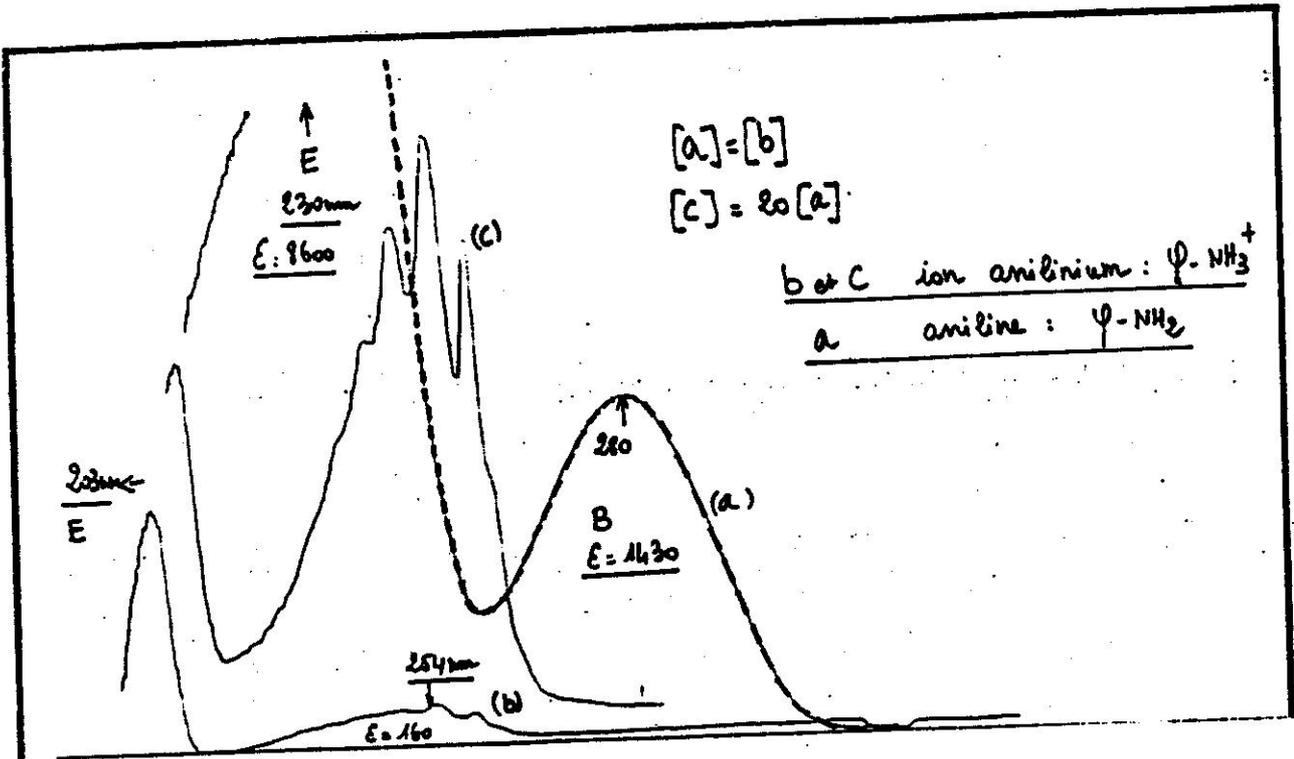
L'apport d'électrons augmentent l'interaction $n \rightarrow \pi$ et provoque un glissement bathohyperchrome. Celui-ci est utilisé à des fins analytiques pour rechercher la présence des phénols et pour mesurer le pK_a de ces acides très faibles ($pK = 10$)

Phénol	λ_{max} 210	ϵ : 6200
	λ_{max} 270	ϵ : 1450

Phénate	λ_{max} 235	ϵ : 9400
	λ_{max} 287	ϵ : 2600

- Cas des amines aromatiques

L'aniline a un spectre voisin de celui du phénol. En milieu acide le groupement aminé se protone donnant lieu à la formation de l'ion anilinium



Il n'y a plus d'électron libre sur l'azote et donc il y a diminution de l'interaction $n \rightarrow \pi$ par suite on observe un glissement hypsohypochrome.

Dans ces conditions le spectre de l'ion anilinium est très voisin de celui du benzène et du solvant peu polaire on peut observer la structure fine de vibration.

B - EFFETS DE SOLVANTS

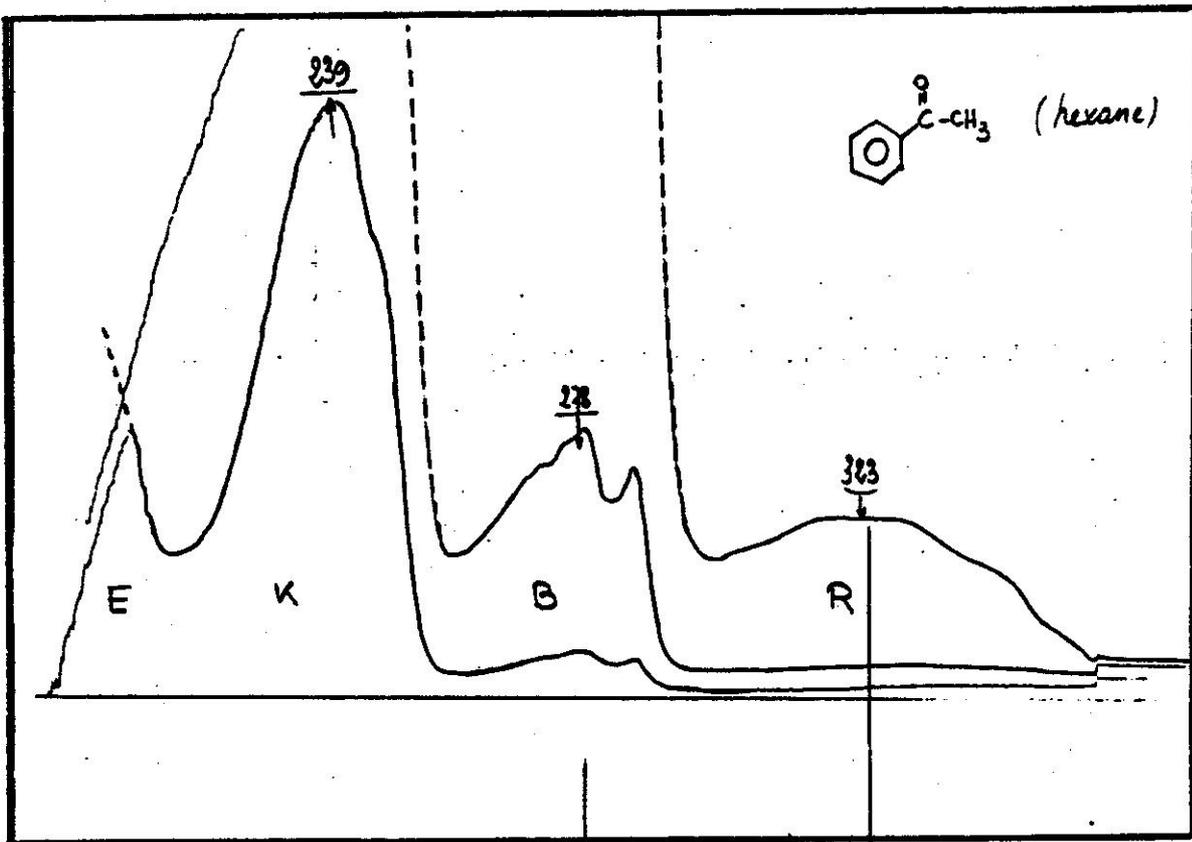
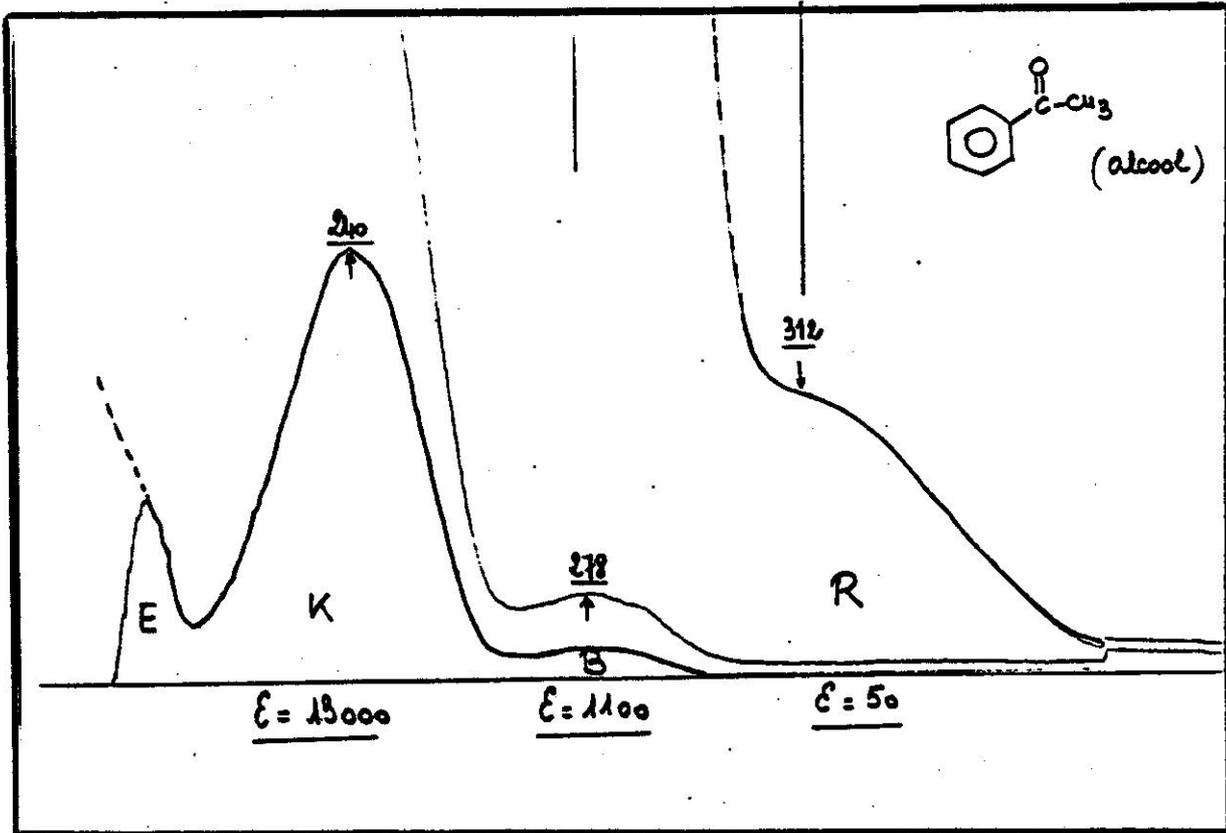
Les transitions $n \rightarrow \pi^+$ sont sensibles à la polarité du solvant.

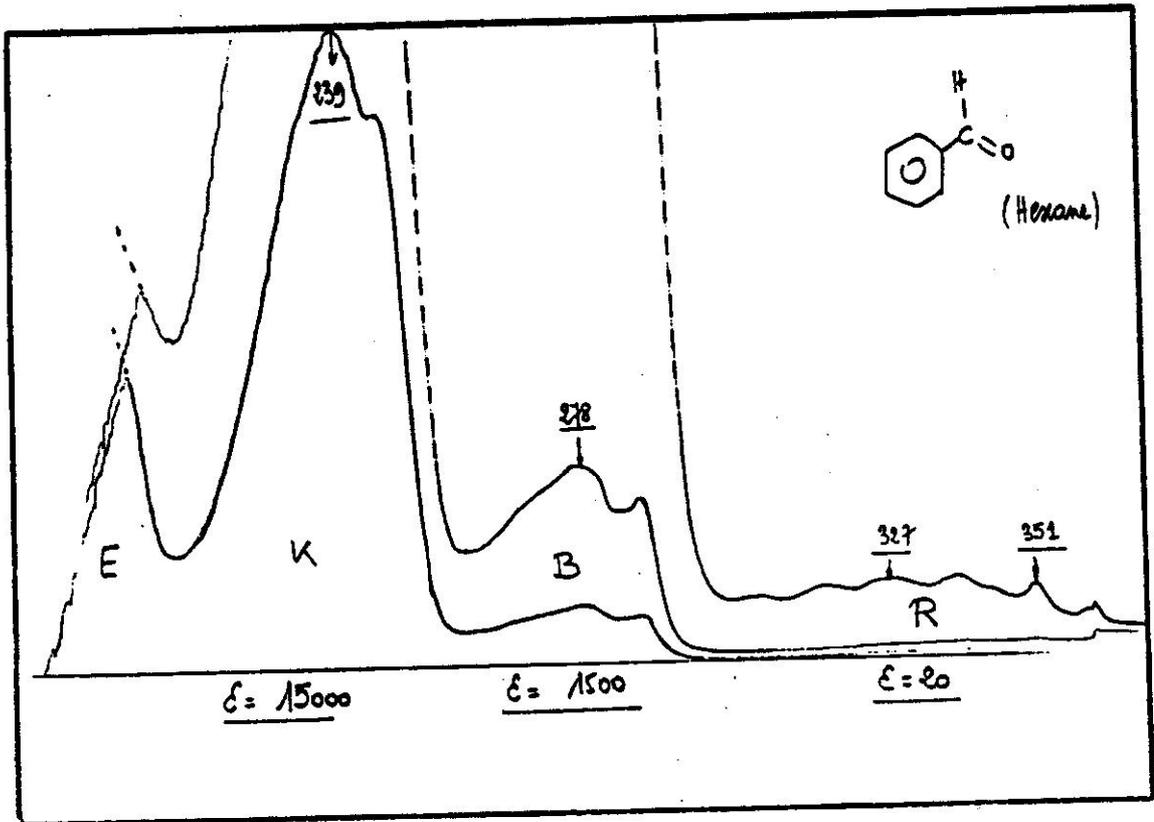
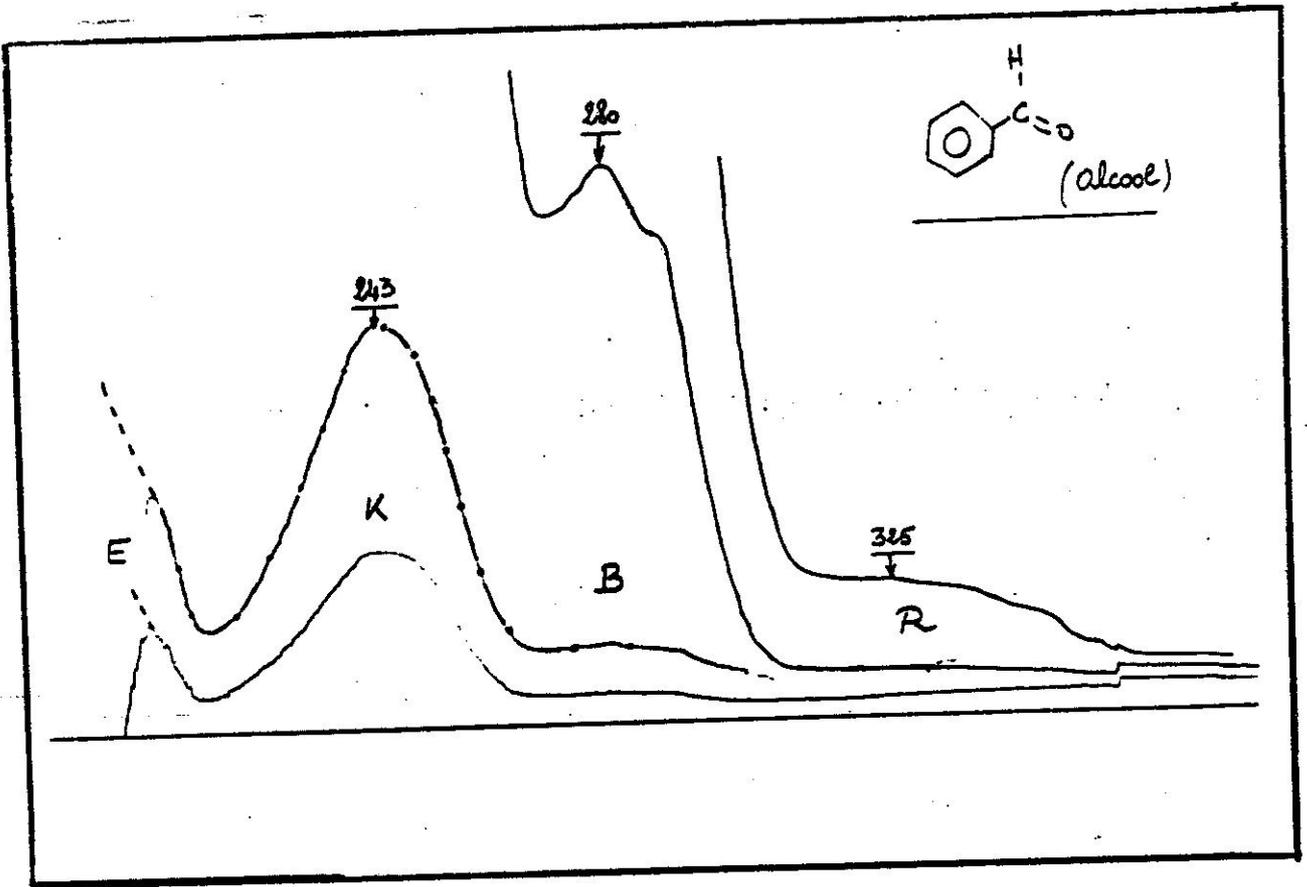
Quand la polarité du solvant augmente, l'espacement des niveaux augmente et il faut plus d'énergie pour opérer la transition qui a lieu pour des longueurs d'ondes plus basses.

Acétone

Par ordre de polarité décroissante

Eau	265 nm
méthanol	270 nm
CHCl ₃	276 nm
Hexane	279 nm
CCl ₄	280 nm





ANALYSE QUANTITATIVE PAR ABSORPTION

DE RADIATION ÉLECTROMAGNÉTIQUE

Le principe de l'utilisation de la spectroscopie pour la mesure des concentrations est très simple. Ceci peut être effectué aisément en spectroscopie optique (infrarouge, ultraviolet, visible).

Les lois de l'absorption ont d'abord été formulées vers 1730 par LAMBERT puis BOUGUER, et étendues aux solutions de concentrations variables par BEER aux environs de 1850. La loi que l'on emploie aujourd'hui est communément dénommée : Loi de Beer-Lambert.

1) RAPPELS DES SYMBOLES EMPLOYÉS :

- λ : longueur d'onde de la radiation utilisée
- ν : fréquence de la radiation
- $\bar{\nu}$: nombre d'ondes de la radiation
- c : vitesse de la lumière
- T : transmittance
- A : absorbance (anciennement : densité optique - D.O.)
- I_0 : intensité de la radiation incidente
- I : intensité de la radiation transmise
- ϵ (ou E) : absorptivité ou coefficient d'extinction spécifique
- l : trajet optique (épaisseur de solution traversée par le rayonnement :
largeur de la cellule)
- C : concentration de l'espèce en solution

TABLEAU DES SYMBOLES EMPLOYES, ET UNITES :

	Relations simples les reliant	unités
λ	$\lambda = \frac{c}{\nu} = \frac{l}{\bar{\nu}}$	$\mu\text{m.}$
ν	$\nu = \frac{c}{\lambda} = c \cdot \bar{\nu}$	H_2
$\bar{\nu}$	$\bar{\nu} = \frac{l}{\lambda}$	cm^{-1} (si λ en cm)
c		$3 \cdot 10^8 \text{ m s}^{-1}$
T	$T = \frac{I}{I_0}$ ou : $T = \frac{I}{I_0} \times 100$ (en %)	sans dimension
A	$A = \log_{10} \left(\frac{I}{T} \right) = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = \epsilon \cdot l \cdot C$	sans dimension
I_0 I	$T = \frac{I}{I_0}$	
ϵ (ou E)	$A = \epsilon \cdot l \cdot C$	<ul style="list-style-type: none"> • $1 \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{si C}$ en $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ • $1 \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$, si C en $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$
l	$A = \epsilon \cdot l \cdot C$	cm (1 cm)
C	$A = \epsilon \cdot l \cdot C$	$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$

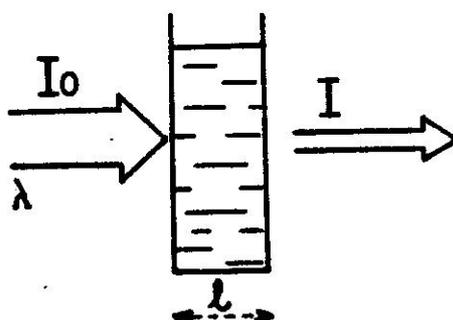
2) DEFINITIONS. CAS D'UNE SUBSTANCE PURE UNIQUE :

Lorsqu'une substance en solution (concentration : C), dans une cellule d'épaisseur : l, absorbe une radiation de longueur d'onde définie : (λ) et d'intensité : I_0 , l'intensité de la radiation retransmise : I suit la loi :

$$T = \frac{I}{I_0}$$

sachant que :

$$I = I_0 \cdot e^{-k.l.C}$$



L'absorbance est définie par :

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right)$$

(logarithme à base : 10)

ou $A = 0,4343 \cdot \log_{\text{nep}} \left(\frac{I_0}{I} \right)$

Il vient :

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C$$

ϵ = coefficient d'absorption molaire ($\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

l = épaisseur en cm de la solution traversée.

C = concentration molaire.

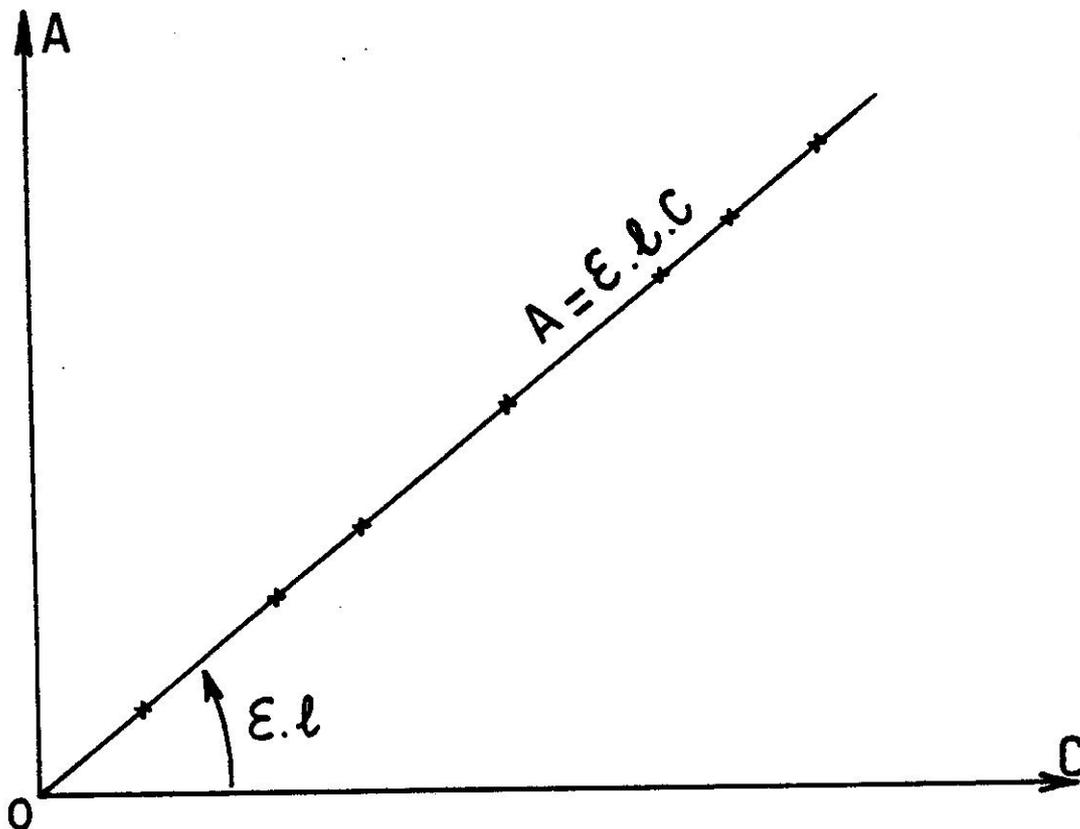
La fonction : Absorbance (A) présente un intérêt évident puisqu'elle est liée directement à l'épaisseur (l) et à la concentration (C). La constante de proportionnalité (ϵ) est caractéristique de la substance absorbante pour une longueur d'onde donnée, en solution dans un solvant donné.

Pour une cellule définie ($l = \text{constante}$), la mesure de l'absorbance d'une substance à une longueur d'onde définie (donc $\epsilon = \text{constante}$) est directement proportionnelle à la concentration :

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C = K \cdot C$$

La représentation graphique de l'absorbance en fonction de la concentration est une droite :

- de pente : $K = \epsilon \cdot l$
- d'ordonnée à l'origine nulle : la droite passe par l'origine des axes.



3) DROITE D'ETALONNAGE :

Lors de la détermination de la concentration d'une substance en solution, il est nécessaire d'établir une droite d'étalonnage, car ϵ n'est pas connu.

En effet, la mesure de l'absorbance, pour cette solution inconnue (et à une longueur d'onde choisie) donne :

$$A_x = \epsilon \cdot l \cdot C_x$$

Les mesures d'absorbances pour des solutions de concentrations définies et connues, de la gamme d'étalonnage donnent :

$$A_1 = \epsilon \cdot l \cdot C_1$$

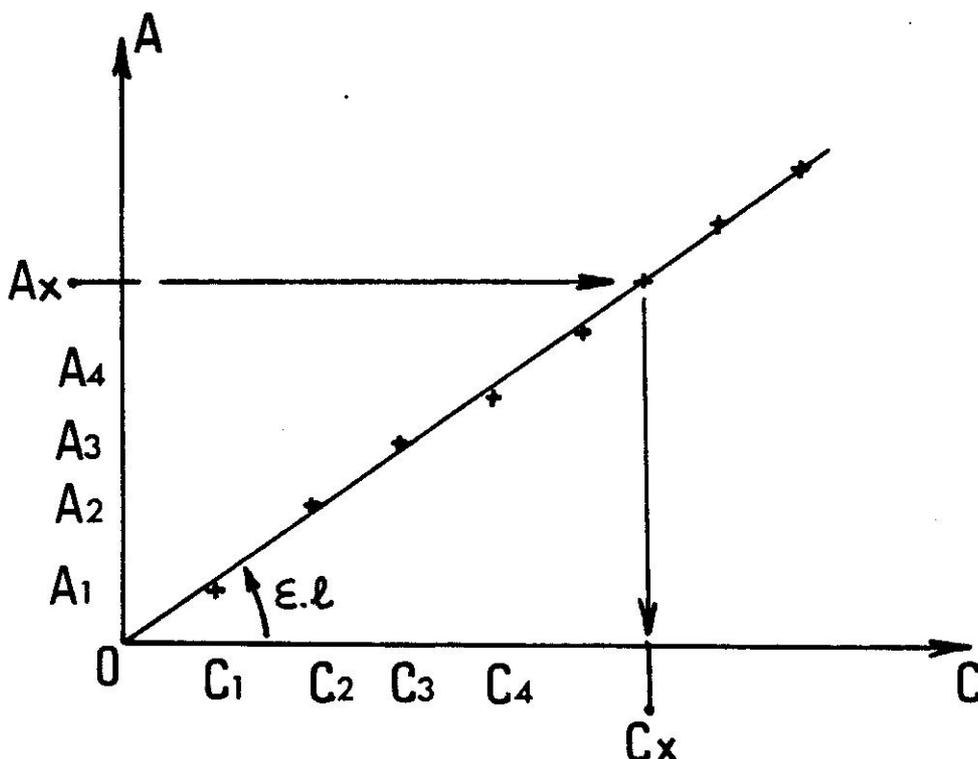
$$A_2 = \epsilon \cdot l \cdot C_2$$

$$A_3 = \epsilon \cdot l \cdot C_3$$

$$\vdots$$

$$A_n = \epsilon \cdot l \cdot C_n$$

La représentation graphique de ces couples de valeurs donne la droite d'étalonnage, de pente : $\epsilon \cdot l$, passant par l'origine des axes.



La mesure des absorbances est entachée d'erreurs expérimentales : de ce fait, les points ne sont pas toujours parfaitement alignés. La construction de la droite d'étalonnage sera alors réalisée après calcul de son équation mathématique (calcul de la droite de régression).

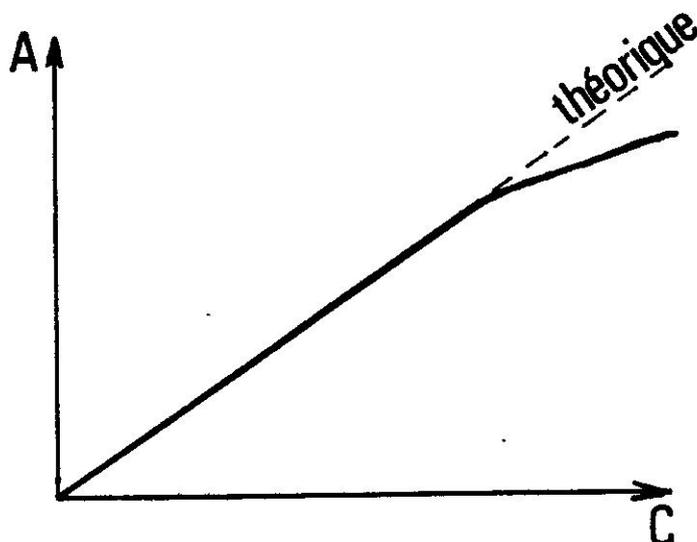
L'absorbance : A_x de la solution inconnue est rapportée sur la droite, et donne la concentration : C_x .

4) VALIDITE DE LA LOI DE BEER-LAMBERT :

Le calcul mathématique de l'absorbance est effectué par intégration du phénomène d'absorption du niveau élémentaire (segment de cellule) au niveau global (absorption dans toute l'épaisseur de la cellule). De ce fait, l'expression de la loi de BEER-LAMBERT suppose une substance absorbante régulièrement disposée dans le volume de la cellule, pour pouvoir appliquer le calcul intégral (solution homogène).

L'équation : $A = \epsilon \cdot l \cdot C$ est mathématiquement du type : $y = a \cdot x$ donc ayant une représentation graphique de type : droite, de pente : $\epsilon \cdot l$, et d'ordonnée à l'origine nulle.

Expérimentalement, il est possible d'obtenir une gamme d'étalonnage à partie basse linéaire, mais qui dévie pour les fortes valeurs de concentrations.



Cette déviation de la loi de BEER-LAMBERT provient soit de la substance absorbante, soit des conditions opératoires :

- Substance :

- . sa nature peut varier (ϵ sera modifié) par : hydrolyse, ionisation, polymérisation, liaisons hydrogène, etc.
- . sa formation de coagulum (trouble qui diffuse la lumière)
- . indice de réfraction non négligeable, pour certaines solutions
- . fluorescence de la substance

- Conditions opératoires :

- . non monochromatisme
- . appareillage défectueux (lumière parasite) ou mal réglé (bande passante).

5) L'ERREUR PHOTOMETRIQUE

Dans les meilleures conditions possibles la précision des mesures photométriques est limitée à la fois pour les hautes concentrations et pour les faibles concentrations.

En effet :

- aux hautes concentrations peu de lumière atteint le détecteur,
- aux faibles concentrations l'intensité transmise est peu différente de l'intensité incidente et il est difficile de mesurer avec précision cette petite différence.

Si l'erreur: sur la détermination de la concentration est due à l'erreur de lecture de transmittance dT , on sait que d'après la loi de Beer :

$$C = - \frac{1}{ab} \log T$$

(1)

La dérivée de cette équation est

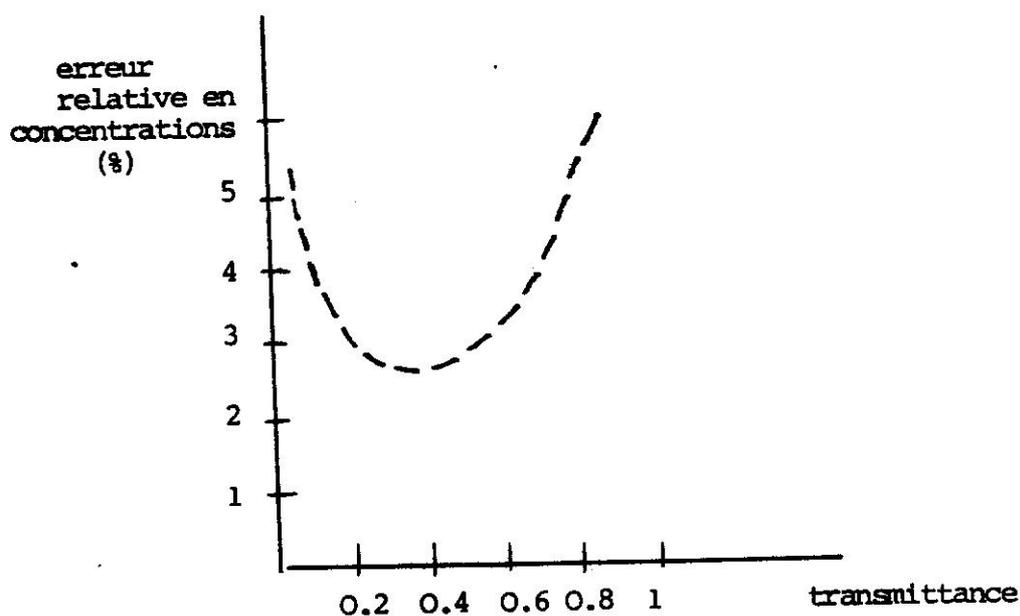
$$dc = -\frac{1}{ab} \times \frac{\log e}{T} dT \quad (2)$$

si l'on divise l'équation 2 par l'équation 1 il vient

$$\frac{dc}{c} = \frac{\log e dT}{T \log T} \quad (3)$$

Si l'on connaît l'incertitude dT sur la mesure de transmittance il est possible en utilisant la relation 3 de connaître l'erreur sur la concentration en fonction de la transmittance de la solution (fig.)

L'erreur est la plus faible à une transmittance obtenue en différenciant l'équation 3 et en prenant la dérivée égale à zéro pour avoir le minimum de la courbe.



$$\frac{d}{dT} \left[\frac{\log e}{T \log T} \right] = 0 = \log T + \log e$$

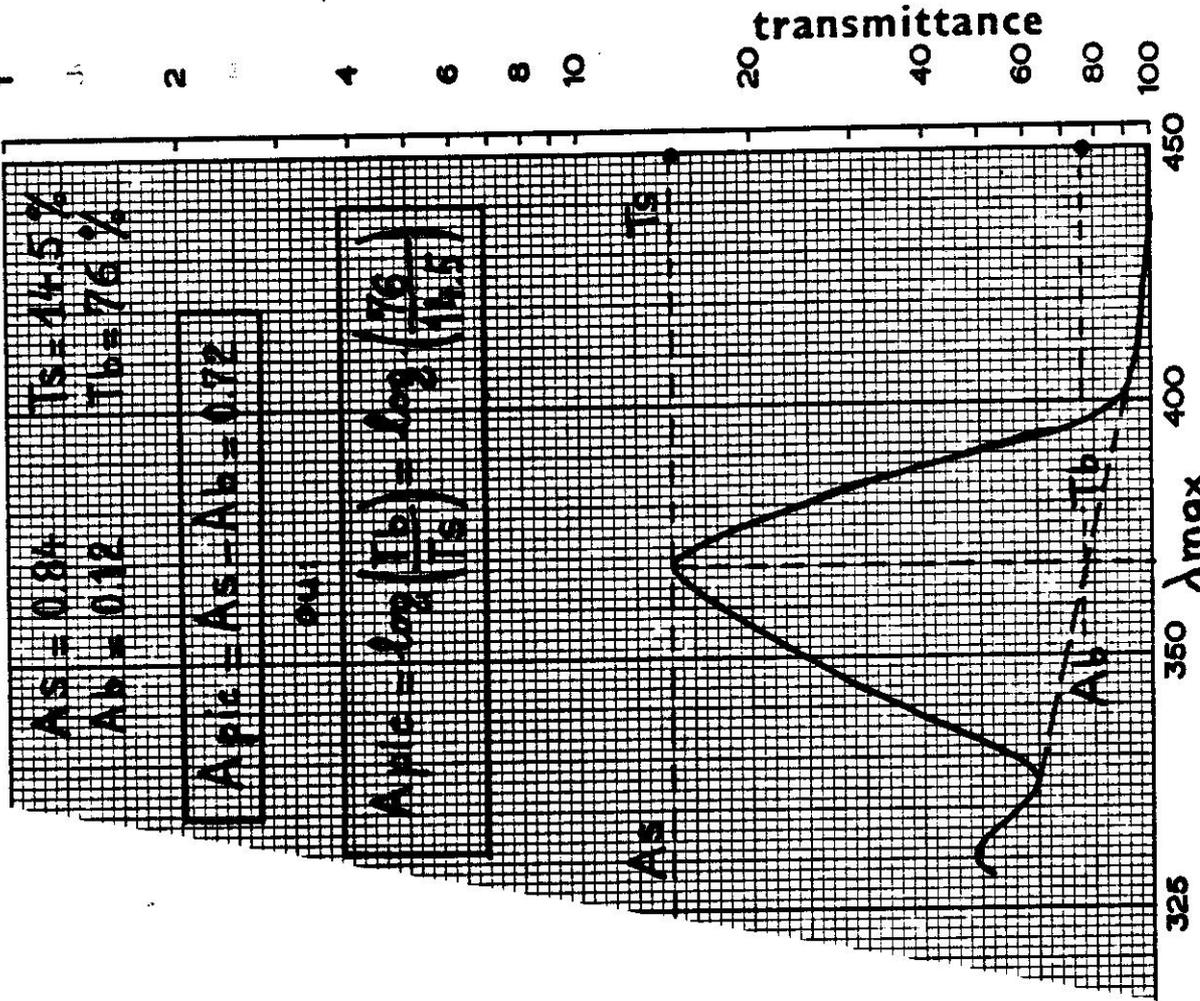
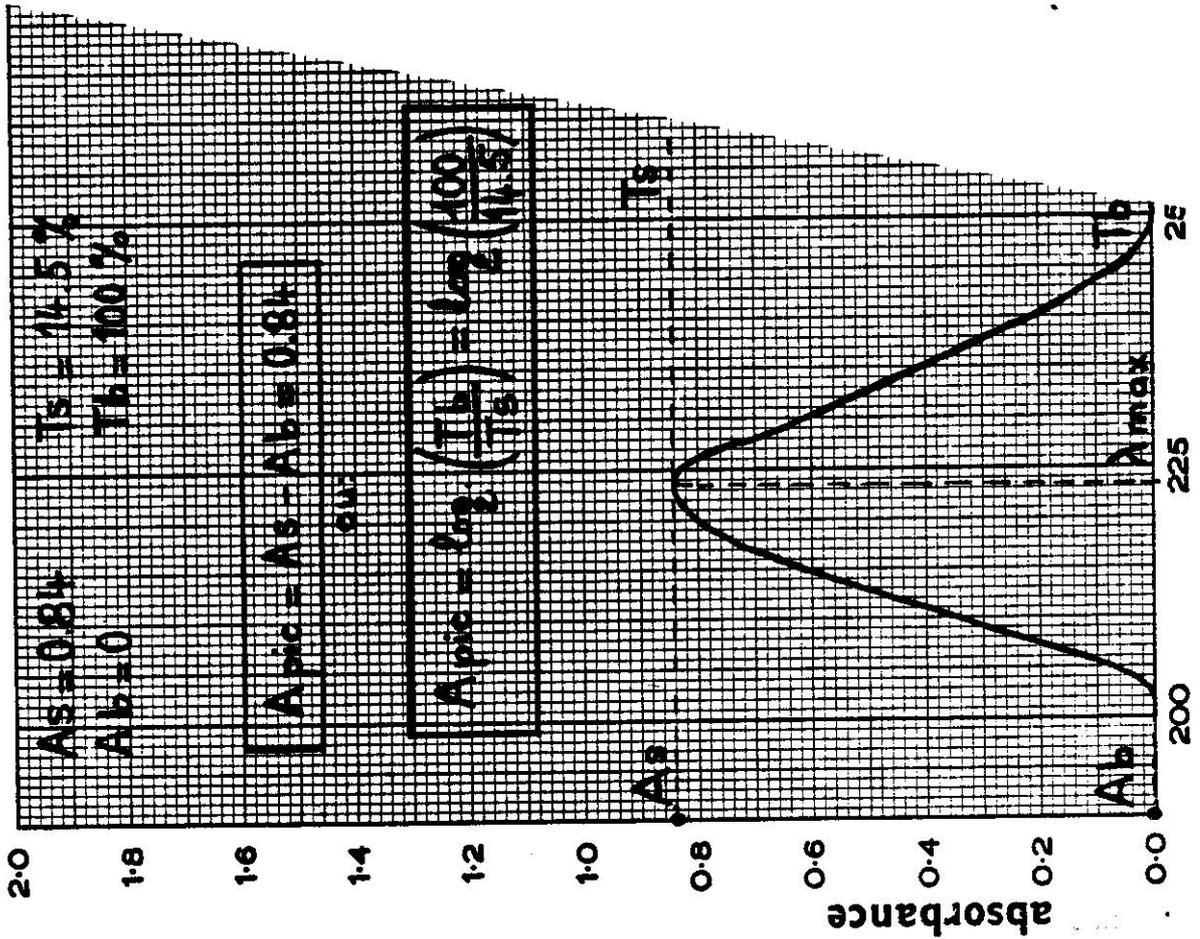
donc $\log T = -\log e$ $T = 0,368$

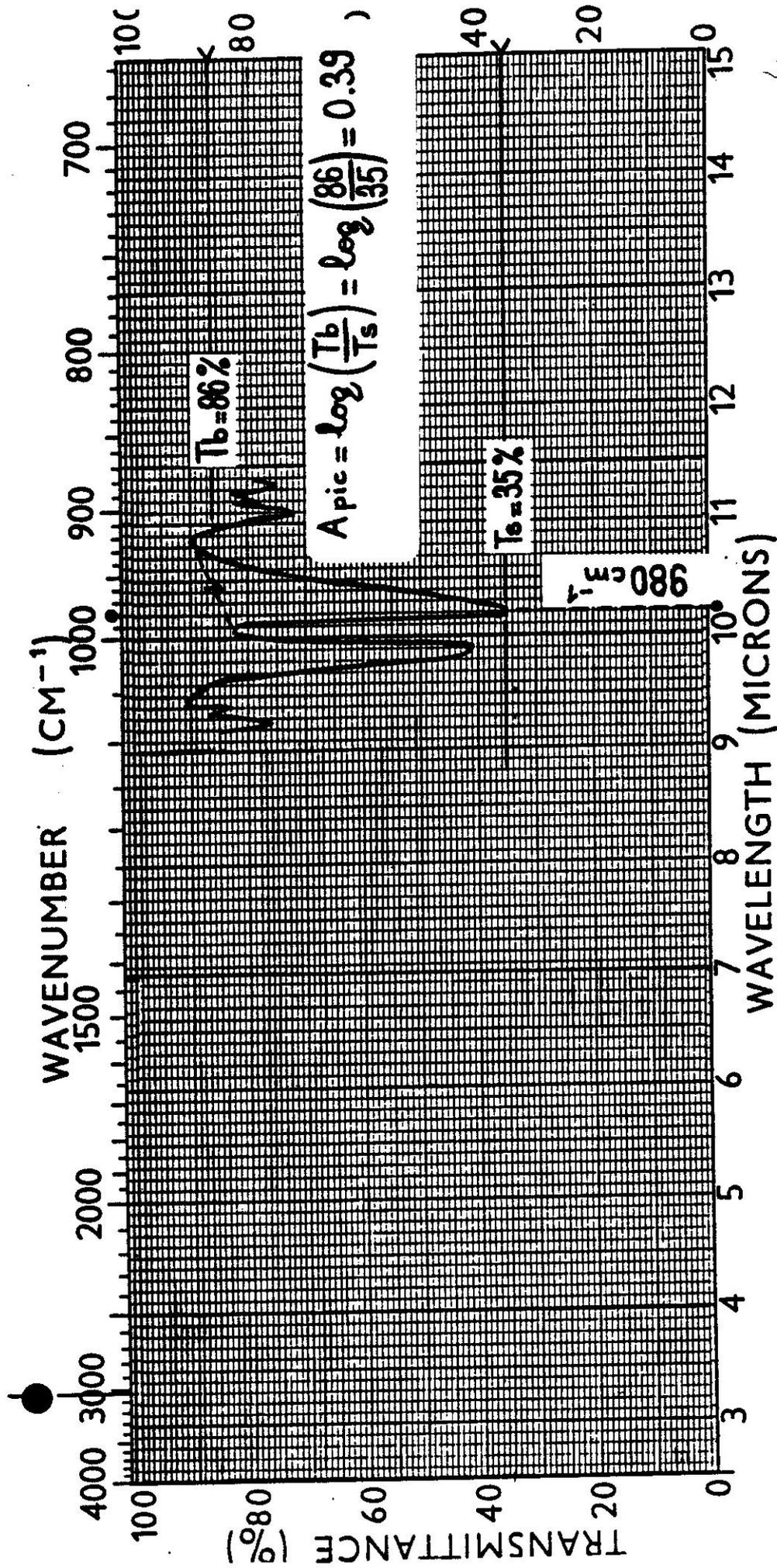
La meilleure précision est obtenue pour une valeur de transmittance de 36,8 % soit une absorbance de 0,43.

EXERCICE

Quelle est l'erreur relative faite sur la mesure de concentration d'une solution dont la transmittance est 0,8 ?

Comment peut-on minimiser cette erreur ?





SPECTROPHOTOMÉTRIE UV - VISIBLE
ANALYSE QUANTITATIVE : SYSTÈME À PLUSIEURS COMPOSANTS

A - THEORIE :

1ère METHODE :

Supposons encore que les espèces agissent de façon indépendante pour ce qui est des phénomènes d'absorption, et que les absorbances sont additives.
Soit deux composés absorbants α et β dont les spectres purs et en mélanges sont représentés sur la figure 1.

Les maxima d'absorption sont λ_1 pour α
 λ_2 pour β

A chaque longueur d'onde, nous pouvons écrire le système d'équation suivant.

Pour λ_1

$$A_{\alpha}^{\lambda_1} = \epsilon_{\alpha}^{\lambda_1} bc_{\alpha} \quad ; \quad A_{\beta}^{\lambda_1} = \epsilon_{\beta}^{\lambda_1} bc_{\beta}$$

Donc

$$A_{\lambda_1} = A_{\alpha}^{\lambda_1} + A_{\beta}^{\lambda_1} = \epsilon_{\alpha}^{\lambda_1} bc_{\alpha} + \epsilon_{\beta}^{\lambda_1} bc_{\beta}$$

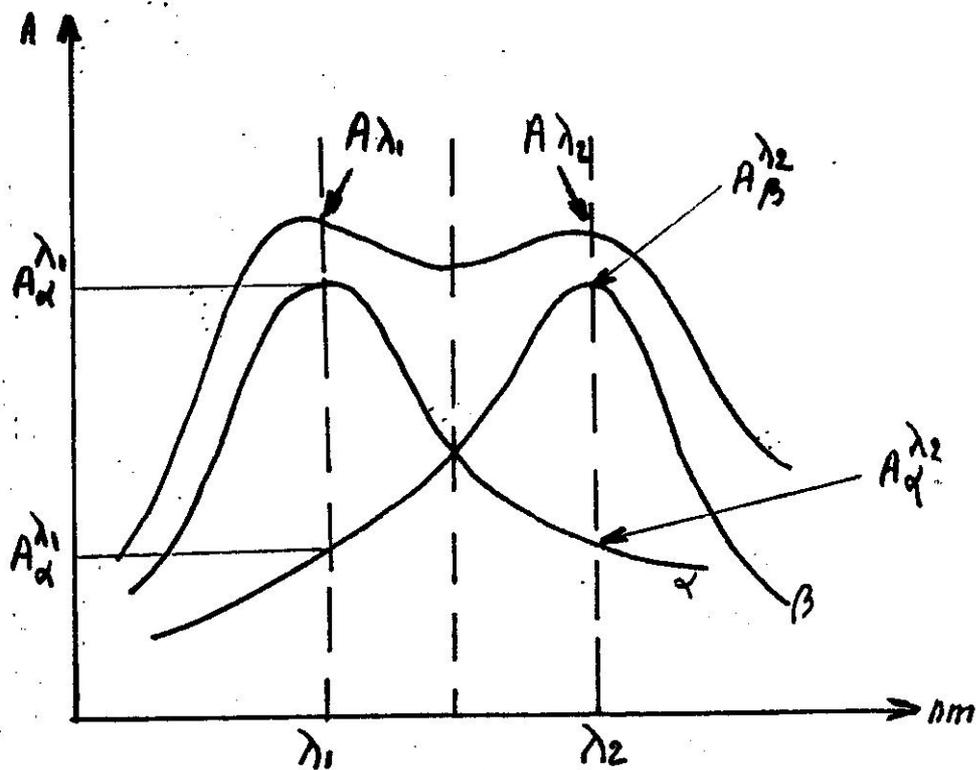


Figure 1

Pour λ_2

$$A_{\alpha}^{\lambda_2} = \epsilon_{\alpha}^{\lambda_2} bc_{\alpha} \quad ; \quad A_{\beta}^{\lambda_2} = \epsilon_{\beta}^{\lambda_2} bc_{\beta}$$

donc

$$A_{\lambda_2} = A_{\alpha}^{\lambda_2} + A_{\beta}^{\lambda_2} = \epsilon_{\alpha}^{\lambda_2} bc_{\alpha} + \epsilon_{\beta}^{\lambda_2} bc_{\beta}$$

A_{λ_1} et A_{λ_2} sont les absorbances du mélange mesurées à λ_1 et λ_2

$\epsilon_{\alpha}^{\lambda_1}$ et $\epsilon_{\beta}^{\lambda_1}$ sont les absorptivités molaires de α et β à λ_1

$\epsilon_{\alpha}^{\lambda_2}$ et $\epsilon_{\beta}^{\lambda_2}$ sont les absorptivités molaires de α et β à λ_2

C_{α} et C_{β} sont les concentrations de α et β dans le mélange.

Les ϵ_{α} et ϵ_{β} sont mesurées en solutions pures de concentrations connues. Il faut alors mesurer A_{λ_1} et A_{λ_2} sur le mélange et résoudre le système de deux équations en A_{λ_1} et A_{λ_2} à deux inconnues C_{α} et C_{β} .

En principe n mesures d'absorbance à n différentes longueurs d'onde suffisent pour déterminer les n composants d'un mélange. On obtient ainsi n équations simultanées indépendantes à n inconnues.

2ème METHODE :

Soit le spectre UV d'un produit pur α et 2 longueurs d'onde : λ_3 et λ_2 .

$$\text{à } \lambda_3 \rightarrow A_{\alpha}^{\lambda_3} = \epsilon_{\alpha}^{\lambda_3} bc_{\alpha}$$

$$\text{à } \lambda_2 \rightarrow A_{\alpha}^{\lambda_2} = \epsilon_{\alpha}^{\lambda_2} bc_{\alpha}$$

le rapport

$$Q_{\lambda_2/\lambda_3} = \frac{A_{\alpha}^{\lambda_2}}{A_{\alpha}^{\lambda_3}} = \frac{\epsilon_{\alpha}^{\lambda_2}}{\epsilon_{\alpha}^{\lambda_3}} \quad \text{or} \quad \frac{\epsilon_{\alpha}^{\lambda_2}}{\epsilon_{\alpha}^{\lambda_3}} \text{ est constant.}$$

Q_{λ_2/λ_3} est un rapport constant indépendant de la concentration.

Pour un composé donné, le rapport de 2 absorbances à 2 λ données est constant et indépendant de la concentration. Q est un critère de pureté.

On peut démontrer que $Q_{\lambda_2/\lambda_3} = f(\lambda)$ est 1 droite :

Soient les spectres de produits purs α et β

à la même concentration c . Les 2 spectres se coupent à la longueur d'onde λ_3 :

$$A_{\alpha}^{\lambda_3} = A_{\beta}^{\lambda_3} = \epsilon_{\alpha}^{\lambda_3} bc = \epsilon_{\beta}^{\lambda_3} bc$$

donc

$$\epsilon_{\alpha}^{\lambda_3} = \epsilon_{\beta}^{\lambda_3}$$

Soient A_{λ_2} et A_{λ_3} les absorbances d'un mélange de ces 2 composés aux concentrations C_{α} et C_{β}

$$A_{\lambda_2} = A_{\alpha}^{\lambda_2} + A_{\beta}^{\lambda_2} = \epsilon_{\alpha}^{\lambda_2} bc_{\alpha} + \epsilon_{\beta}^{\lambda_2} bc_{\beta}$$

$$A_{\lambda_3} = A_{\alpha}^{\lambda_3} + A_{\beta}^{\lambda_3} = \epsilon_{\alpha}^{\lambda_3} bc_{\alpha} + \epsilon_{\beta}^{\lambda_3} bc_{\beta}$$

$$\frac{A_{\lambda_2}}{A_{\lambda_3}} = \frac{\epsilon_{\alpha}^{\lambda_2} C_{\alpha} + \epsilon_{\beta}^{\lambda_2} C_{\beta}}{\epsilon_{\alpha}^{\lambda_3} (C_{\alpha} + C_{\beta})} = \frac{\epsilon_{\alpha}^{\lambda_2}}{\epsilon_{\alpha}^{\lambda_3}} \frac{C_{\alpha}}{C_{\alpha} + C_{\beta}} + \frac{\epsilon_{\beta}^{\lambda_2}}{\epsilon_{\alpha}^{\lambda_3}} \frac{C_{\beta}}{C_{\alpha} + C_{\beta}}$$

$$\frac{A_{\lambda_2}}{A_{\lambda_3}} = Q_{\lambda_2/\lambda_3}$$

$$\frac{C_{\alpha}}{C_{\alpha} + C_{\beta}} = \% \text{ de } C_{\alpha} = F_{\alpha}$$

$$\text{et } F_{\beta} = 1 - F_{\alpha}$$

$$\frac{C_{\beta}}{C_{\alpha} + C_{\beta}} = \% \text{ de } C_{\beta} = F_{\beta}$$

$$Q_{\lambda_2/\lambda_3} = \frac{\epsilon_{\alpha}^{\lambda_2}}{\epsilon_{\alpha}^{\lambda_3}} F_{\alpha} + \frac{\epsilon_{\beta}^{\lambda_2}}{\epsilon_{\alpha}^{\lambda_3}} (1 - F_{\alpha})$$

$$Q_{\lambda_2/\lambda_3} = \left(\frac{\epsilon_{\alpha}^{\lambda_2}}{\epsilon_{\alpha}^{\lambda_3}} - \frac{\epsilon_{\beta}^{\lambda_2}}{\epsilon_{\alpha}^{\lambda_3}} \right) F_{\alpha} + \frac{\epsilon_{\beta}^{\lambda_2}}{\epsilon_{\alpha}^{\lambda_3}}$$

Q_{λ_2/λ_3} en fonction du % en un des composés est 1 droite.

EXERCICES

-I- L'absorbance ultraviolette d'une série de neuf étalons d'eau a été déterminée à 220 nm dans une cellule de 1 cm

No_3^- mg/ml	0	0.004	0.015	0.025	0.035	0.040	0.050	0.060	0.070
A	0	0.102	0.218	0.364	0.473	0.581	0.651	0.701	0.722

Lorsque l'on mesure dans les mêmes conditions huit échantillons d'eau de rivière prélevés en aval d'une usine chimique on obtient une absorbance moyenne de 0.642. Calculez le taux de nitrate dans la rivière, en mg/ml.

-II- Dans une étude de stabilité le laboratoire de galénique constate que l'une de ses préparations se décompose en deux sous produits A et B identifiés par spectrométrie de masse. On veut déterminer la concentration de ces deux composés par spectrophotométrie UV. Avec une cellule de 1 cm on a les données suivantes:

	conc (mg/ml)	Absorbance	
		262 nm	293 nm
A	40.0	0.608	0.410
B	120.0	0.444	0.600

Dans la même cellule on mesure les absorbances d'une solution contenant le produit de dégradation.

On trouve: à 262 nm : 0.849 et à 293 nm : 0.755

1-Calculer les 4 absorbances spécifiques

2-Résoudre le système des deux équations à deux inconnues

3-Déterminez les concentrations de A et de B dans la solution.

Rep : A = 38.1 et B = 72.9 en mg/ml soit 34.35% et 65.64%

-III- Pour déterminer la concentration d'un composé toxique A connu, dans l'eau d'un puits situé près d'une décharge sauvage, on prélève un échantillon d'eau et on prépare 4 solutions a, b, c, d. On mesure leur transmittance à l'aide de la même cellule et à la même longueur d'onde :

a- Eau distillée $T\% = 100.0$

b- Eau du puits après extraction complète du composé A : $T\% = 72.5$

c- Solution b à laquelle on a ajouté $5.00 \mu\text{g/ml}$ de A : $T = 12.4\%$

d- Dans un flacon de 100ml, on introduit 1ml d'eau du puits et on complète avec la solution b jusqu'au trait : $T = 32.7\%$

Si la loi de Beer s'applique à toutes les substances contenues dans l'eau, calculez la concentration de A.

Réponse.

1- On calcule les absorbances pour les 4 solutions.

2- On calcule l'absorbance spécifique de A à partir de la solution c.

3- On calcule la concentration de A dans la solution d.

$CA = 225 \mu\text{g/ml}$

REPERAGE MAGNETIQUE

SOMMAIRE

LA SPECTROMETRIE DE RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (R.M.N.) ET SES APPLICATIONS PHARMACEUTIQUES (1^{re} partie)

H. PINATEL*, J.L. BRAZIER* et Y. PEGON*

RESUME

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (R.M.N.) est une méthode physique d'analyse qui prend une place de plus en plus grande en analyse chimique à côté des autres spectroscopies et de la spectrométrie de masse. Dans cette première partie, les auteurs exposent les principes théoriques de base de la R.M.N. et donnent les grandeurs caractéristiques, déplacement chimique, couplage spin spin, systèmes de spin utilisés en pratique courante en analyse structurale. Des exemples d'études de molécules pharmaceutiques sont donnés.

Mots clefs : Spectroscopie R.M.N. - Analyse spectroscopique.

PLAN

1^{re} partie

I — INTRODUCTION

II — PRINCIPES DE LA RMN

II.1 — Propriétés cinétiques et magnétiques du noyau

II.2 — Précession de Larmor

II.3 — Aspect énergétique de la RMN du proton

III — APPAREILLAGE

IV — RELAXATION - SATURATION - SIGNAL RMN

V — LES GRANDEURS CARACTERISTIQUES DE LA RMN

V.1 — Le déplacement chimique

V.2 — Le couplage Spin-Spin

V.3 — Classification des systèmes de Spin

V.4 — Simplification des Spectres

* Département de Chimie Analytique (Pr A. BADINAND), U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques, 8, avenue Rockefeller, F 69373 Lyon, Cédex 2.
Article reçu à la rédaction le 08 juillet 1976.

I — INTRODUCTION

Des rayons X, aux ondes radio la plupart des régions du domaine des radiations électromagnétiques ont trouvé une application pratique à l'étude des molécules principalement par les spectroscopies d'absorption. Dans tous les cas le principe fondamental est le même : il s'agit d'absorption d'énergie bien que les mécanismes soient parfois différents. L'énergie requise pour une transition entre deux états fondamental et excité est reliée à la fréquence de la radiation qui en est la cause par la relation

$$E = h\nu$$

h est la constante de Planck
 ν la fréquence de la radiation incidente.

L'analyse structurale et fonctionnelle fait appel de plus en plus pour ne pas dire presque uniquement, à des méthodes physiques, parmi elles les spectroscopies ont une place de choix.

La spectroscopie ultra violette et visible qui est principalement une spectroscopie électronique ne donne qu'une information limitée.

La spectroscopie infra rouge (et Raman) fait appel aux modes de vibrations et de rotations de la molécule et renseigne surtout sur les types de groupements.

La spectroscopie de micro-ondes ou d'excitation rotationnelle renseigne sur les longueurs de liaisons et les angles de liaisons.

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN), qui entre dans la routine, met en jeu des transitions des spins nucléaires et donne des renseignements sur le nombre, la nature et l'agencement des protons d'une molécule. Mais elle n'est pas limitée, nous le verrons, au proton et peut s'étendre à l'étude d'autres noyaux et à leurs arrangements dans les molécules en particulier C, P, N, F, Si.

Cette énumération des méthodes modernes d'analyse serait incomplète sans citer la spectrométrie de masse.

A l'heure actuelle, l'analyse d'une structure moléculaire se fait principalement par U.V. Visible, RMN, I.R. et Spectrométrie de masse, qui sont les méthodes fondamentales et doivent entrer tant dans la pratique courante que dans l'enseignement.

II — PRINCIPE DE LA RMN (6,5,11)

II.1 — Propriétés cinétiques et magnétiques du noyau

On sait que tous les noyaux des atomes possèdent une charge. Mais de plus les noyaux de certains isotopes peuvent tourner sur eux-mêmes autour d'un axe. La masse nucléaire en rotation possède donc un moment angulaire \vec{A} et une charge à laquelle est associé un moment magnétique $\vec{\mu}$ résultant de cette rotation. On dit que le noyau possède alors un spin, caractérisé par un « nombre de spin » représenté par la lettre I et qui peut prendre les valeurs 0, 1/2, 1, 3/2 suivant le type noyau. L'absence de spin sera caractérisé par I = 0.

Les quantités \vec{A} et $\vec{\mu}$ sont dans un rapport constant caractéristique d'un noyau donné suivant la relation

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{A} \quad (1) \text{ (Figure 1)}$$

γ constituant ce que l'on appelle le rapport gyromagnétique.

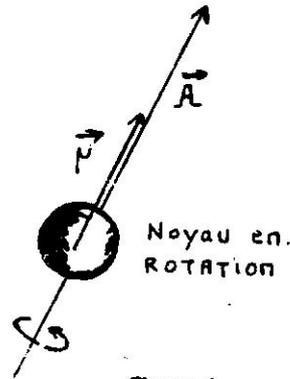


Figure 1

Prenons par exemple le Proton. Il a pour nombre de spin 1/2, tandis que ¹²C et ¹⁶O ont I = 0.

Considérons un tel noyau placé dans un champ magnétique uniforme H₀ appliqué suivant la direction oz.

Il ne peut prendre qu'un certain nombre d'orientations privilégiées. L'état énergétique du proton est quantifié.

Au moment angulaire \vec{A} est donc associé un moment magnétique tel que, en respectant la condition de quantification (l'énergie dans ce domaine ne peut varier que de façon discontinue en unité $\frac{h}{2\pi}$), on peut écrire :

$$\vec{\mu} = \gamma \frac{h}{2\pi} \vec{A} \quad (2)$$

La projection du moment angulaire suivant la direction oz (direction du champ H₀) possède 2I + 1 valeurs qui sont le nombre de positions ou états énergétiques que peut prendre le noyau dans un champ externe uniforme.

Sont magnétiques tous les noyaux de masse impaire ¹H, ¹³C, ¹⁵N, ¹⁹F, ¹⁶O, ³¹P, et ceux de masse paire mais de nombre atomique impair ²H, ¹⁰B, ¹⁴N.

Les noyaux de masse et de nombre atomique pairs n'ont pas de propriétés magnétiques et ne donneront pas de phénomène RMN c'est le cas du ¹²C et ¹⁶O.

Masse M	Numéro Atomique Z	Spin
Impaire paire ou impaire 1/2 3/2 5/2		
Paire	Impair	1 2 3 ...
Paire	Pair	0

Tableau reliant I, nombre de Spin aux caractéristiques du noyau.

Nous nous limiterons dans cet exposé à l'étude du phénomène RMN du proton qui est entré dans la pratique de routine et en disant au départ que les RMN ¹³C de ¹⁵N et du ³¹P sont à l'heure actuelle en plein développement et seront amenées à jouer un rôle important en particulier en biologie et dans les sciences pharmaceutiques.

11.2 — Précession de Larmor

Considérons à nouveau le proton isolé placé dans un champ magnétique H_0 intense et uniforme, appliqué suivant l'axe oz et faisant un angle θ avec l'axe de rotation du noyau (figure 2). Ce noyau se comporte

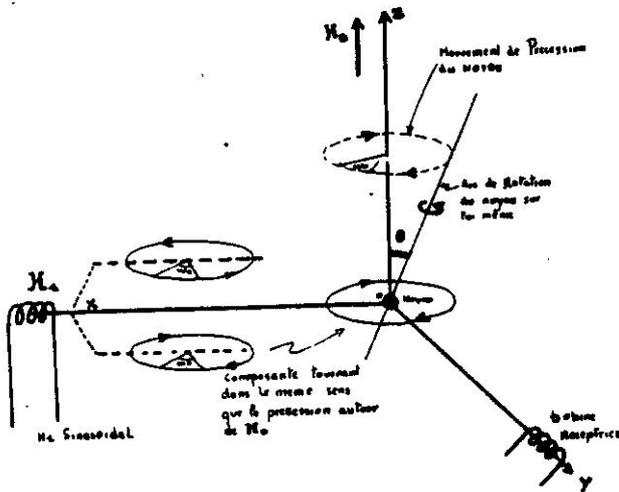


Figure 2

comme un petit aimant qui va s'orienter dans le champ appliqué et va prendre un certain état énergétique que l'on peut appeler état énergétique d'orientation. On peut schématiser le phénomène de la façon suivante (figure 3).

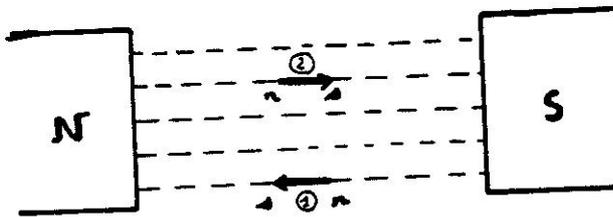


Figure 3

Le proton (petit aimant) placé entre les deux pôles d'un aimant N.S. va s'orienter soit de façon anti-parallèle ① s n soit de façon parallèle ② n s. On conçoit que la première orientation (1) nécessite moins d'énergie que la seconde (2). Si les lignes pointillées représentent de façon purement formelle les niveaux énergétiques, l'état énergétique (1) sera inférieur à (2) comme cela est représenté sur le schéma. (Il ne s'agit là que d'une présentation purement formelle).

Regardons de plus près de quoi résultent ces états énergétiques. D'après les règles de la mécanique newtonienne, ce petit aimant (le proton) au lieu de venir s'aligner sur le champ après quelques oscillations comme le ferait n'importe quel aimant non pourvu de spin, entreprend un mouvement dit de précession autour de H_0 comparable à l'effet gyroscopique. Il se comporte comme un gyroscope dans le champ gravitationnel. (Se rappeler une toupie dont l'axe de rotation n'est pas vertical).

La vitesse angulaire de ce mouvement de précession est liée au champ H_0 par le rapport gyromagnétique γ .

$$\omega_0 = \gamma H_0 \quad (3)$$

C'est la relation fondamentale de Larmor. Toute variation du champ modifie la vitesse de précession, mais l'angle θ reste fixe. Ce mouvement de précession du proton dans le champ H_0 permet d'expliquer le phénomène de RMN.

Appliquons en effet un second champ magnétique H_1 , orienté suivant l'axe des x perpendiculaire à H_0 seule façon de faire varier l'angle θ . Si H_1 est uniforme, il est sans effet. Par contre si H_1 est sinusoïdal, on peut le considérer comme la résultante de deux composantes tournant en sens inverse autour de H_0 (axe oz) (figure 2).

Ne considérons que la composante tournant autour de H_0 dans le même sens que le mouvement de précession du noyau. Lorsque la vitesse angulaire de cette composante est égale à ω_0 vitesse angulaire du mouvement de précession, on dit qu'il y a résonance, et il peut y avoir alors échange d'énergie entre les deux systèmes. Le proton peut « absorber » de l'énergie fournie par le circuit oscillant produisant H_1 , et peut passer alors dans un état énergétique supérieur. Il « bascule » et induit un courant dans un bobine réceptrice placée sur l'axe des y (figure 2).

11.3 — Aspect énergétique de la RMN du proton

Le petit aimant de moment magnétique $\vec{\mu}$ placé dans le champ magnétique H_0 uniforme a pour valeur :

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{H}_0 = -\mu H_0 \cos \theta = -\mu_z H_0$$

Les valeurs possibles μ_z du moment magnétique suivant la direction oz sont données par la relation :

$$\mu_z = \gamma \frac{h}{2\pi} m \quad (4)$$

ou m est le nombre quantique magnétique qui peut prendre $2l + 1$ valeurs.

Pour le proton de spin $l = 1/2$, ces valeurs sont donc au nombre de 2 ($2 \cdot 1/2 + 1$). On les schématise par $-\mu_z$ et $+\mu_z$ et correspondent classiquement à $m = +1/2$ et $m = -1/2$. (Figure 4).

En prenant comme état énergétique zéro, l'énergie en l'absence de champ, l'énergie du noyau s'écrit :

$$E = -\mu_z H_0 \quad (5)$$

soit en utilisant la relation (4)

$$E = -\gamma \frac{h}{2\pi} m H_0 \quad (6)$$

Pour un noyau de spin $1/2$, il existe donc deux états énergétiques $E + 1/2$ appelé encore E_α et l'état $E - 1/2$ ou E_β état le plus élevé et moins stable thermodynamiquement, E_α étant le plus bas est plus stable thermodynamiquement [c'est celui qui correspond à l'orientation anti parallèle du petit aimant dans la représentation formelle que nous avons donnée au début. (Figure 3)].

Ces états énergétiques sont représentés sur la figure 4.

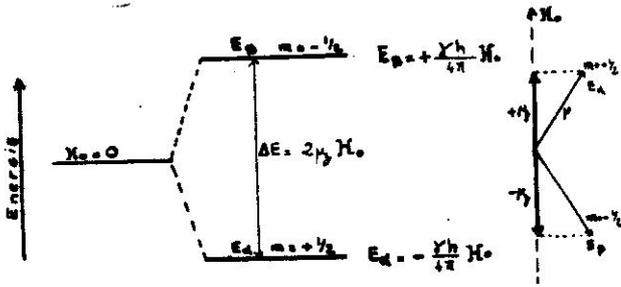


Figure 4

$$E_{\beta} = 1/2 \gamma \frac{h}{2\pi} H_0 \quad (7)$$

$$E_{\alpha} = -1/2 \gamma \frac{h}{2\pi} H_0 \quad (8)$$

L'énergie nécessaire pour une transition $E_{\alpha} \rightarrow E_{\beta}$ peut être calculée à partir des relations (5) (6) (7) (8)

$$\Delta E = E_{\beta} - E_{\alpha} = \mu z H_0 + \mu z H_0$$

$$\Delta E = 2 \mu z H_0 \quad (9)$$

On sait que dans tout phénomène d'absorption, on a

$$\Delta E = h \nu_0$$

$h \nu_0$ étant le quantum d'énergie ou h désigne la constante de Planck et ν_0 la fréquence de la radiation électromagnétique.

$$\text{d'où } \Delta E = h \nu_0 = \frac{\gamma h}{2\pi} H_0$$

ou bien alors

$$\nu_0 = \frac{\gamma H_0}{2\pi}$$

qui est l'équation fondamentale de la RMN liant le champ magnétique et la fréquence correspondant à la résonance.

On peut alors donner la définition de la RMN.

La « RMN correspond à une transition entre deux niveaux énergétiques (énergie d'orientation) d'un noyau soumis à un champ magnétique H_0 intense et induit par une radiation dont la fréquence est égale à la fréquence de précession de l'axe de rotation du noyau dans le champ ».

La relation de Larmor explique la correspondance champ-fréquence des appareils de RMN.

La fréquence sera de 60 MHz pour un champ de 14.092 gauss et 100 MHz pour 23.485 gauss.

Pour détecter la résonance, le balayage peut se faire soit en faisant varier la fréquence du champ H_1 , soit en faisant varier lentement le champ H_0 . Pour des raisons technologiques, il est plus commode de faire varier le champ.

III — APPAREILLAGE

Un spectromètre RMN peut être schématisé de la façon suivante :

Il comprend :

1) un aimant puissant créant le champ magnétique homogène dans lequel est placé par un dispositif approprié l'échantillon. Afin d'avoir un champ vraiment uniforme dans tout l'échantillon, on imprime à celui-ci un mouvement de rotation. On peut faire varier lentement ce champ de façon continue à l'aide d'un générateur de balayage ;

2) un émetteur de fréquence radio (axe des x) (figure 2) ;

3) un récepteur de fréquence radio (axe des y) (figure 2) ;

4) un enregistreur et son intégrateur (figure 5).

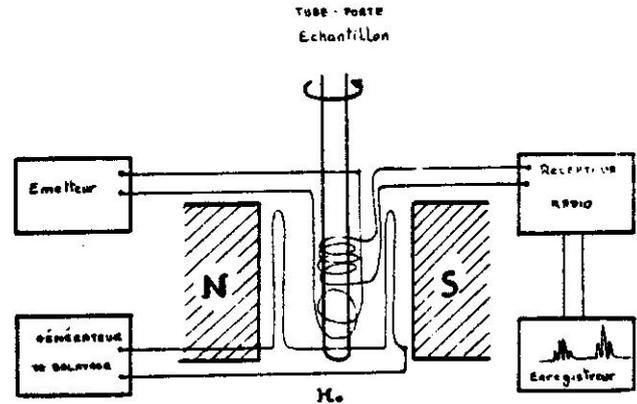


Figure 5

Spectromètre RMN
Schéma simplifié

On a vu que pour le proton dans un champ de 14.092 gauss, la fréquence est de l'ordre des fréquences radio 60 MHz. Les protons des molécules organiques absorbent alors sur une bande de fréquence de 600 à 700 Hz.

IV — RELAXATION - SATURATION - FORME DU SIGNAL (4, 10)

Ce que nous avons vu concernant l'aspect énergétique de la RMN s'appliquait au noyau isolé. Que se passe-t-il pour une population de noyaux identiques. Pour le proton en particulier la différence entre les deux niveaux d'énergie est très faible ; elle n'est que de l'ordre de 10^{-5} calorie, valeur extrêmement faible par rapport à l'énergie chimique KT si bien que les protons dans l'un ou l'autre état sont presque en nombre égal.

Or la théorie des radiations électromagnétiques indique que la probabilité d'une transition par absorption d'énergie est égale à celle d'une transition par émission. Ainsi, si les états sont peuplés de façon identique, la probabilité de transition par absorption est la même que celle par émission. Et l'on ne peut pas observer la résonance (figure 6).

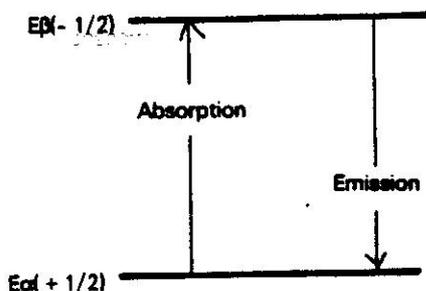


Figure 6

Heureusement, du fait du désordre thermique, l'occupation des états énergétiques suit la loi de distribution de Boltzman.

$$\frac{n_{\beta}}{n_{\alpha}} = e^{-(E_{\beta} - E_{\alpha})/kT}$$

n_{α} nombre d'atomes dans l'état énergétique E_{α} le plus bas

n_{β} nombre d'atomes dans l'état énergétique E_{β} plus élevé.

k = constante de Boltzman
 T = température absolue.

Dans les conditions ordinaires, il se trouve donc un léger excès de noyaux ΔN dans l'état de plus faible énergie et c'est grâce à ce ΔN que le phénomène de RMN est possible et surtout observable.

Conséquences pratiques :

ΔN : augmente quand le nombre N de noyaux observés augmente, ce qui demande une forte concentration de plusieurs mg dans l'échantillon. C'est un des inconvénients de la RMN quoique à l'heure actuelle la RMN par Transformée de FOURIER permette de descendre à des fractions de mg.

ΔN : augmente quand H_0 augmente. Aujourd'hui les progrès de la technologie permettent d'utiliser des appareils à 220 MHz (soit 52.000 gauss) et même 250 MHz.

(Ex. : appareil Cameca de la Faculté de Pharmacie de Marseille).

Saturation :

Le champ de radio-fréquence H_1 provoque donc une transition par changement de spin. Ce phénomène conduirait rapidement à l'égalisation des populations des niveaux c'est-à-dire ce que l'on appelle la saturation du système, s'il n'existait des phénomènes de relaxation nucléaire qui relibèrent l'énergie emmagasinée par un processus de retour.

Là encore sans « relaxation nucléaire » ou processus de retour on ne pourrait observer la RMN.

Sans entrer dans le détail de cet important chapitre, disons que la relaxation peut se faire selon deux processus :

- la relaxation spin-réseau due à l'agitation thermique. Dans ce cas le noyau perd son énergie au profit de

son environnement. On définit un temps de relaxation spin-réseau T_1 qui est le temps nécessaire à ce transfert d'énergie. Il dépend de la température, de la viscosité, de la présence d'impuretés paramagnétiques ;

- la relaxation spin-spin qui est une perte d'énergie entre des noyaux qui précessionnent à proximité l'un de l'autre. On définit alors un temps de relaxation spin-spin T_2 .

Schématiquement la résonance se manifeste par l'induction d'une f.e.m. dans une bobine. Si cette induction est en quadrature avec le champ sinusoïdal appliqué H_1 , le signal apparaît sous forme d'une courbe d'absorption (type courbe de Lorentz) (figure 7).

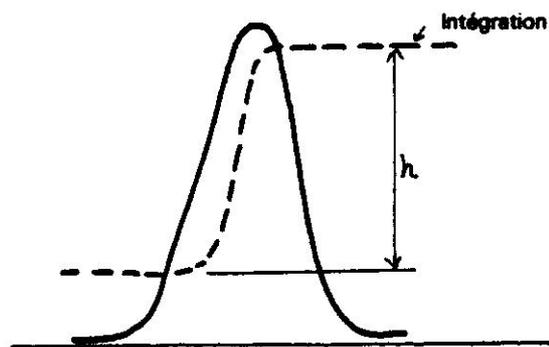


Figure 7
 Courbe d'Absorption

En pratique courante pour le proton, la détection se fait en absorption. L'important à retenir est que la surface située sous la courbe d'absorption est proportionnelle au nombre de noyaux qui résonnent à la même fréquence. Donc en intégrant la courbe par rapport au temps, à une vitesse donnée, la hauteur de l'intégrale renseignera sur le nombre de protons dans la molécule. La forme du pic dépend de la vitesse de balayage. En général, on obtient un pic dissymétrique. (Figure 8).

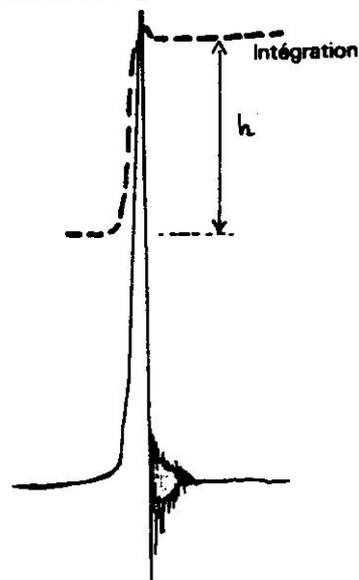


Figure 8

V — LES GRANDEURS CARACTERISTIQUES DE LA RMN (2.3.12)

En RMN deux paramètres sont importants pour l'analyse, ce sont le déplacement chimique et le couplage spin-spin.

V.1 — Le déplacement chimique

Si tous les protons d'une molécule résonnaient à la même fréquence, la RMN n'aurait qu'un intérêt limité. Heureusement il n'en est rien. En effet le phénomène que nous avons décrit concernait le noyau isolé, « nu », c'est-à-dire sans tenir compte de son environnement et en particulier de son environnement électronique. Or dans les molécules, les noyaux sont entourés d'électrons qui vont modifier le champ H_0 au niveau de chaque proton qui va alors résonner à des fréquences différentes.

Soit un proton dans le champ H_0 . Autour du noyau circule un électron dont le mouvement est assimilable à un courant électrique dans une sphère. Il y a alors apparition d'un champ induit h opposé au champ H_0 (figure 9).

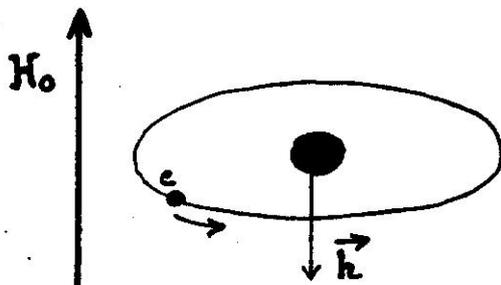


Figure 9

Le champ induit est proportionnel à H_0
 $h = \sigma H_0$

σ s'appelle la constante d'écran du proton. Le champ véritable existant au niveau du noyau est donc égal au champ appliqué H_0 diminué du champ induit.

$$H_{loc} = H_0 - \sigma H_0$$

$$H_{loc} = H_0 (1 - \sigma)$$

H_{loc} s'appelle le « champ local efficace ». Il y a eu effet de blindage diamagnétique.

Le point important est que les effets résultants de ces mouvements des électrons sont différents pour chaque type d'atomes et que par la suite le signal de résonance produit pour chaque type de proton aura lieu pour des fréquences différentes. C'est le « déplacement chimique ».

L'aimantation induite intervient de deux façons :

— soit par création d'un champ magnétique opposé à l'action du champ principal : Diamagnétisme, on parlera alors de phénomène de déblindage.

Prenons deux exemples :

Ex. 1 : la molécule d'acétylène, linéaire, a tendance à se placer dans le sens du champ H_0 . Les électrons π de la triple liaison gravitent autour de l'axe de la molécule et ce mouvement induit un champ magnétique opposé au champ appliqué au niveau du proton (figure 10a).

Le proton de l'acétylène est « blindé » ou encore dans le cône de blindage (symbolisé par le signe +);

Ex. 2 : pour le proton de la fonction aldéhyde la double liaison est perpendiculaire au champ H_0 (figure 10b).

Le proton est en-dehors des lignes du champ diamagnétique induit. Il est déblindé ou encore dans le cône de déblindage. (Symbolisé par le signe —).

Il en est de même pour les protons du cycle benzénique qui sont déblindés (figure 10c).

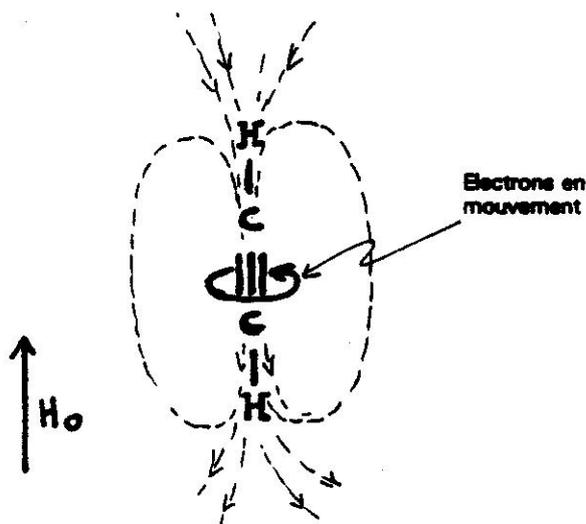
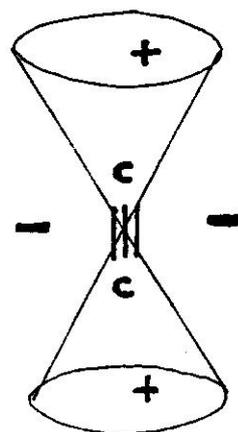


Figure 10a
 Blindage des Protons Acétyléniques



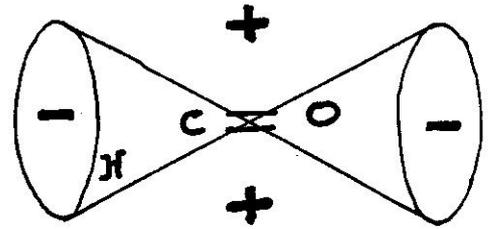
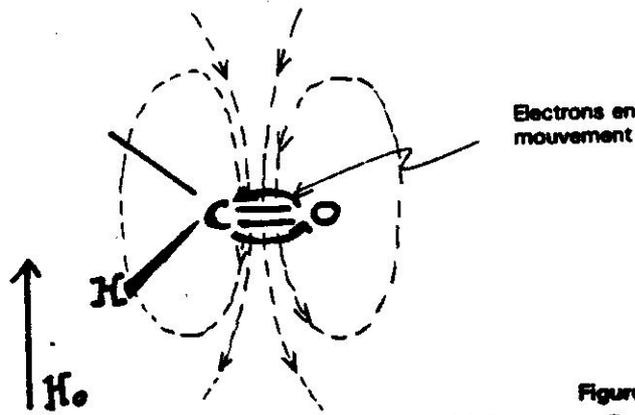


Figure 10b
Déblindage des Protons aldéhydiques

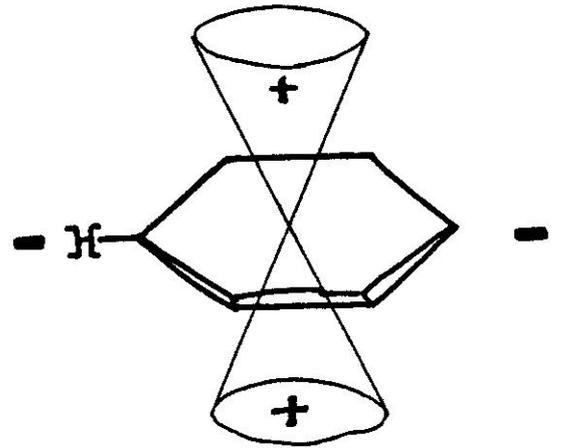
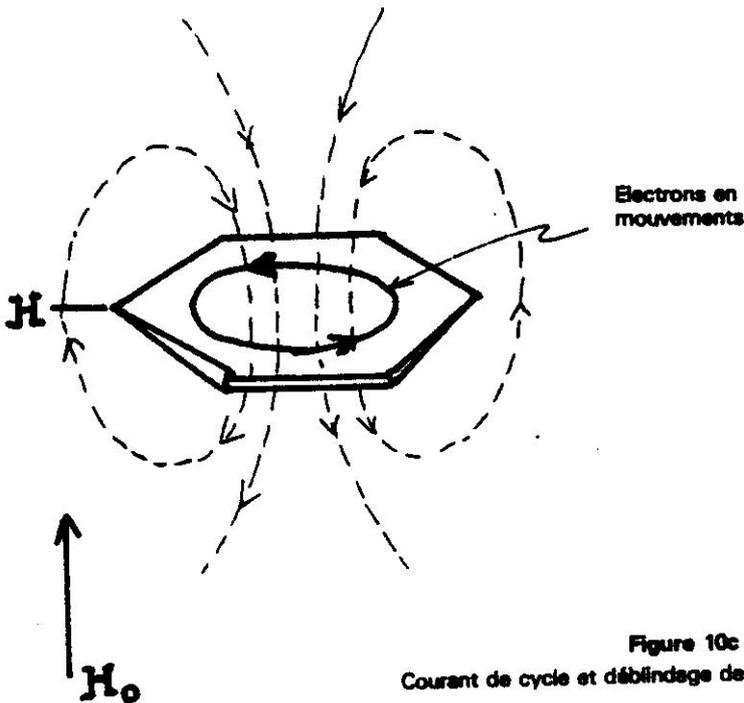


Figure 10c
Courant de cycle et déblindage des protons benzéniques

Le déplacement chimique est proportionnel au champ appliqué. La possibilité de détecter ces déplacements chimiques des protons est le propre de la RMN.

Des protons qui ont le même environnement électronique dans une molécule auront le même déplacement chimique. On dit que l'on aura affaire à des protons équivalents ou magnétiquement équivalents. Par exemple les 4 protons du méthane ou les 6 protons du benzène sont tous identiques. Ils résonneront à la même fréquence, l'une caractéristique du méthane, l'autre du benzène. Par contre pour une molécule comme la pyridine (figure 11) on a trois types de protons, les protons 1 et 5 ont le même environnement. Ils sont magnétiquement équivalents et forment donc un premier groupe. Les protons 2 et 4 sont eux aussi équivalents, mais les protons 2 et 1 sont différents car ils n'ont pas le même environnement électronique. Enfin le proton 3 est

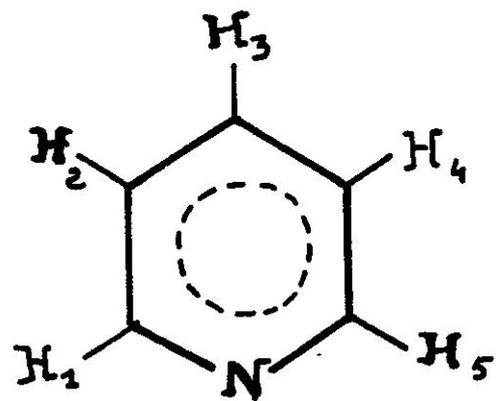


Figure 11

différent des protons 1 5 et 2 4. Eloigné de l'N son comportement en RMN sera proche des protons 2-4.

Le déplacement chimique dépend du champ donc du type d'appareil ; ceci empêche le choix d'une échelle en unités fondamentales comme dans les autres spectroscopies. (IR UV ou visible). On choisit donc une échelle d'unités sans dimension en ppm (partie par million) par rapport à un composé de référence choisi arbitrairement. Pour les protons des molécules organiques, ce qui est le cas le plus fréquent, la référence est le tétraméthylsilane (CH₃)₄ Si ou TMS à 12 protons magnétiquement équivalents et qui a l'avantage de donner un signal intense et fin en-dehors du domaine courant des types de protons usuels.

La position du signal est donc :

$$\delta = \frac{H_0 - H_r}{H_r} \cdot 10^6 = 10^6 \frac{\Delta\nu}{\text{fréquence de l'oscillateur en Hz}}$$

- H_r = valeur du champ de résonance de l'échantillon ;
- H₀ = valeur du champ de résonance de la référence (TMS) ;
- Δν = différence de fréquence entre l'échantillon et la référence, exprimée en Hz.

Le facteur 10⁶ est introduit par commodité; en effet, on l'a vu, les fréquences des oscillateurs usuels étant de 30, 60 ou 100.10⁶Hz, δ est donc exprimé en ppm. Dans cette échelle δ, le TMS représente le Zéro et la valeur de δ augmente alors que le champ diminue.

Il existe une autre échelle dans laquelle les déplacements chimiques exprimés en τ décroissent en même temps que le champ de balayage. On passe de l'une à l'autre par la relation :

$$\tau = 10 - \delta$$

On trouve dans la littérature des tables rassemblant les valeurs des déplacements des protons et leurs zones de variations. La figure 12 rassemble ces principales données et les tableaux I, Ia et Ib montrent les positions de l'absorption des protons en fonction de leur environnement. Il faut noter que le déplacement chimique (Chemical shift) peut aussi s'exprimer en Hz grâce à la relation de la RMN.

$$\nu_0 = \frac{\gamma H_0}{2\pi} \quad \text{ON TIRE } \delta = \frac{\nu - \nu_0}{\nu_0} = \text{Hz } 10^6$$

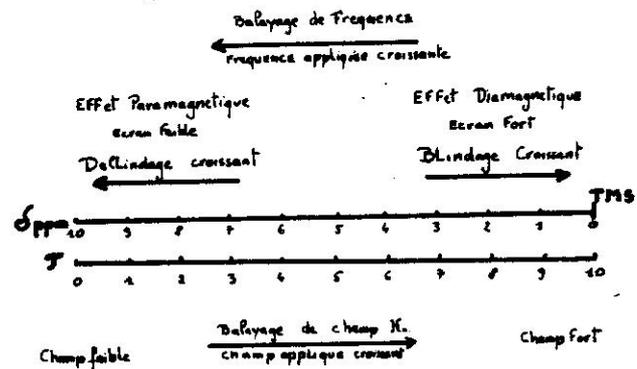


Figure 12
Déplacement chimique. Termes et conventions

TABLEAU I

Déplacements chimiques

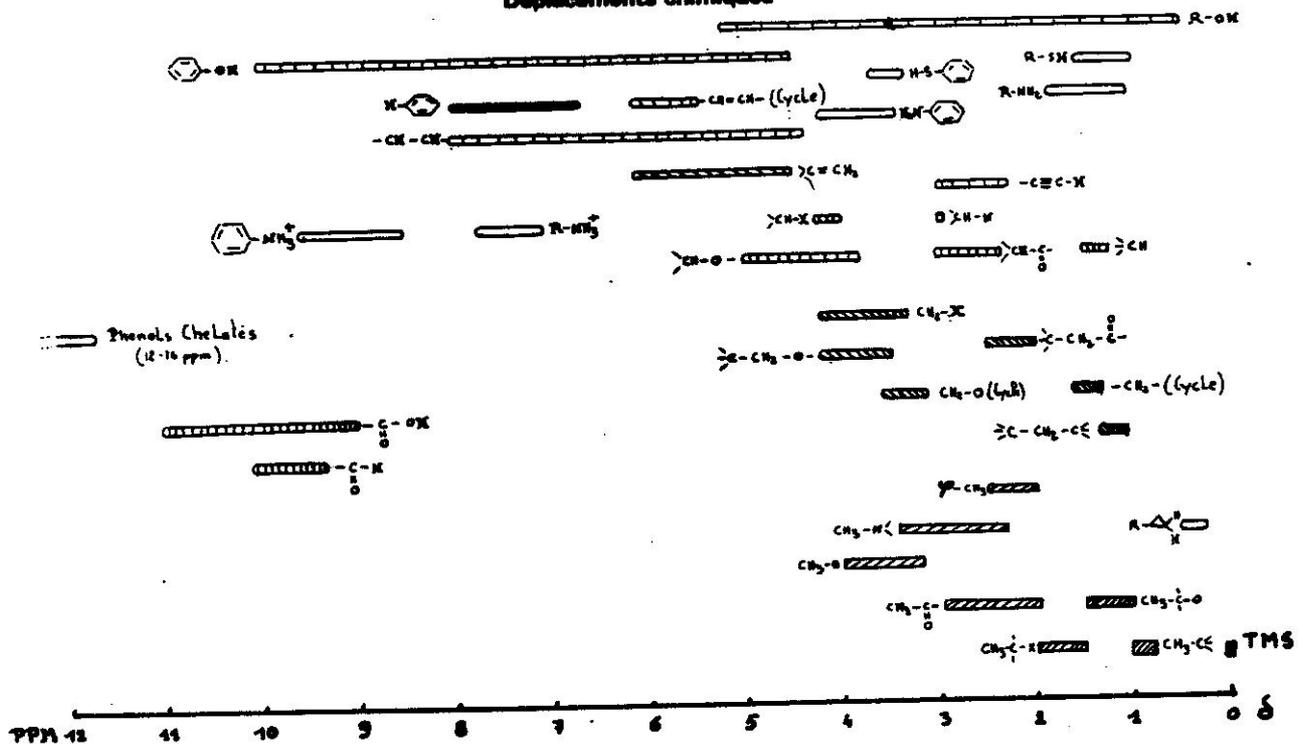


TABLEAU Ia

Déplacement chimique des protons des groupes méthyle, méthylène et méthine, dans les échelles τ et δ Me-Si étant pris comme référence.

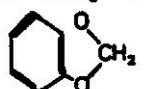
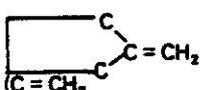
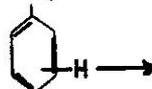
CH ₃ —		—CH ₂ —		—CH—	
Proton	τ δ	Proton	τ δ	Proton	τ δ
CH ₃ C	9.1 (0.9)	—C—CH ₂ —C (cyclic)	8.7 (1.3) 8.5 (1.5)	C—CH—C (bridgehead)	8.5 (1.5) 7.8 (2.2)
CH ₃ —C—C=C	8.9 (1.1)	—C—CH ₂ —C—C=C	8.3 (1.7)		
CH ₃ —C—O	8.9 (1.4)	—C—CH ₂ —C—O	8.1 (1.9)	C—CH—C—O	8.0 (2.0)
CH ₃ —C—O	8.4 (1.6)	—C—CH ₂ —C=C	7.7 (2.3)	CH—Ar	7.0 (3.0)
CH ₃ —Ar	7.7 (2.3)	—C—CH ₂ —Ar	7.3 (2.7)	C—CH—CO—R	7.3 (2.7)
CH ₃ —CO—R	7.8 (2.2)	—C—CH ₂ —CO—R	7.6 (2.4)		
CH ₃ —CO—Ar	7.4 (2.6)				
CH ₃ —CO—O—R	8.0 (2.0)	—C—CH ₂ —CO—O—R	7.8 (2.2)		
CH ₃ —CO—O—Ar	7.6 (2.4)				
CH ₃ —CO—N—R	8.0 (2.0)				
CH ₃ —O—R	6.7 (3.3)	—C—CH ₂ —O—R	6.6 (3.4)	C—CH—O—R	6.3 (3.7)
		—C—CH ₂ —O—H	6.4 (3.6)	C—CH—O—H	6.1 (3.9)
CH ₃ —OAr	6.2 (3.8)	—C—CH ₂ —OAr	5.7 (4.3)		
CH ₃ —O—CO—R	6.3 (3.7)	—C—CH ₂ —O—CO—R	5.9 (4.1)	C—CH—O—CO—R	5.2 (4.8)
CH ₃ —N	7.7 (2.3)	—C—CH ₂ —N	7.5 (2.5)	C—CH—N	7.2 (2.8)
CH ₃ —N ⁺	6.7 (3.3)				
CH ₃ —S	7.9 (2.1)	—C—CH ₂ —S	7.6 (2.4)		
CH ₃ —C—NO ₂	8.4 (1.6)	—C—CH ₂ —NO ₂	5.6 (4.4)	C—CH—NO ₂	5.3 (4.7)
CH ₃ —C=C—CO	8.0 (2.0)	—C—CH ₂ —C—NO ₂	7.9 (2.1)		
—C=C(CH ₃)—CO	8.2 (1.8)	—C—CH ₂ —C=C—CO	7.6 (2.4)		
		—C=C(CH ₃)—CO	7.6 (2.4)		
			4.1 (5.9)		

TABLEAU Ib

Déplacement chimique de divers protons

	τ δ		τ δ
	5.4 (4.6)		2.754 (7.246)
(C=CH ₂)	4.7 (5.3)		7.683 (2.337)
—C=CH—	4.9 (5.1)		
—C=CH—(cyclic)	4.7 (5.3)		
R—C=C—H	6.9 (3.1)		2.905 (7.095)
Ar—H	1.0—3.0(9.0—7.0)		
—C=CH—CO	4.1 (5.9)		
—CH=C—CO	3.2 (6.8)		
r—CHO	0.1 (9.9)		
Ar—CHO	0.1 (9.9)		
H—CO—O—	2.0 (8.0)		
h—CO—N	2.0 (8.0)		
			8.56 (1.44)
		CHCl ₃	2.75 (7.25)
		H ₂ O	≈ 5.0 (≈ 5.0)

V.2 — Le couplage spin-spin (7)

Le deuxième paramètre important pour l'interprétation des spectres RMN est le couplage spin-spin qui traduit l'interaction des noyaux plus ou moins éloignés par l'intermédiaire des électrons de liaison.

Soient deux protons H_A et H_B portés par deux carbones adjacents. Ces deux protons sont séparés par 3 liaisons qui représentent six électrons. Le proton H_A a un spin α qui entraîne une légère polarisation du spin des électrons de liaison qui ont tendance à s'apparier avec le spin nucléaire. Cette influence se transmet par appariement selon le principe d'exclusion de Pauli, jusqu'au proton H_B (figure 13).

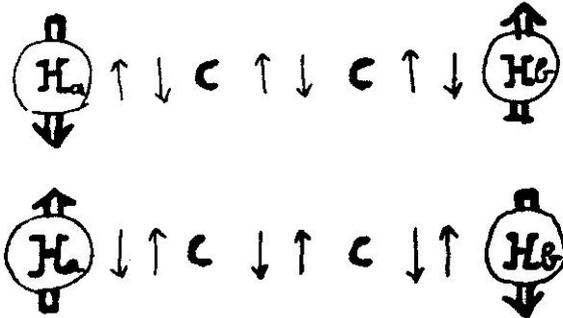


Figure 13

Les électrons gravitant autour de H_B , vont alors créer sous l'influence du spin nucléaire de H_A une légère modification du champ local s'exerçant sur le noyau B. Comme vis-à-vis de H_B , H_A peut avoir deux possibilités de spin, le noyau H_B subit deux modifications du champ local : une qui s'ajoute au champ de résonance et l'autre qui se retranche. D'où le spectre d'absorption RMN de H_B qui apparaîtra alors sous forme de deux pics distants de $2h = J$.

J s'appelle la constante de couplage.

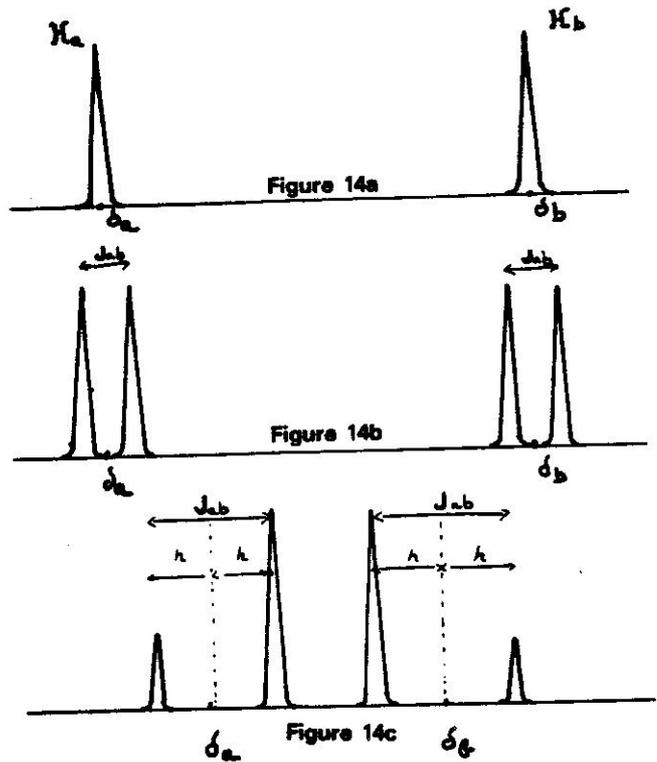
Le même raisonnement montre que le proton H_A au lieu d'apparaître sous forme d'un singulet (figure 14a) donnera par couplage spin-spin avec le proton H_B deux pics distants de $2h = J$. (Figure 14b).

L'intervalle J mesuré en Hz traduit l'intensité du couplage. En général le couplage n'est pas très important au-delà de trois liaisons sauf s'il s'agit d'électrons délocalisés comme dans les systèmes aromatiques éthyléniques.

Alors que le déplacement chimique δ est fonction du champ appliqué H_0 (et souvent aussi de la nature du solvant) la constante de couplage J est indépendante de ces deux facteurs. Les déplacements chimiques s'étalent sur un domaine de 800 Hz, alors que J est rarement supérieur à 20 Hz.

Schématiquement pour les deux protons H_A et H_B ayant respectivement des valeurs de déplacement δ_a et δ_b et une constante de couplage J_{ab} , si

$$\frac{\delta_a - \delta_b}{J_{ab}} > 10 \text{ le spectre apparaît sous forme de doublet}$$



Si la différence $\delta_a - \delta_b$ diminue, la constante du couplage augmente, les pics se rapprochent et l'on constate que l'intensité des pics internes augmente et celle des pics externes diminue (figure 14c).

V.3 — Classification des systèmes de spin (8,9,11)

La classification des systèmes de spins est basée sur :

1) le nombre de noyaux du système ;

2) le rapport : $\frac{\delta_a - \delta_b}{J_{ab}}$ ou encore $\frac{\Delta\nu}{J_{ab}}$

$\Delta\nu$ = différence de fréquence de résonance entre les noyaux mutuellement couplés.

si $\frac{\delta_a - \delta_b}{J} > 10$ — spectre de premier ordre

si $\frac{\delta_a - \delta_b}{J} \approx 1$ ou 2 — spectre de deuxième ordre

Si aucun couplage n'est observé on a des spectres dits d'ordre zéro.

La nomenclature des systèmes de spins utilise la notation de Pople.

Pour un système du premier ordre (le plus simple) dans lequel les noyaux ont une valeur de J faible devant la différence des valeurs de leur déplacement chimique, on affecte par convention les noyaux des lettres éloignées de l'alphabet.

Un système à 2 spins est désigné par A X ;
à 3 spins est désigné par A M X.

Pour un système du deuxième ordre les noyaux sont au contraire désignés par des lettres rapprochées.

Un système à 2 spins est désigné par A B ;
à 3 spins est désigné par A B C.

Il existe bien sûr tous les systèmes intermédiaires dans lesquels un noyau peut-être fortement couplé d'un côté et faiblement couplé de l'autre. Par exemple on aura des systèmes AMX, ABMX, etc.

Des protons chimiquement et magnétiquement équivalents seront désignés par la même lettre, leur nombre sera affecté en indice. Ex. : Systèmes A₂, A₃, A₂B, A₂X₂, etc.

Prenons un exemple classique, l'éthanol CH₂ - CH₂ - O - H et dans cette molécule le groupement éthyle qui est porté par un hétéro-atome l'oxygène. Regardons ce qui se passe au niveau de ce groupement C₂H₅. On a à faire à un système A₂X₃.

Pour les deux protons du groupe méthylène CH₂, il y a trois combinaisons possibles des orientations de spins nucléaires qui peuvent modifier les fréquences de résonance des protons du groupe méthyle. Le « groupe perturbateur » CH₂ sera responsable d'une structure à 3 pics du groupe perturbé CH₃ et ayant pour surfaces relatives 1 - 2 - 1.

Inversement pour les trois protons du groupe méthyle, il y a quatre combinaisons possibles des orientations de spin nucléaire qui peuvent modifier les fréquences de résonance des protons du groupe méthylène. Le groupe perturbateur CH₃ sera alors responsable d'une structure à 4 pics du « groupe perturbé CH₂ » et ayant pour intensité relative 1 - 3 - 3 - 1.

Cette figure triplet - quadruplet est caractéristique du groupement éthyle isolé (figure 15).

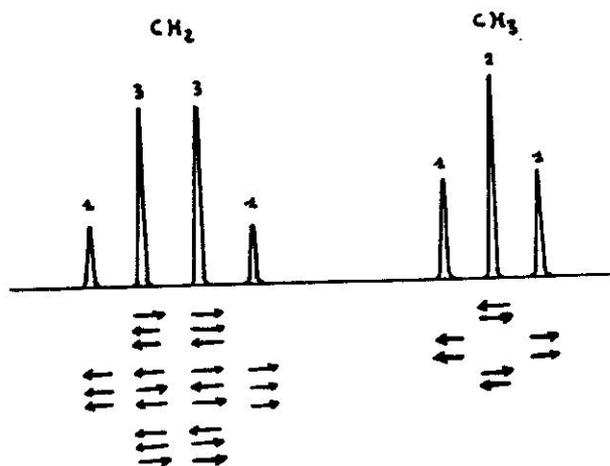


Figure 15
Groupement Ethyle —CH₂—CH₃
Quadruplet — Triplet
Orientations possible des spins
des Protons du groupement éthyle.

Dans une molécule comme la pyridine (Figure 11) les protons constituent un système AA' XX' Y.

L'allure des spectres du premier ordre est relativement simple et peut-être déterminé à partir de quelques règles.

Pour un noyau de spin 1/2 comme le proton, le système général est représenté par la formule A_m X_r.

- La partie A du spectre contient 2r + 1 raies (l = 1/2).
- La partie X du spectre contient 2m + 1 raies.

Ces raies sont espacées de façon régulière et l'écartement des raies donne la constante de couplage.

(Des règles aussi simples sont valables pour les noyaux de spin différent de 1/2 et donnant des spectres du premier ordre).

- Les intensités des raies du spectre de premier ordre sont données par le développement du binôme (a + b)ⁿ ou plus simplement en utilisant le triangle de Pascal.

$$\begin{array}{ccccccc}
 & & & & 1 & & & & \\
 & & & & 1 & & 1 & & \\
 & & & 1 & 2 & 1 & & & \\
 & & 1 & 3 & 3 & 1 & & & \\
 1 & 4 & 6 & 4 & 1 & & & &
 \end{array}$$

Les systèmes les plus fréquemment rencontrés sont résumés dans le tableau II.

TABLEAU II

Système	Exemple	Allure du spectre
A X	R-CH-CH-R	
A X ₂	R-CH-CH ₂ -R	
A ₂ X ₃	CH ₃ -CH ₂ -R	
A ₂ X ₂	R-CH ₂ -CH ₂ -R	
A ₄ X	R-CH ₂ -CH(R)-CH ₂ -R	
A ₆ X	CH ₃ -CH(R)-CH ₃ Isopropyl	

Mais ces systèmes simples constituent plus des exceptions que la règle générale. Beaucoup de spectre sont du deuxième ordre et tous les intermédiaires entre premier ordre et deuxième ordre sont possibles, ce qui rend l'interprétation souvent délicate et nécessite parfois un ordinateur.

Retenons quelques figures particulières. Un système AMX donnera un spectre avec 12 raies d'égales intensités (3 groupes de 4) (figure 16).

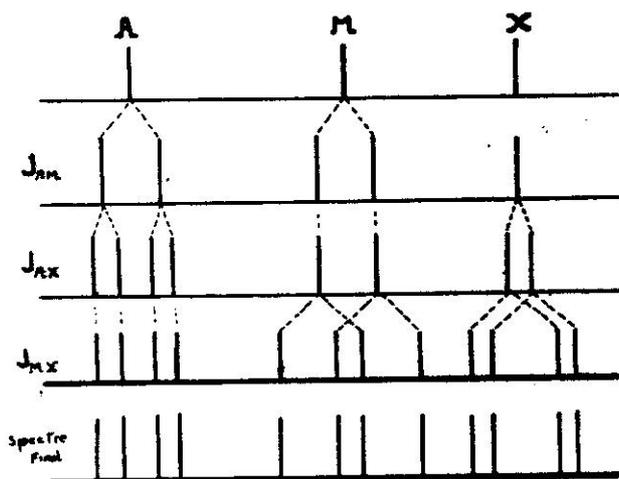


Figure 16
Système AMX
Construction par dédoublements successifs.
Allure du Spectre (3 quadruplets).

Les quatre protons AA' XX' du noyau benzène para-disubstitué donnent dans la région de 7 ppm un tracé caractérisé par une certaine symétrie.

Un système ABX peut-être décomposé et l'on peut faire apparaître la partie AB du second ordre dans le tracé du spectre.

Un système ABC comprend 15 raies d'attribution parfois difficile.

Exemple de spectres : les figures 17 à 22 montrent des spectres RMN de différentes molécules et leurs interprétations. (Spectres RMN proton 60 MHz).

Simplification des spectres:

Il existe plusieurs moyens pour simplifier les spectres :

- on peut augmenter H_0 ce qui augmente δ et non J . A l'heure actuelle on utilise des spectromètres RMN à 100 MHz et à 250 MHz. L'achat et la maintenance de ce type d'appareillage sont très coûteux ;
- par effet de solvant. Suivant le solvant utilisé, certains protons se trouvent plus ou moins blindés ou déblindés ; c'est-à-dire déplacés vers les champs forts ou faibles ;
- par utilisation de complexe de lanthanides en particulier d'Europium on peut modifier les déplacements chimiques et simplifier l'interprétation.

L'exposé de ces méthodes dépasse le cadre de cet exposé. Une méthode pratique courante permet de simplifier l'interprétation, c'est le « découplage de spin » ou double irradiation.

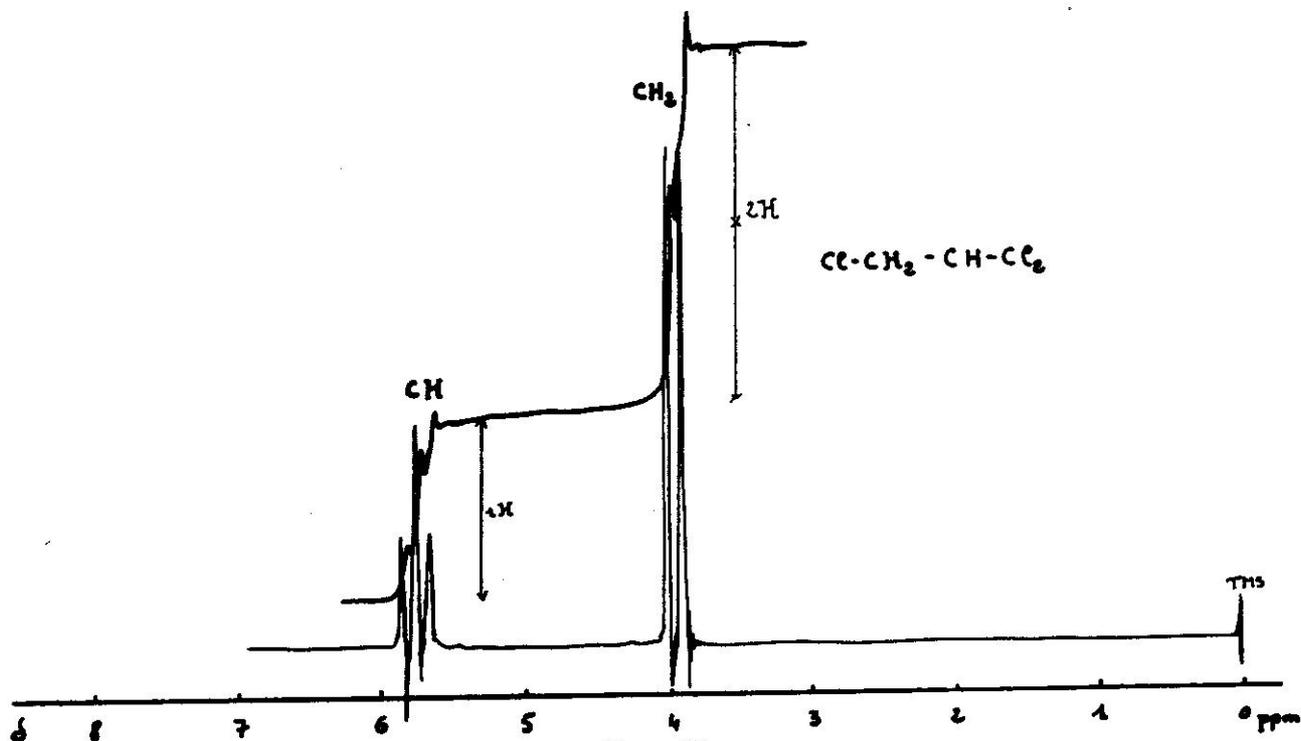


Figure 17
1—1—2 Trichloréthane (AX_2).
CH proton très déblindé par 2Cl.
CH₂ protons moins déblindés par 1Cl.

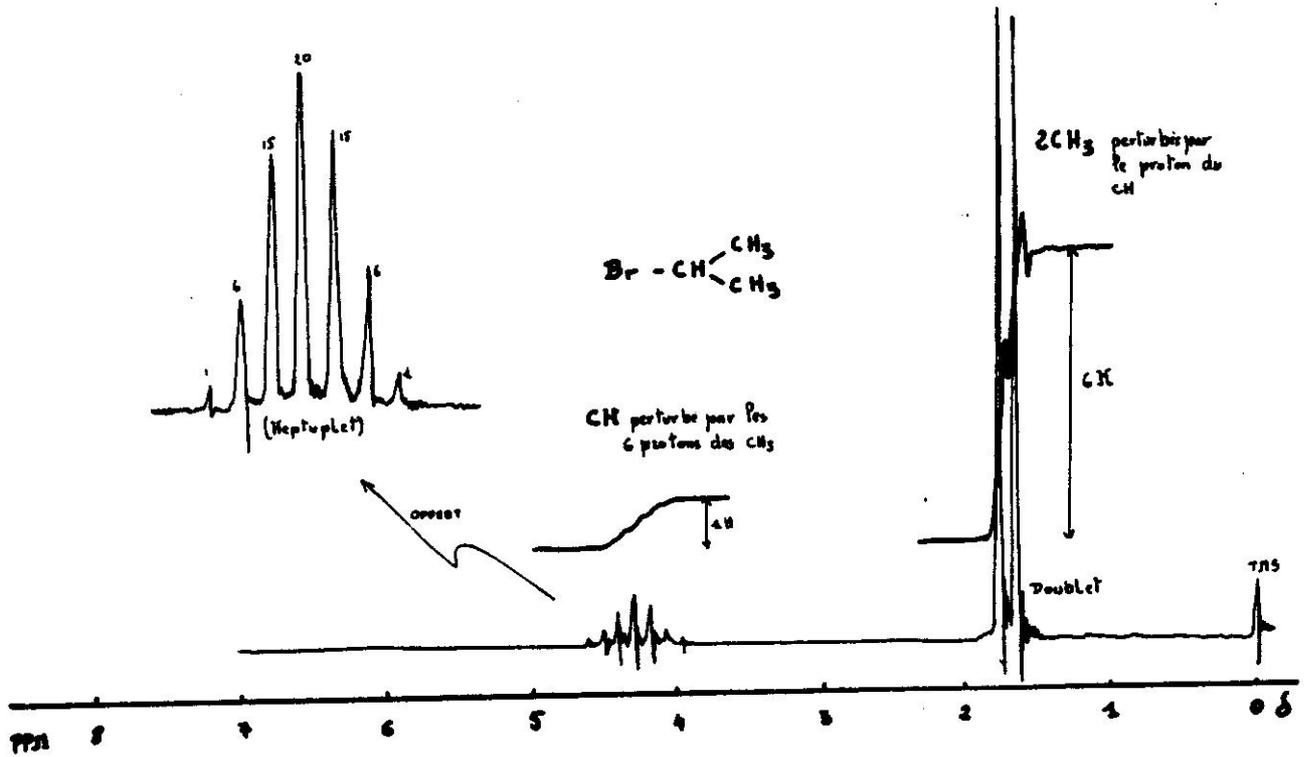


Figure 18
Bromure d'isopropyle (A₂X)

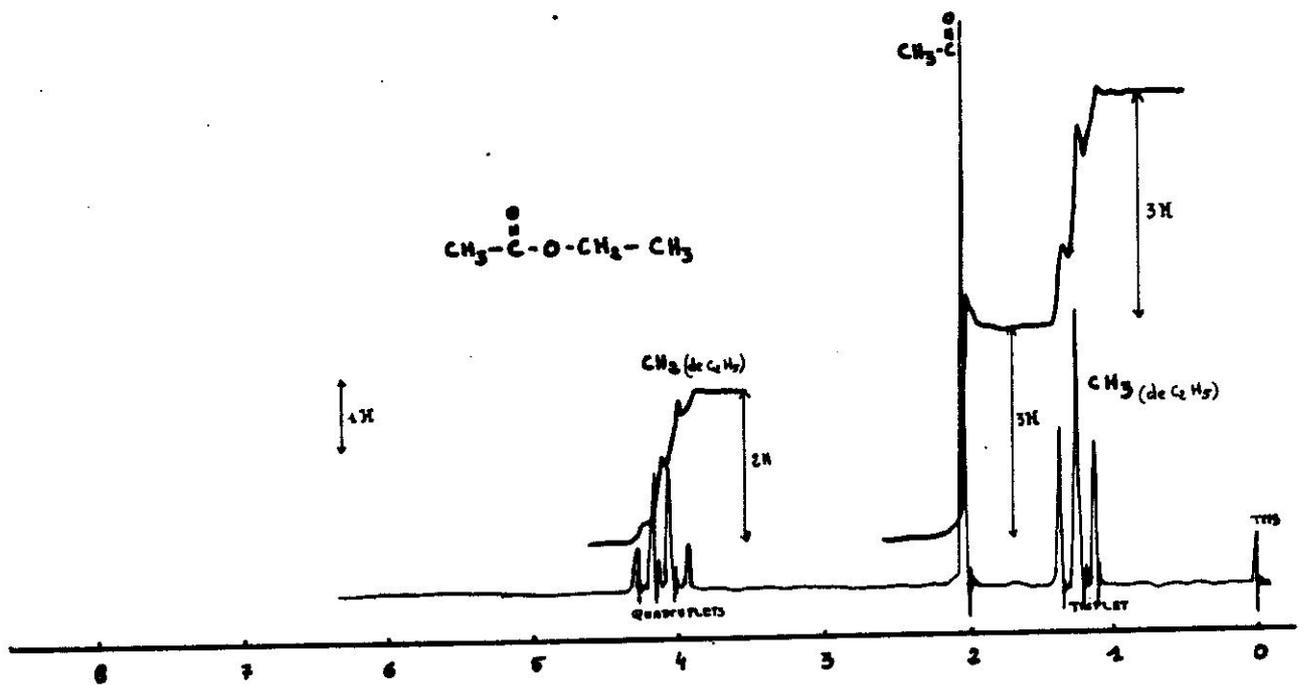


Figure 19
Acétate d'Ethyle A₂X₂

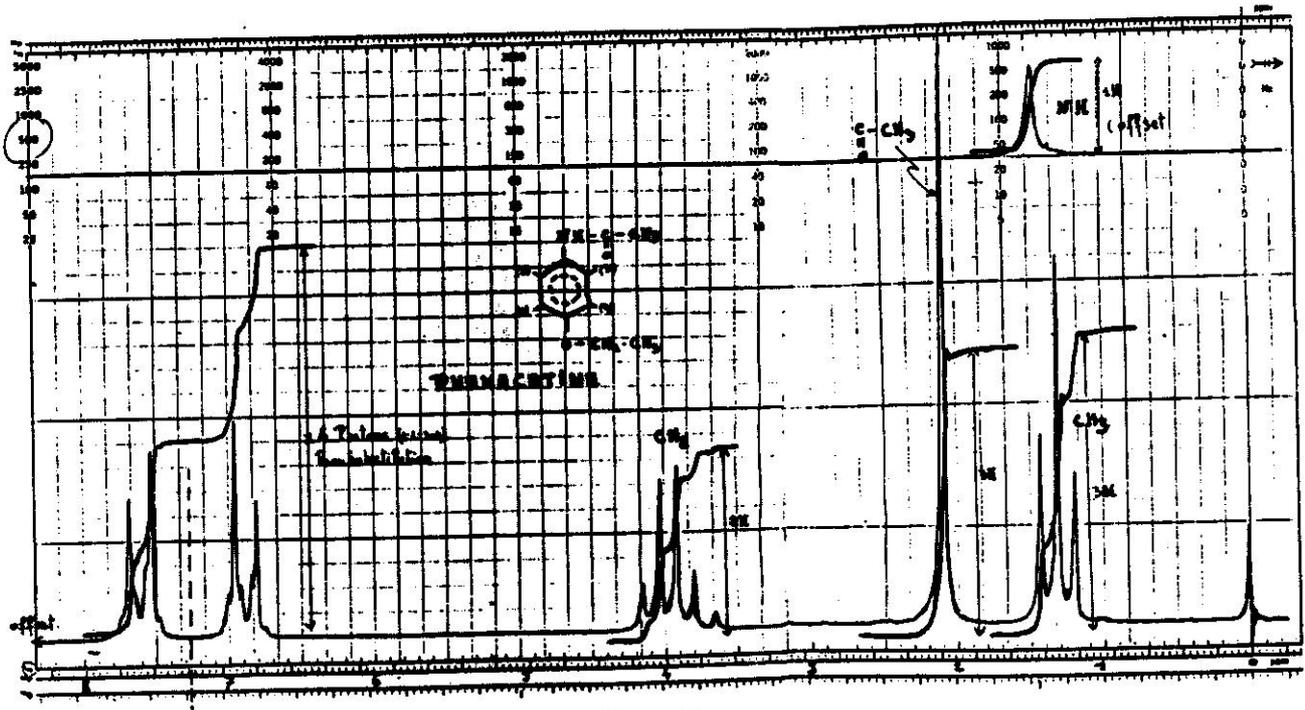


Figure 20
Phénacétine

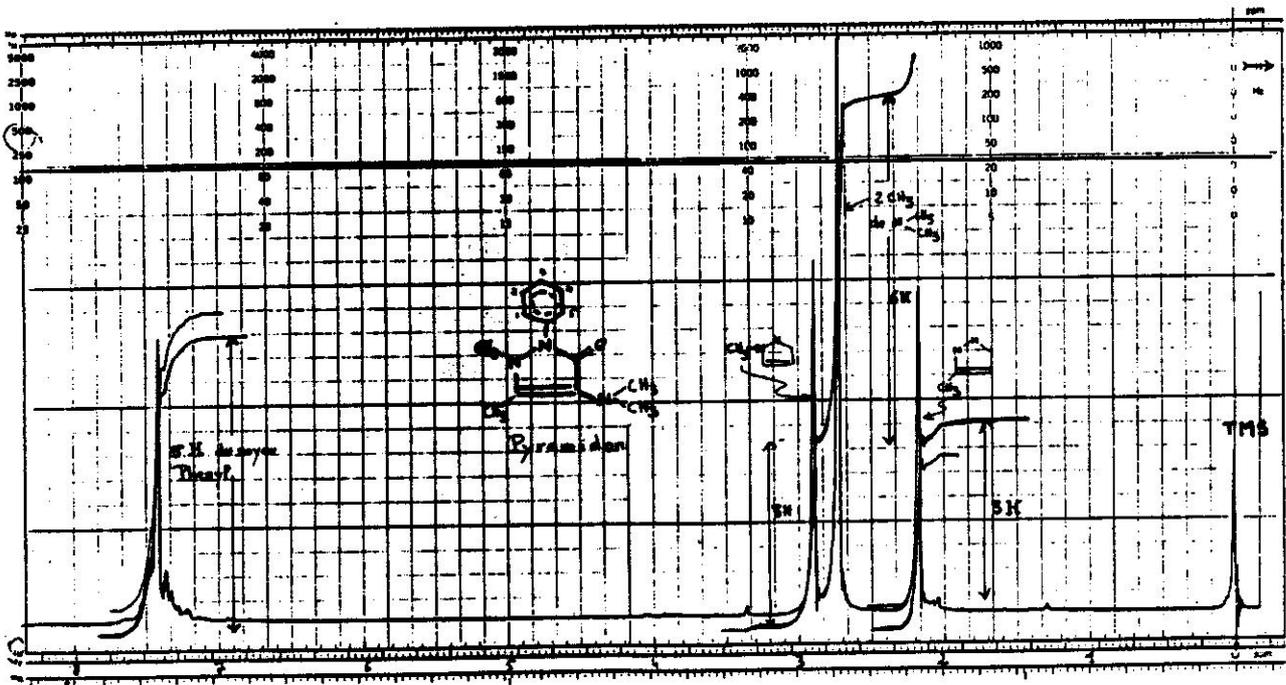


Figure 21
Pyramidon

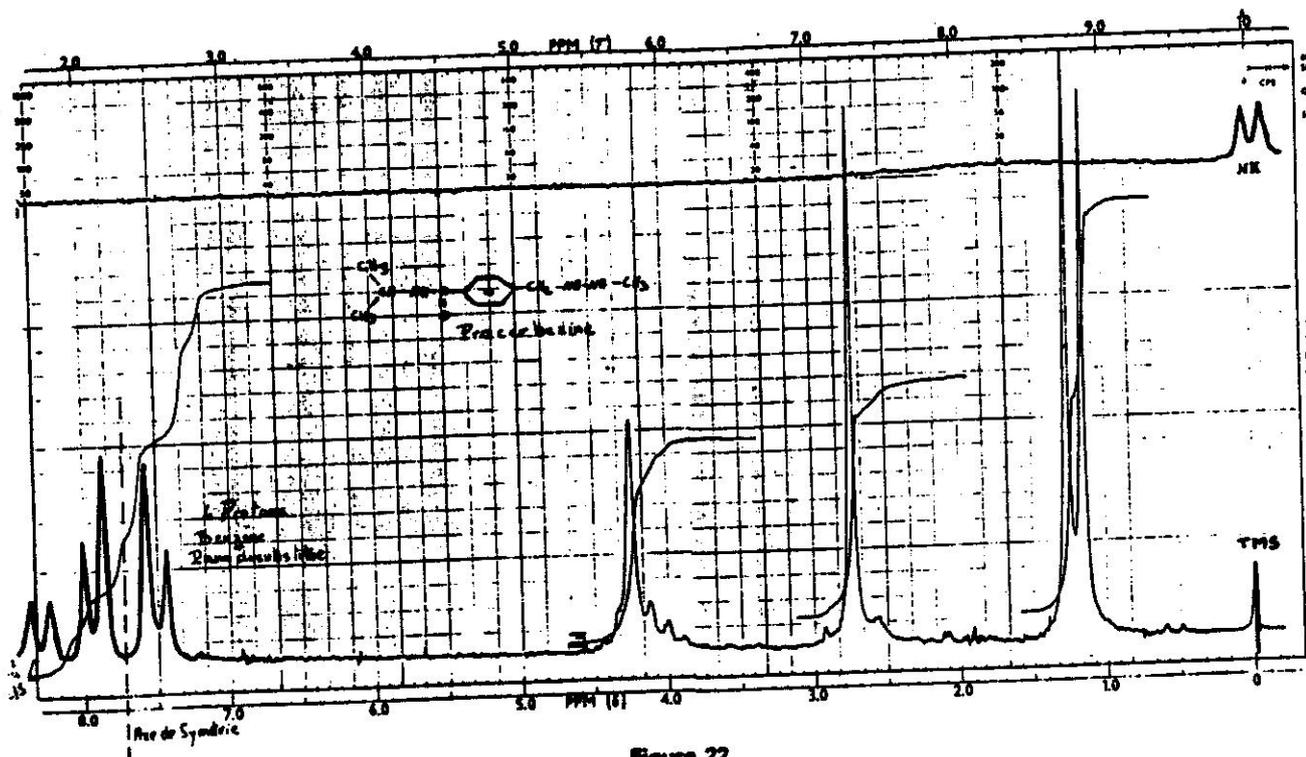


Figure 22
Procarbazine

Nous voyons ainsi tout de suite l'une des applications importantes de la R.M.N. c'est l'analyse structurale. Elle est indispensable à côté de la spectrophotométrie infrarouge et de la spectrométrie de masse pour la détermination de la structure des molécules et de leur stéréochimie.

Nous verrons dans le prochain exposé ces utilisations ainsi que les applications en analyse qualitative et quantitative dans les domaines pharmaceutiques et biologiques.

De plus, grâce à l'emploi de « marquage froid » des molécules (avec D, ^{13}C , ^{15}N), des résultats intéressants et des plus prometteurs ont été obtenus en biochimie et dans les études de métabolismes de médicaments.

SUMMARY

Nuclear magnetic resonance spectrometry and its pharmaceutical applications (Part I).
by H. PINATEL, J.L. BRAZIER and Y. PEGON

Nuclear magnetic resonance (N.M.R.) spectroscopy is a physical method of analysis which is becoming increasingly important in chemical analysis alongside the other spectroscopies and mass spectrometry. In the first part of the article the authors present the basic theoretical principles of N.M.R. and give the characteristic measures, chemical shift spin-spin coupling, spin systems commonly used in structural analysis. Examples of studies of pharmaceutical molecules are given.

[Lyon Pharmaceutique, 1976, 27, 6, 567-581]

BIBLIOGRAPHIE

La bibliographie paraîtra dans la seconde partie qui sera publiée dans un prochain numéro du Lyon Pharmaceutique.

**UNIVERSITE DE
MONTREAL
MAGNETIQUE**

EXERCICE 1

Donner les formules structurales des substances ayant les spectres RMN suivants :

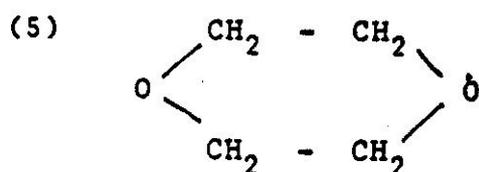
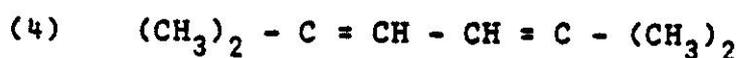
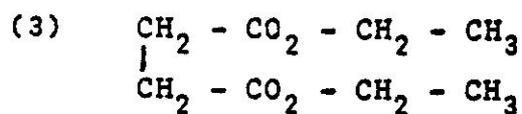
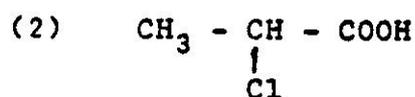
(1) Triplet aire 3 δ 1,27 ppm
 Singulet aire 3 δ 2,10 ppm
 Quartet aire 2 δ 2,53 ppm
 Formule brute $C_3 H_8 S$

(2) Doublet aire 6 δ 1,25 ppm
 Septuplet aire 1 δ 2,90 ppm
 Singulet large aire 5 δ 7,25 ppm
 Formule brute $C_9 H_{12}$

(3) Triplet aire 2 δ 2,62 ppm
 Triplet aire 2 δ 3,62 ppm
 Singulet aire 3 δ 3,40 ppm
 Formule brute $C_4 H_7 NO$

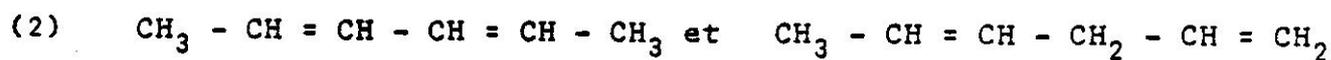
EXERCICE 2

Prévoir le spectre RMN à 60 MHz des composés suivants en donnant les déplacements chimiques approximatifs.



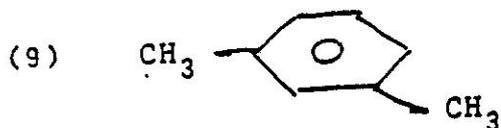
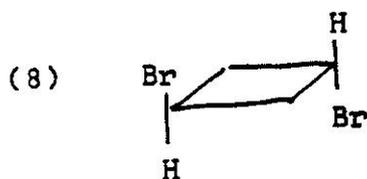
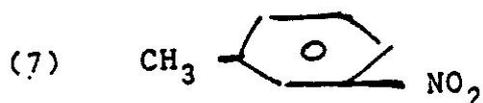
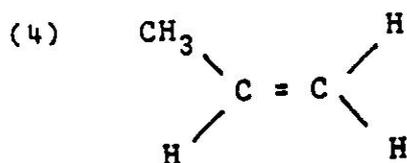
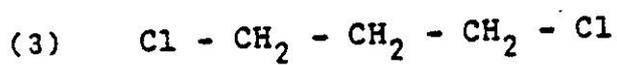
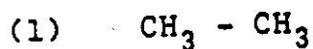
EXERCICE 3

Quelles techniques spectroscopiques (UV - RMN - IR) peut-on utiliser pour distinguer les composés des couples suivants :



EXERCICE 4

Donnez le nombre de protons magnétiquement différents dans les composés suivants :



EXERCICE 5

Soient 4 isomères A. B. C. D. de formule brute $C_8H_8O_2$ avec les données spectrales suivantes :

I.R.	A B C D	1610 cm^{-1}			
		1500	intense fine pour les 4		
	A B C	2 bandes larges	750 cm^{-1}		
			690		
	D	bande à 1700 - 1725 - large			
		bande fine à 840 cm^{-1}			
	B . C	plusieurs bandes à 3040 cm^{-1} faible			
	A . D	bande large non définie à 3040 cm^{-1}			
	B . C	bande large à 1225 cm^{-1}			
R.M.N.	A	3 singulets	3,5	7,6	13,8 ppm
		intensité	2	5	1
	B	1 singulet	2,15 ppm d'intensité 3		
		Multiplet	7,15 ppm d'intensité 5		
	C	1 singulet	3,85 ppm d'intensité 3		
		1 multiplet	7,4 ppm d'intensité 5		
	D	1 singulet	2,5 ppm d'intensité 3		

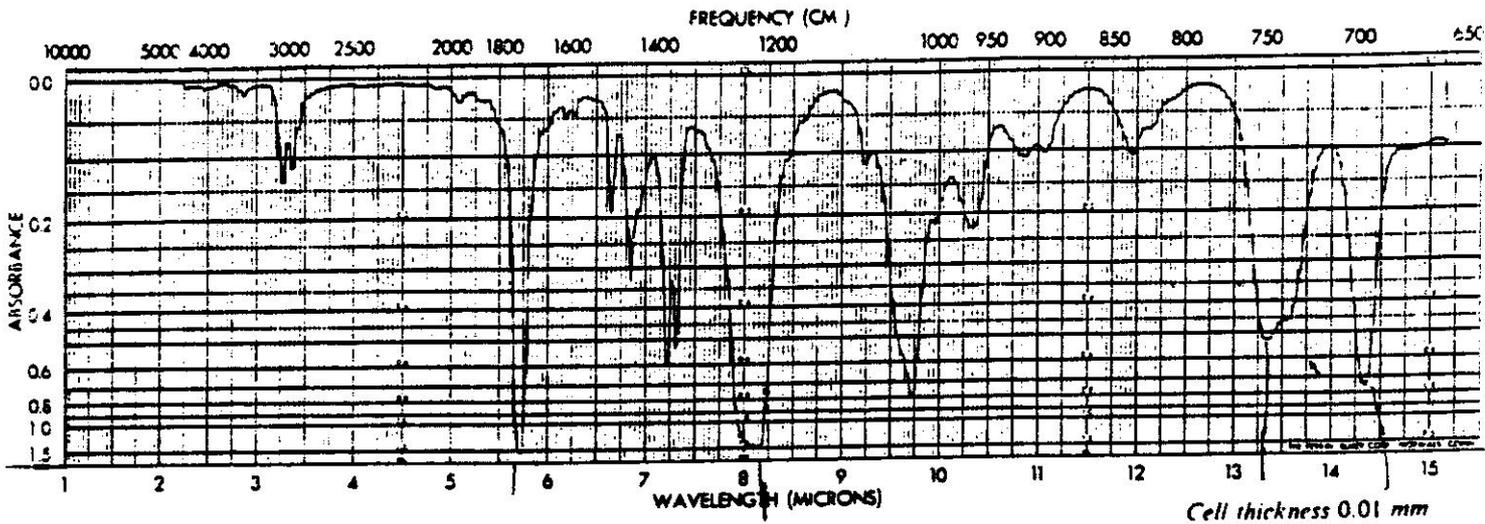
Multiplet large

complexe avec 1 axe de symétrie 6,6 à 7,7 ppm intensité 4

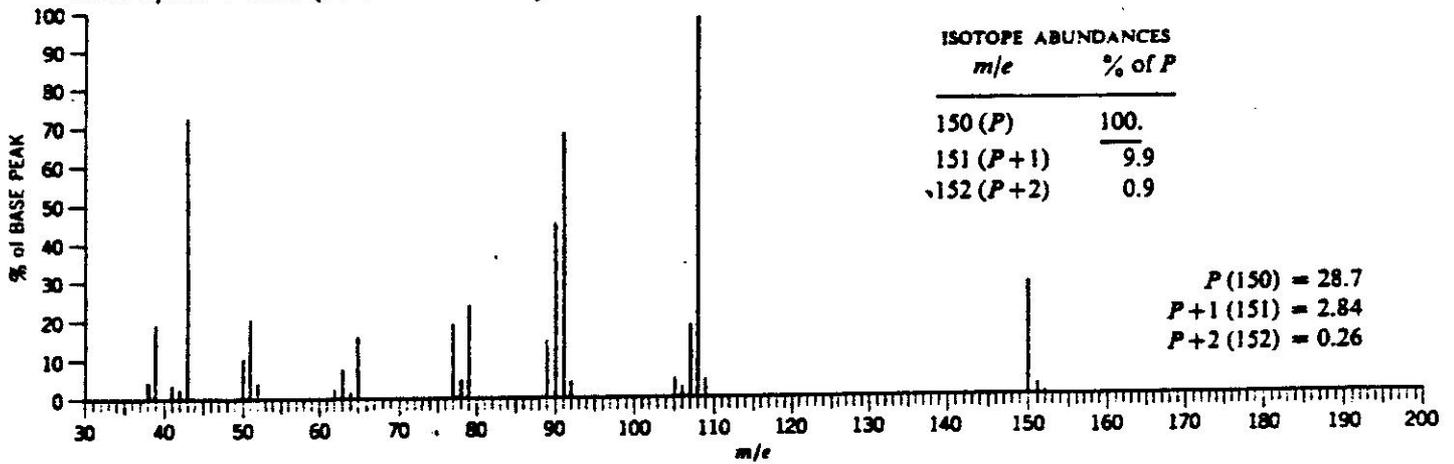
Singulet 10,5 ppm d'intensité 1.

EXERCICE 6

Infrared Spectrum



Mass Spectral Data (Relative Intensities)

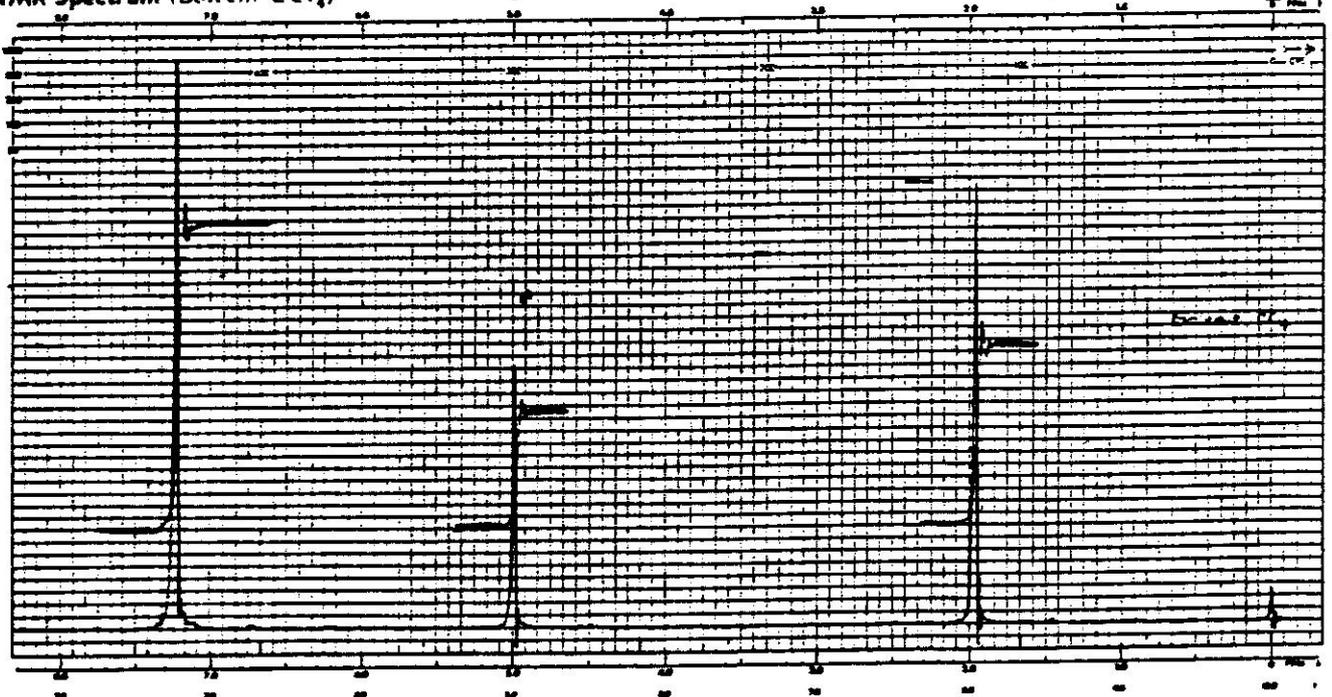


Ultraviolet Data

$\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$	ϵ_{max}	252	153
268	101	248 (s)	109
264	158	243 (s)	78
262	147		
257	194		

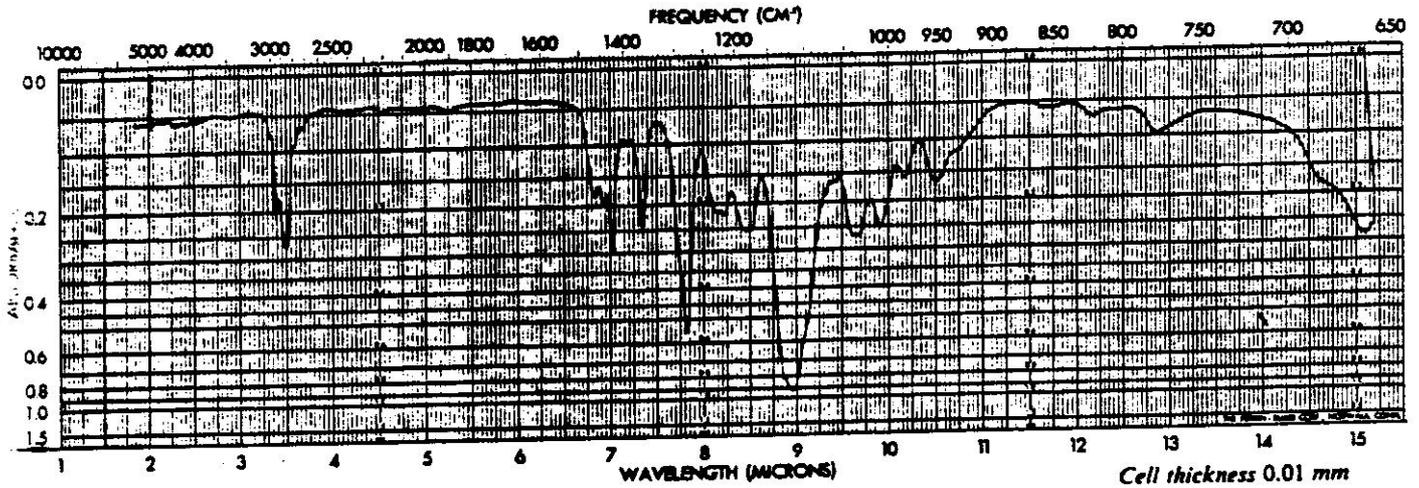
(s) = shoulder

NMR Spectrum (Solvent: CCl₄)

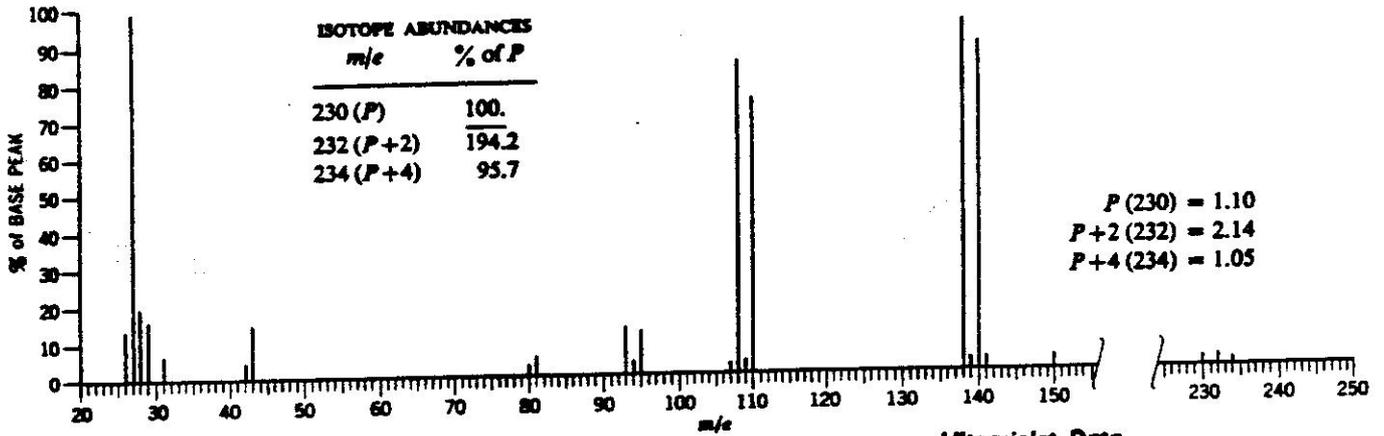


EXERCICE 7

Infrared Spectrum



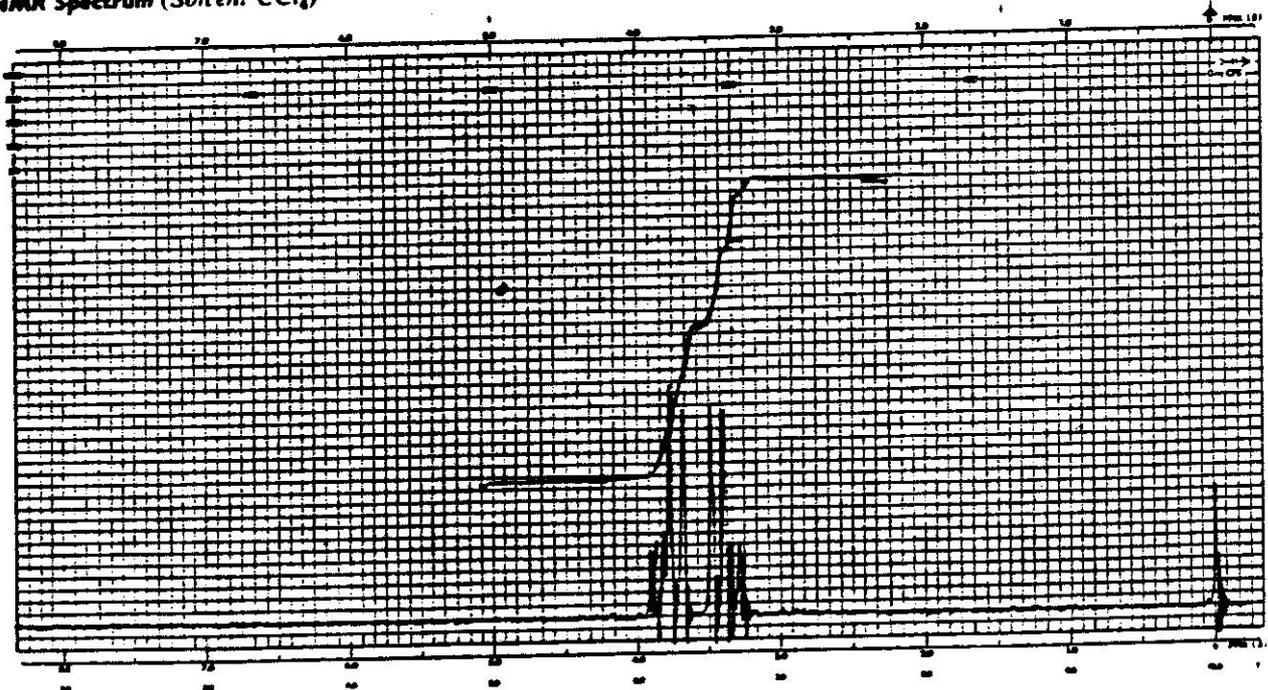
Mass Spectral Data (Relative Intensities)



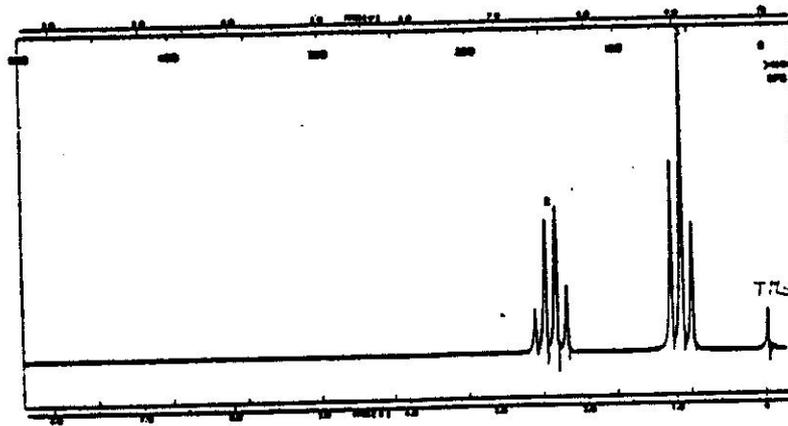
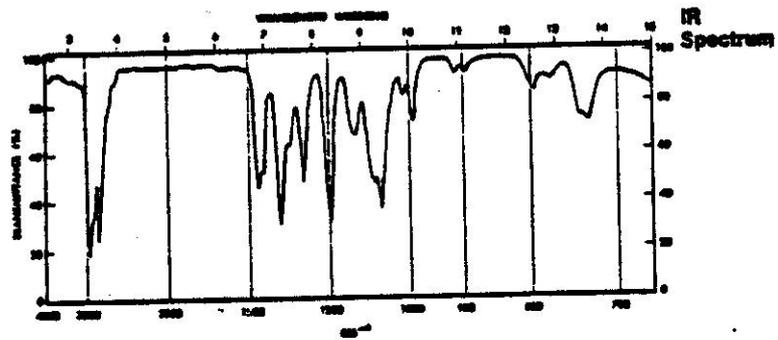
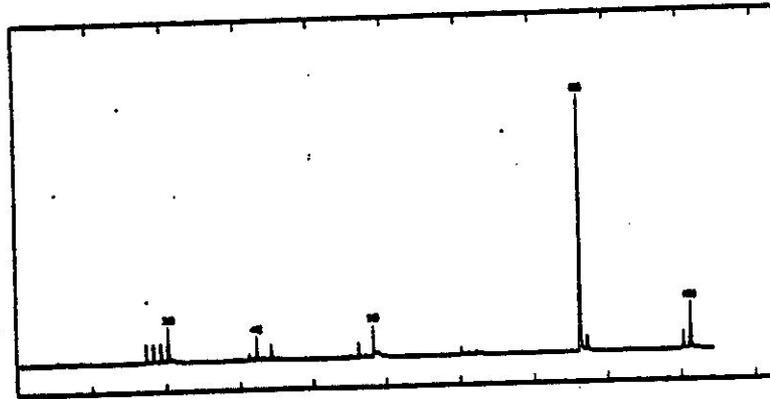
Ultraviolet Data

$\lambda_{\text{EPRH MAX}}$	ϵ_{MAX}
305 (inflection)	1.5

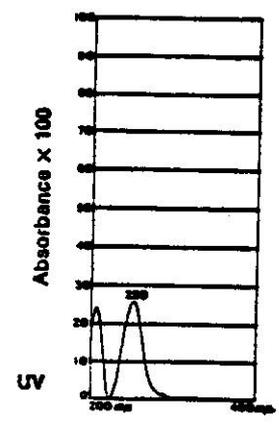
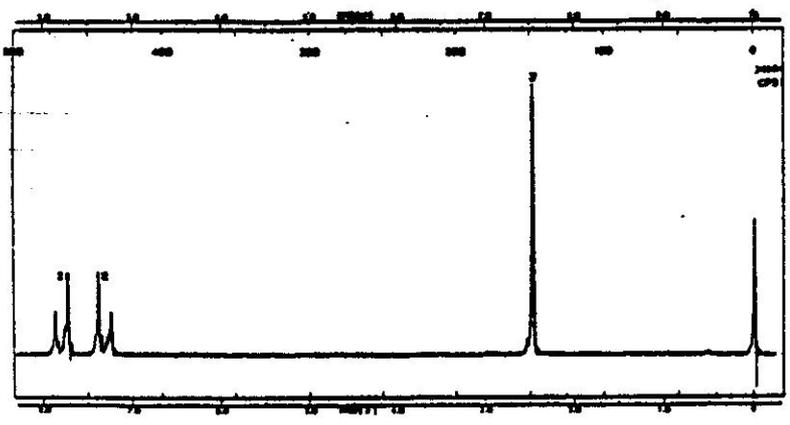
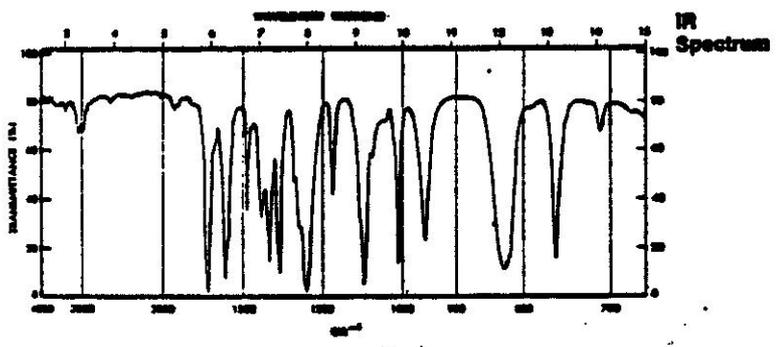
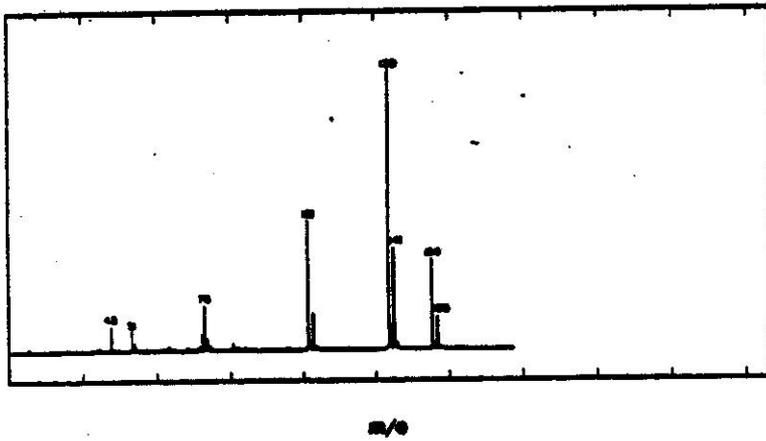
NMR Spectrum (Solvent CCl_4)



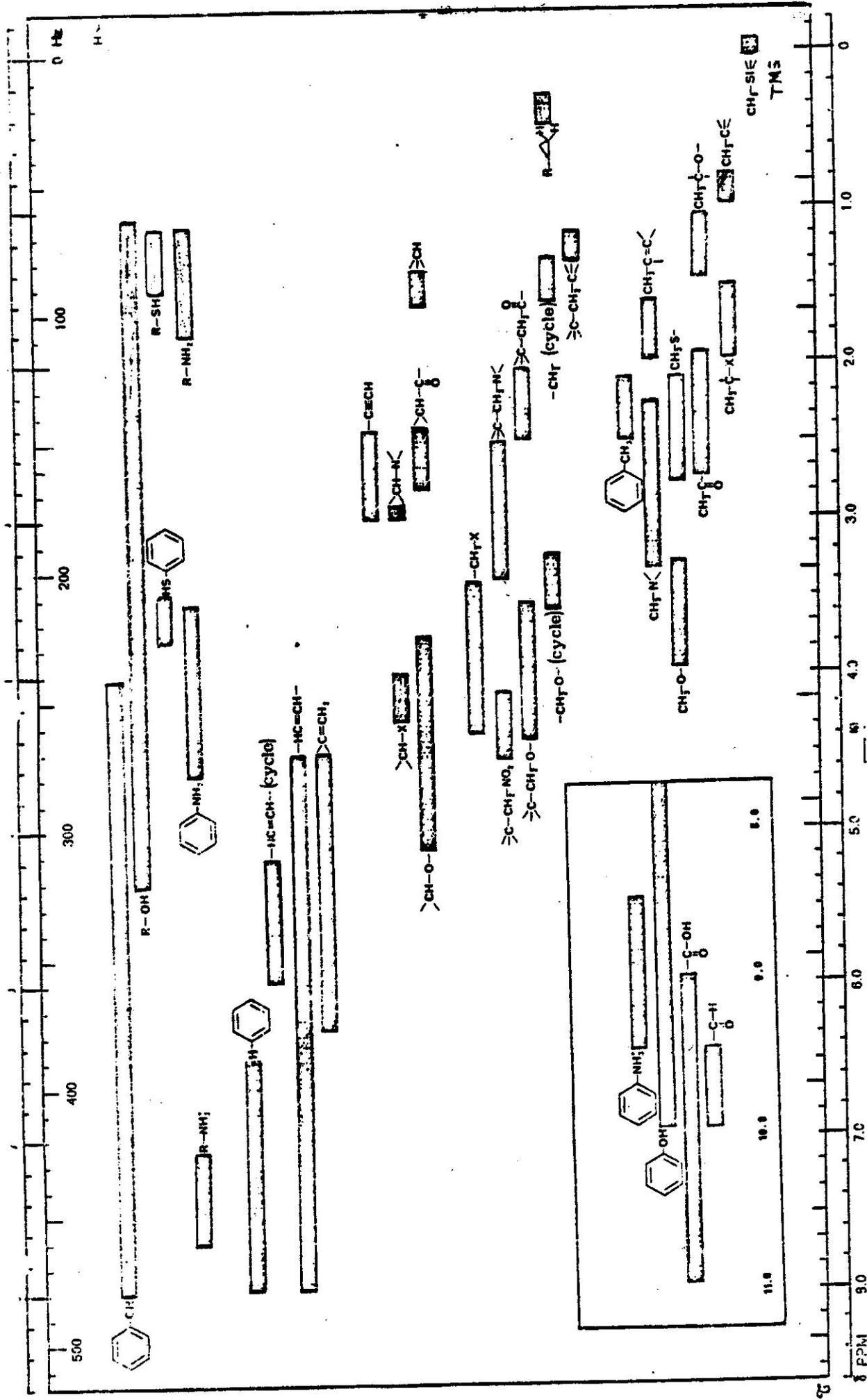
EXERCICE 8



EXERCICE 9



RMN - DEPLACEMENTS CHIMIQUES



Chemical structures and their corresponding chemical shifts:

- 11.0 PPM: Carboxylic acid (C-OH)
- 10.0 PPM: Aldehyde (C-H)
- 9.0 PPM: Aldehyde (C=O)
- 7.0 - 8.5 PPM: Aromatic protons (NH₂, OH)
- 6.5 - 8.5 PPM: Aromatic protons (NH₂)