



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf



Faculté de Chimie
Département de Génie Chimique

Polycopié

Techniques d'Analyse
"Cours et Exercices Corrigés"

Destiné aux étudiants de 3^{eme} année
Licence Génie des Procédés

Réalisé par :

Mr BENABDALLAH Nabil
Maitre de Conférences B (USTO MB)

Année universitaire 2023/2024

TABLE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES

N°	TITRE	Page
1	<i>Propagation du champ électrique et magnétique d'une onde électromagnétique</i>	1
2	<i>Différents domaines du spectre électromagnétique par longueurs d'onde</i>	3
3	<i>Diagramme des niveaux d'énergie quantifiés d'une molécule</i>	5
4	<i>Processus d'absorption d'un photon par la molécule</i>	6
5	<i>Processus d'émission d'un photon par la molécule</i>	7
6	<i>Spectre des rayonnements optiques</i>	8
7	<i>Schéma illustrant la notion de transmittance</i>	9
8	<i>Schéma de principe d'un spectrophotomètre monofaisceau</i>	12
9	<i>Schéma de principe d'un spectrophotomètre à double faisceau</i>	12
10	<i>Allure d'un spectre d'absorption UV-visible</i>	13
11	<i>Diagramme des transitions possibles dans les composés organiques</i>	14
12	<i>Dédoublement des orbitales d dans un champ octaédrique</i>	16
13	<i>Bande d'absorption du complexe $Ti(H_2O)_6J^{3+}$ dans le domaine du visible</i>	16
14	<i>Différents effets sur la bande d'absorption du chromophore</i>	18
15	<i>Resserrement des niveaux d'énergie dû au phénomène de conjugaison</i>	19
16	<i>Effet de la polarité du solvant sur la transition $n \rightarrow \pi^*$</i>	20
17	<i>Effet de la polarité du solvant sur la transition $\pi \rightarrow \pi^*$</i>	21
18	<i>Spectre d'absorption et couleur de l'ion complexe $Ti(H_2O)_6J^{3+}$</i>	21
19	<i>Spectre du rayonnement infrarouge</i>	30
20	<i>Modèle de l'oscillateur</i>	31
21	<i>Molécule diatomique A-B modélisée comme un oscillateur harmonique</i>	33
22	<i>Modes de vibration dans une molécule polyatomique</i>	34
23	<i>Spectromètre IR type dispersif</i>	34

TABLE DES ILLUSTRATIONS

24	<i>Spectromètre IR à transformée de Fourier (FTIR)</i>	35
25	<i>Exemple de spectre infrarouge; spectre de l'hexan-1-ol</i>	37
26	<i>Les deux zones d'un spectre infrarouge</i>	38
27	<i>Formation de bandes colorées lors de la séparation des pigments d'une feuille d'épinard sur une colonne de carbonate de calcium</i>	50
28	<i>Exemple de chromatogramme</i>	55
29	<i>Séparation de 2 solutés A et B d'un mélange</i>	57
30	<i>Résolution des pics de 2 solutés</i>	57
31	<i>Influence du facteur R_s sur la qualité de séparation de 2 pics</i>	58
32	<i>Modèle des plateaux théoriques</i>	58
33	<i>Caractéristiques d'un pic chromatographique</i>	59
34	<i>Chromatogramme en CPG d'un mélange de 22 constituants</i>	61
35	<i>Schéma d'un chromatographe en phase gazeuse</i>	62
36	<i>Schéma d'un injecteur</i>	62
37	<i>Schéma (en coupe) et photo d'une colonne remplie</i>	63
38	<i>Schéma (en coupe) et photo d'une colonne capillaire</i>	64
39	<i>Colonne et four</i>	64
40	<i>Détecteur à conductibilité thermique (TCD)</i>	65
41	<i>Détecteur à ionisation de flamme (FID)</i>	66
42	<i>Schéma d'une plaque chromatographique</i>	70
43	<i>Rapport frontal d'un soluté</i>	71
44	<i>Appareillage utilisé en CCM</i>	72
45	<i>Schéma d'une chromatographie sur papier</i>	73
46	<i>Schéma d'un colonne chromatographique classique</i>	75
47	<i>Schéma d'un chromatographe en phase liquide à haute performance</i>	79

TABLE DES ILLUSTRATIONS

48	<i>Principe de séparation de la chromatographie d'exclusion</i>	80
49	<i>Courbe d'étalonnage $\log MM = f(V_e)$</i>	81
50	<i>Exemple de séparation par chromatographie ionique. Echange d'anion X d'un soluté avec un contre-ion A⁻ de la phase stationnaire</i>	82
51	<i>Adsorption du soluté sur la surface de la phase stationnaire</i>	83

TABLE DES MATIERES

Page

AVANT-PROPOS

TABLE DES ILLUSTRATIONS

CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉS SUR LA SPECTROSCOPIE	1
I.1. Onde électromagnétique.....	1
I.2. Nature de la lumière.....	1
I.3. Spectre électromagnétique.....	2
I.4. Spectroscopie	4
I.5. Mouvements moléculaires et énergies.....	5
I.6. Interaction matière - rayonnement : absorption et émission.....	6
I.6.1. Absorption	6
I.6.2. Emission	6
I.7. Références bibliographiques	7
CHAPITRE II : SPECTROSCOPIE ULTRAVIOLET-VISIBLE	8
II.1. Rayonnement optique	8
II.2. Spectroscopie ultraviolet-visible (UV-Visible)	8
II.3. Loi de Beer-Lambert	9
II.3.1. Validité de la loi de Beer-Lambert	10
II.3.2. Additivité de la loi de Beer-Lambert	10
II.4. Spectrophotomètres UV-visible	11
II.5. Allure du spectre d'absorption	13
II.6. Règles de sélection	13
II.7. Transitions électroniques	14
II.7.1. Transitions électroniques dans les composés organiques	14
II.7.2. Transitions électroniques dans les complexes des métaux de transition	15
II.8. Facteurs influençant les transition électroniques	17
II.8.1. Terminologie	17
II.8.2. Effet de la substitution	18

TABLE DES MATIERES

II.8.3. Effet de la conjugaison	19
II.8.4. Effet de la conformation	20
II.8.5. Effet de solvant	20
II.9. Spectre d'absorption et couleur d'une solution	21
II.10. Références bibliographiques	22
II.11. Exercices d'application	22
II.12. Corrigé des exercices	24
CHAPITRE III : SPECTROSCOPIE INFRAROUGE	30
III.1. Qu'est ce que le rayonnement infrarouge ?	30
III.2. Spectroscopie infrarouge.....	31
III.3. Spectroscopie infrarouge et mouvements moléculaires	32
III.3.1. Types de vibration moléculaires	32
III.4. Spectromètres infrarouges	34
III.4.1. Spectromètre à rayonnement infrarouge dispersif	34
III.4.2. Spectromètre à transformée de Fourier (IRTF ou FTIR)	35
III.5. Techniques de mesure en spectroscopie FTIR	36
III.6. Présentation d'un spectre d'absorption infrarouge	36
III.7. Interprétation d'un spectre d'absorption infrarouge	37
III.8. Identification de quelques groupes fonctionnels caractéristiques	39
III.9. Bandes d'absorption associées à quelques liaisons chimiques	40
III.10. Références bibliographiques	42
III.11. Exercices d'application	43
III.12. Corrigé des exercices	46
CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE	50
IV.1. Qu'est ce que la chromatographie ?	50
IV.2. Principe de la chromatographie	50
IV.3. Classification des méthodes chromatographiques	51
IV.3.1. Classification selon la nature physique des phases	51
IV.3.2. Classification selon le procédé opératoire	52

TABLE DES MATIERES

IV.3.3. Classification selon le phénomène chromatographique mis en œuvre	52
IV.4. Terminologie propre à la chromatographie	53
IV.4.1. Terminologie générale	53
IV.4.2. Grandeurs de rétention	55
IV.4.3. Grandeurs caractérisant les performances de la colonne	56
IV.5. Différents types de chromatographie	60
IV.5.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG / GC)	60
IV.5.1.1. Description et principe de la technique	60
IV.5.1.2. Appareillage	62
IV.5.1.3. Domaines d'application	67
IV.5.2. Chromatographie en phase liquide (CPL / LC)	68
IV.5.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	69
IV.5.2.2. Chromatographie sur papier (CP)	73
IV.5.2.3. Chromatographie sur colonne classique (CC)	74
IV.5.2.4. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)	76
IV.5.2.5. La chromatographie d'exclusion stérique (SEC)	80
IV.5.2.6. Chromatographie par échanges d'ions (IEX)	82
IV.5.2.7. La chromatographie d'adsorption	83
IV.6. Références bibliographiques	83
IV.7. Exercices d'application	85
IV.8. Corrigé des exercices	92

AVANT-PROPOS

L'analyse physico-chimique compte parmi les principales tâches du chimiste dans un laboratoire. Séparer les constituants chimiques d'un échantillon, identifier les différentes espèces, les quantifier et caractériser leurs structures sont des opérations essentielles inhérentes à l'activité de recherche, aussi bien à l'université qu'au niveau industriel.

Selon les problématiques rencontrées, des techniques diverses peuvent être mises en œuvre pour l'analyse d'une substance inconnue. Une analyse approfondie requiert généralement l'utilisation de plusieurs techniques physico-chimiques permettant d'obtenir des informations complémentaires nécessaires à l'identification de la substance et à l'élucidation de sa structure.

La matière "*Techniques d'Analyse*" compte parmi les enseignements les plus importants dispensés aux étudiants chimistes de premier et second cycle. Son but est de leur fournir les connaissances fondamentales leur permettant de maîtriser les méthodes physico-chimiques d'analyse, de choisir, en fonction des objectifs, les techniques les plus appropriées, et de savoir les appliquer judicieusement pour l'identification et la caractérisation des substances à analyser.

Le contenu de ce polycopié se rapporte au cours de la matière "*Techniques d'Analyse*" dispensé aux étudiants de troisième année Licence Génie des Procédés au sein de la Faculté de Chimie.

Structuré en quatre chapitres, le contenu du présent polycopié traite de trois méthodes d'analyse physico-chimiques, à savoir la spectroscopie UV-visible, la spectroscopie infrarouge et la chromatographie, précédées de quelques rappels de notions de base de spectroscopie, dont notamment les ondes électromagnétiques, leurs caractéristiques, leur répartition dans le spectre électromagnétique et leur interaction avec la matière.

Les notions traitées dans cet ouvrage sont destinées non seulement aux étudiants de fin de licence ou de master en Génie des Procédés, mais à l'ensemble des étudiants de chimie (voire de biologie), quel que soit leur profil et leur niveau universitaire. L'objectif recherché est de leur fournir un support pédagogique, renfermant des notions de cours et des exercices d'application indispensables à la compréhension des techniques suscitées et à leur utilisation de façon judicieuse et efficace dans l'analyse qualitative et quantitative des systèmes chimiques.

AVANT-PROPOS

Pour cela, nous avons essayé, pour chacune des techniques étudiées, d'expliquer son principe, de rappeler les notions théoriques qui la régissent, de présenter l'appareillage utilisé, ses avantages et inconvénients ainsi que ses domaines d'applications. Des références bibliographiques importantes en relation avec chaque technique sont enfin évoquées en fin de chapitres, et des exercices d'application corrigés sont donnés en guise d'illustration.

Ce modeste ouvrage a enfin été élaboré dans le cadre de la préparation de mon habilitation, dans le but d'acquérir le rang magistral et d'être nommé au grade Maître de Conférences classe «A».

CHAPITRE I :
GENERALITES SUR LA SPECTROSCOPIE

I.1. Onde électromagnétique

Une onde électromagnétique est une catégorie d'ondes associée à la propagation d'un champ électrique et d'un champ magnétique, oscillant perpendiculairement l'un à l'autre et à la direction de propagation, et se propageant dans le vide avec une vitesse avoisinant celle de la lumière (environ $3 \cdot 10^8$ km/s) (figure 1).

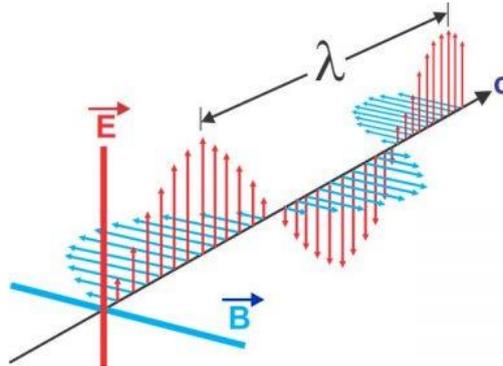


Figure 1 : Propagation du champ électrique et magnétique d'une onde électromagnétique

Une onde électromagnétique est caractérisée par sa :

- **Longueur d'onde (λ)** : distance qui sépare deux oscillations de l'onde (distance séparant deux crêtes successives). Elle est exprimée en mètre ou en l'un de ses sous-multiples (nanomètre, micromètre ou centimètre).
- **Fréquence (ν)** : nombre d'oscillations en une seconde. La fréquence est généralement exprimée en Hertz. Elle est inversement proportionnelle à la longueur d'onde ($\lambda = c / \nu$; c : vitesse de la lumière = $3 \cdot 10^8$ m.s⁻¹).
- **Nombre d'onde ($\bar{\nu}$)** : inverse de la longueur d'onde ($\bar{\nu} = 1 / \lambda$).
- **Période (T)** : temps nécessaire pour que l'onde effectue un cycle. Elle est exprimée en seconde ($T = \lambda / c$)

Les ondes électromagnétiques sont classées en fonction de leur fréquence dans ce que l'on appelle le *spectre électromagnétique*.

I.2. Nature de la lumière

La lumière a un double comportement : selon le contexte, elle se comporte tantôt comme une onde, tantôt comme une particule.

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LA SPECTROSCOPIE

Son caractère ondulatoire a d'abord été proposé par Christian Huygens, en 1690, grâce au principe de Huygens, puis confirmé par Thomas Young en 1801, à travers l'expérience d'interférence de Young. Dans les années 1860, la lumière a enfin été interprétée comme la propagation d'une onde électromagnétique spécifique, dont le physicien écossais James Clerk Maxwell établit une série d'équations différentielles décrivant son comportement.

La nature corpusculaire de la lumière a ensuite été mise en évidence grâce à l'effet photoélectrique, observé en 1887 par le physicien Allemand Heinrich Hertz, et dont Albert Einstein a proposé une explication en 1905, incluant le concept quantique de photon. Avec Albert Einstein, les deux modèles de la lumière, qui se sont souvent opposés, deviennent enfin complémentaires, et coexistent dans le cadre de ce qu'on appelle en physique quantique la *dualité onde / corpuscule*.

La lumière est devenue un phénomène complexe pouvant être modélisé de 2 manières différents : ondulatoire ou corpusculaire, selon les circonstances et les conditions expérimentales.

Selon le modèle ondulatoire, la lumière est une onde électromagnétique associée à la propagation d'un champ électrique (E) et d'un champ magnétique (B), perpendiculaires l'un par rapport à l'autre, et qui se propagent en ligne droite dans le vide ou dans un milieu transparent. Les champs E et B sont liés par les équations de Maxwell, la connaissance de l'un permet de connaître l'autre. L'onde lumineuse, se propageant dans le vide avec une vitesse d'environ $3 \cdot 10^8$ m/s (célérité de la lumière), est caractérisée par une longueur d'onde (λ) correspondant au spectre visible (400 - 800 nm).

Selon le modèle corpusculaire, le rayonnement lumineux peut être assimilé à un flot de grains élémentaires appelés photons, sans masse, transportant chacun un paquet (un quantum) d'énergie proportionnelle à la fréquence (ν) de l'onde électromagnétique considérée, selon la relation :

$$E = h \cdot \nu$$

(h : constante de Planck = $6,625 \cdot 10^{-34}$ J.s)

I.3. Spectre électromagnétique

Le spectre électromagnétique représente la répartition des ondes électromagnétiques selon leurs fréquences (leurs longueurs d'onde) ou l'énergie de leurs photons. Divisé

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LA SPECTROSCOPIE

artificiellement par les scientifiques pour des raisons de commodité, le spectre électromagnétique s'étend de façon continue des rayons gamma (très courtes fréquences, très grandes énergies) aux ondes radio (très grandes longueurs d'onde), en passant par les micro-ondes, l'infrarouge, la lumière visible, l'ultraviolet et les rayons X (figure 2).

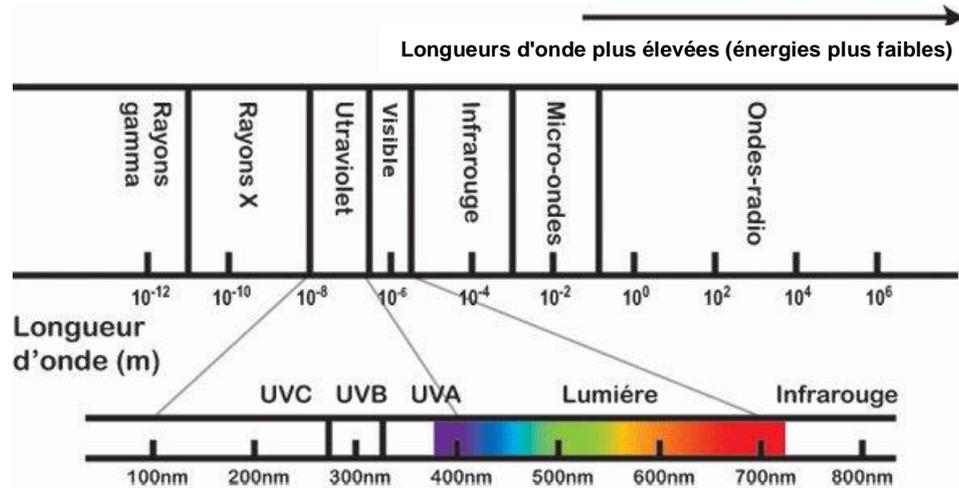


Figure 2 : Différents domaines du spectre électromagnétique par longueurs d'onde

Le domaine du visible, perceptible par l'œil humain, ne concerne qu'une infime partie du spectre électromagnétique (de l'ultraviolet à l'infrarouge), sa gamme de longueurs d'onde étant située entre 400 et 800 nm. Les rayonnements de longueurs d'onde plus courtes que celles du visible (UV, rayons X, rayons gamma) sont potentiellement dangereux, et nécessitent des précautions et des mesures de protection particulières.

Les différents domaines du spectre électromagnétique et leurs limites en longueurs d'onde sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Noms et limites en longueurs d'onde des différents domaines du spectre électromagnétique

Nom du domaine spectral	Longueur d'onde
Gamma - X (dur)	< 0,1 nm
X (mous)	0,1 - 10 nm
Extrême UltraViolet (EUV)	10 - 120 nm
UltraViolet (UV)	120 - 400 nm
Visible	400 - 800 nm
Infra-Rouge (IR)	800nm - 1 mm
Radio	> 1 mm

I.4. Spectroscopie

La spectroscopie est la science qui étudie les interactions entre les différents rayonnements électromagnétiques et la matière (atomes et molécules), ce qui permet d'obtenir des informations sur la composition et les propriétés des substances. Tout comme il y a différents types de rayonnements électromagnétiques, il y a différents types de spectroscopie, caractérisés par le domaine de longueurs d'onde utilisées et par les effets du rayonnement utilisé sur la substance étudiée. Chacune des techniques spectroscopiques utilise une partie différente du spectre électromagnétique, et permet d'extraire diverses informations sur la substance étudiée :

- *Spectroscopie Ultraviolet-Visible (UV-Vis)* : mise en évidence des liaisons multiples et des doublets non liants dans les molécules (analyse qualitative) et détermination de la concentration des substances en solution (analyse quantitative). Domaine spectral :
 - Ultraviolet ($100 \leq \lambda \leq 400$ nm)
 - Visible ($380 \leq \lambda \leq 780$ nm)
- *Spectroscopie Infrarouge (IR)* : identification des groupes fonctionnels dans les molécules organiques. Domaine spectral :
 - Proche infrarouge ($714 \leq \lambda \leq 2500$ nm)
 - Infrarouge moyen ($2500 \leq \lambda \leq 25000$ nm)
 - Infrarouge lointain ($25000 \leq \lambda \leq 10^6$ nm)
- *Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)* : détermination de l'environnement structural des noyaux (C, H,...) et de la structure tridimensionnelle des molécules organiques.
- *Spectroscopie de Masse (SM)* : ionisation des molécules et mesure de leurs masses molaires,
- *Spectroscopie Raman (SR)* : étude des vibrations et des modes de rotation des molécules (complémentaire de la spectroscopie IR).

La combinaison de différentes techniques est nécessaire pour contourner les limitations inhérentes à chacune d'elles, et pour obtenir des informations complémentaires et approfondies sur la matière à l'échelle moléculaire.

I.5. Mouvements moléculaires et énergies

La quantification de l'énergie des molécules (comme celle des atomes) constitue un des principes fondamentaux de la mécanique quantique. Les molécules possèdent un ensemble de niveaux d'énergie discrets ou discontinues (ne pouvant prendre que certaines valeurs).

En plus des niveaux d'énergie associés aux électrons des atomes qui les constituent, les molécules disposent de niveaux d'énergie quantifiés correspondant à leurs mouvements de rotation et de vibration. Beaucoup plus complexe qu'un spectre atomique (spectre de raies), le spectre moléculaire est généralement constitué de groupements de raies caractéristiques appelés bandes, et est souvent qualifié de *spectre de bandes*.

Les différents niveaux d'énergie électronique, de vibration et de rotation sont représentés par le diagramme de la figure 3, dans lequel chaque niveau est schématisé par un trait horizontal.

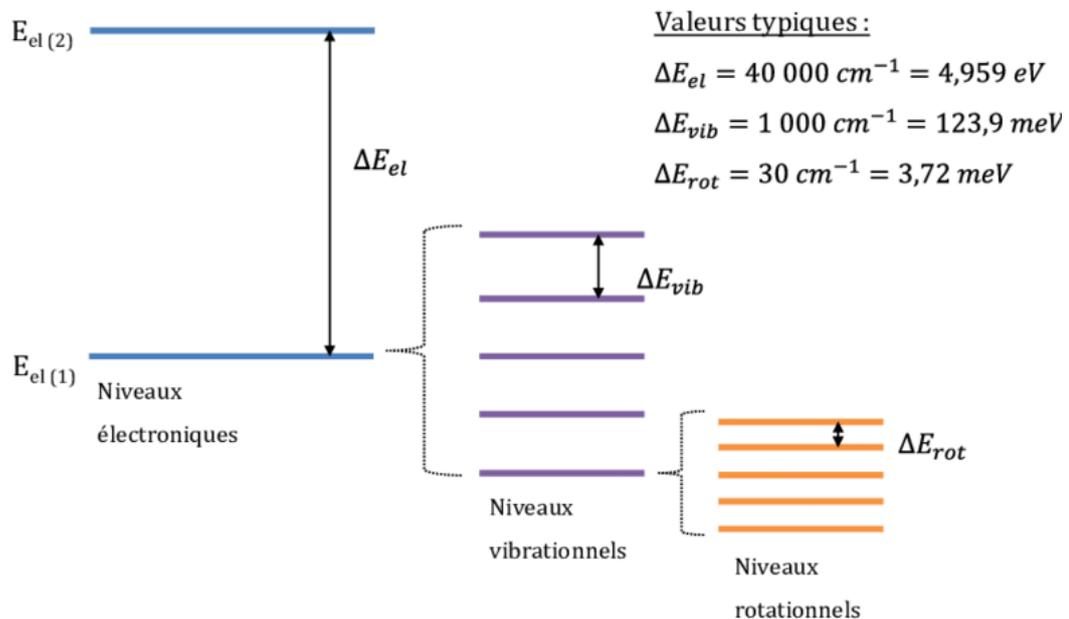


Figure 3 : Diagramme des niveaux d'énergie quantifiés d'une molécule

En spectroscopie, l'énergie totale (E_{tot}) d'une molécule soumise à l'action d'un rayonnement électromagnétique s'écrit sous la forme :

$$\boxed{E_{tot} = E_e + E_v + E_r} \quad (E_e \gg E_v \gg E_r)$$

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LA SPECTROSCOPIE

Où :

- E_e : énergie électronique (résultant des transitions des électrons entre niveaux électroniques),
- E_v : énergie de vibration (vibrations des atomes autour d'une position d'équilibre),
- E_r : énergie de rotation (mouvements de rotation de la molécule autour de son centre d'inertie).

I.6. Interaction matière - rayonnement : absorption et émission

Lorsqu'une molécule est soumise à un rayonnement électromagnétique de fréquence ν (longueur d'onde λ), son énergie passe d'un niveau d'énergie minimale E_1 (état fondamental) vers un niveau d'énergie plus élevée E_2 (état excité). L'absorption de l'onde électromagnétique n'est possible que si l'énergie du photon absorbé est égale à l'écart énergétique ΔE entre les niveaux d'énergie de la molécule :

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h \nu = h c / \lambda$$

- h : constante de Planck = $6,63 \cdot 10^{-34}$ J.s
- c : célérité de la lumière dans le vide = $3 \cdot 10^8$ m.s⁻¹

I.6.1. Absorption

L'énergie du photon absorbé est transmise à un électron de la molécule qui passe alors du niveau d'énergie E_1 au niveau E_2 supérieur : il s'agit d'une excitation de la molécule (qui se met à tourner et à vibrer plus fortement) (figure 4).

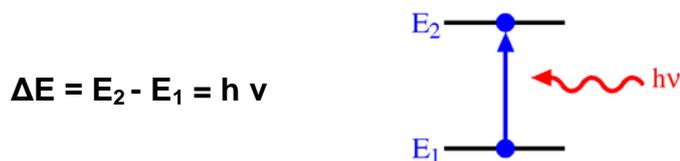


Figure 4 : Processus d'absorption d'un photon par la molécule

I.6.2. Emission

L'électron redescend ensuite du niveau excité E_2 vers le niveau fondamental E_1 et le photon est émis : on parle de désexcitation (relaxation) (figure 5).

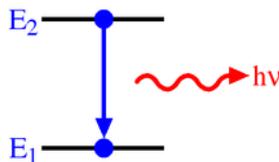


Figure 5 : Processus d'émission d'un photon par la molécule

Les niveaux atteints sont par ordre croissant d'énergie :

- Les niveaux de rotation (domaines des micro-ondes ou de l'IR lointain),
- Les niveaux de vibration (domaine de l'IR),
- Les niveaux électroniques (domaine de l'UV-visible).

I.7. Références bibliographiques

1. Pierre Barchewitz, *Spectroscopie atomique et moléculaire, Partie 2*, Elsevier Masson (1971).

<https://www.decitre.fr/livres/spectroscopie-atomique-et-moleculaire-t2-9782225299643.html>

2. Richard Feynman, *Lumière et matière - Une étrange histoire*, Éditeur : Seuil, Collection : Points Sciences (numéro 86) (1992).

<https://www.chasse-aux-livres.fr/prix/2020147580/lumiere-et-matiere-une-etrange-histoire>

3. Émile Biémont, *Spectroscopie moléculaire : Structures moléculaires et analyse spectrale*, 1^{re} Édition (2008).

<https://www.deboecksuperieur.com/ouvrage/9782804150655-spectroscopie-moleculaire>

4. Manjit Kumar (Traduction de l'anglais : Bernard Sigaud), *Le grand roman de la physique quantique : Einstein, Bohr... et le débat sur la nature de la réalité*, J. C. Lattès (2011).

<https://www.babelio.com/livres/Kumar-Le-grand-roman-de-la-physique-quantique--Einstein/454927/citations>

5. Simon Duckett, Bruce Gilbert et Martin Cockett (Traduction de l'anglais : Maurice Cosandey), *Les fondements de la détermination des structures moléculaires*, Marque EDP Sciences, Collection: Enseignement SUP-Chimie (2017).

<https://excerpts.numilog.com/books/9782759821006.pdf>

CHAPITRE II :
SPECTROSCOPIE UV-Visible

II.1. Rayonnements optiques

Compris entre les rayonnements X et les ondes radioélectriques, les rayonnements optiques sont un intervalle du rayonnement électromagnétique dont la plage des longueurs d'onde s'étend entre 100 nm et 1 mm (10^6 nm). Le spectre des rayonnements optiques se divise en trois plages : le rayonnement ultraviolet (UV) (100 – 400 nm), la lumière visible (Vis) (380 – 780 nm) et le rayonnement infrarouge (IR) (780 nm – 1 mm) (figure 6).

Le rayonnement UV, invisible à l'œil nu, est le plus énergétique. Il se subdivise lui-même en trois plages : UV-A (315 – 400 nm), UV-B (280 – 315 nm) et U-VC (100 – 280 nm). Les UV-C, de plus courtes longueurs d'onde, sont les plus nocifs pour toutes les formes de vie, car les plus énergétiques. Ceux générés par le soleil sont cependant presque totalement absorbés par la couche d'ozone de l'atmosphère, avant d'arriver à la surface de la terre.

Le rayonnement visible, portion très étroite du spectre électromagnétique, est accessible à la perception visuelle humaine. Sa gamme de longueurs d'onde correspond aux couleurs perçues : rouge (627 – 780 nm), orange (589 – 627 nm), jaune (566 – 589 nm), verte (495 – 566 nm), bleue (436 – 495 nm) et violette (380 – 436 nm).

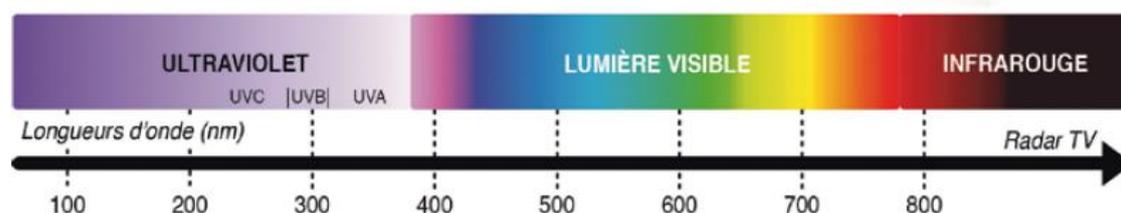


Figure 6 : Spectre des rayonnements optiques

II.2. Spectroscopie ultraviolet-visible (UV-Visible)

Rapide et facile à réaliser, la spectroscopie UV-visible compte parmi les techniques d'analyse les plus anciennes et les plus utilisées dans les laboratoires. Il s'agit d'une méthode non destructive, étant donné que les faibles quantités d'échantillons qu'elle nécessite peuvent être réutilisées pour des analyses ultérieures. Pouvant être utilisée pour des analyses qualitatives et quantitatives, elle permet, entre autres :

- d'accéder à des informations concernant la structure des molécules organiques (présence de liaisons multiples, de doublets non liants, phénomène de conjugaison,...),

CHAPITRE II : SPECTROSCOPIE ULTRAVIOLET-VISIBLE

- de caractériser la structure des composés de coordination (établissement du mode de coordination et de la stœchiométrie des complexes métalliques de transition),
- de réaliser des dosages en solution (détermination des concentrations par utilisation de la loi de Beer-Lambert),
- de décrire l'évolution des réactions chimiques (suivi de réaction et détermination des paramètres cinétiques et thermodynamiques).

La spectroscopie UV-visible est basée sur l'absorption, par une molécule, du rayonnement électromagnétique dont les longueurs d'onde se situent dans le domaine de l'ultraviolet (100 - 400 nm) et du visible (380 - 780 nm). Lors de l'absorption du rayonnement dans cette gamme de longueurs d'onde, les électrons des molécules (ions ou complexes) subissent des transitions électroniques, et passent d'une orbitale moléculaire fondamentale occupée (d'énergie E_1) à une orbitale moléculaire excitée vacante (d'énergie E_2). L'échantillon absorbe alors un photon dont l'énergie correspond à la différence d'énergie entre ces orbitales fondamentale et excitée. Cette énergie peut être exprimée à l'aide de l'équation :

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h \times c / \lambda$$

Avec :

$h = 6,62 \cdot 10^{-34}$ J.s (constante de Planck),

$c = 3 \cdot 10^8$ m/s (vitesse de la lumière),

λ = longueur d'onde (en nm).

Les groupements de la molécule contenant les électrons impliqués dans une transition donnant lieu à une absorption s'appellent *chromophores*.

II.3. Loi de Beer-Lambert

Lorsqu'un faisceau de lumière monochromatique d'intensité I_0 traverse une solution absorbante de concentration C contenue dans une cuve d'épaisseur l , une partie de la lumière est absorbée et le reste est transmis selon une intensité I (figure 7).

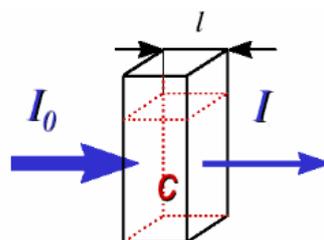


Figure 7 : Schéma illustrant la notion de transmittance

CHAPITRE II : SPECTROSCOPIE ULTRAVIOLET-VISIBLE

On définit alors :

- *L'absorbance (A) (ou densité optique, D.O)* comme étant la quantité de lumière absorbée par la solution :

$$\mathbf{A = \log (I / I_0) = - \log T}$$

(I_0 et I : intensités de la lumière incidente et transmise, respectivement).

- *La transmittance (T)* comme étant la quantité de lumière traversant la solution :

$$\mathbf{T = I / I_0 \quad (\text{ou } \% T = I / I_0 \times 100)}$$

La loi de Beer-Lambert établit que l'absorbance d'une solution est proportionnelle à sa concentration (c) et à la longueur (l) du trajet optique (trajet parcouru par la lumière dans la solution) :

$$\mathbf{A = \epsilon \cdot l \cdot c}$$

- ϵ : coefficient d'extinction molaire (ou absorptivité molaire) de l'espèce absorbante ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$),
- l : longueur du trajet optique (cm),
- c : concentration de l'espèce absorbante ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

Le coefficient d'extinction molaire (ϵ) est une constante physique qui dépend de la nature de la substance, de la longueur d'onde de la lumière (λ), de la nature du solvant et de la température.

II.3.1. Validité de la loi de Beer-Lambert

La loi de Beer-Lambert n'est valable que dans le cas :

- d'une lumière incidente monochromatique,
- d'une solution suffisamment diluée ($c < 10^{-2} \text{ M}$), pour que les interactions entre molécules soient négligeables,
- d'une solution limpide (ni fluorescente ni hétérogène),
- d'une absence d'interactions soluté-solvant.

II.3.2. Additivité de la loi de Beer-Lambert

Dans le cas d'une solution contenant plusieurs espèces absorbantes, à une longueur

CHAPITRE II : SPECTROSCOPIE ULTRAVIOLET-VISIBLE

d'onde donnée, l'absorbance de la solution est la somme des absorbances de chacune de ses molécules :

$$A = \sum_{i=1}^n A_i(\varepsilon_{\lambda,i}, \ell, C_i)$$

II.4. Spectrophotomètres UV-visible

Le spectrophotomètre a été inventé en 1940 par *Arnold J. Beckman* et ses collaborateurs de laboratoires nationaux des Technologies de la société Beckman. D'une manière générale, un spectrophotomètre est constitué de quatre éléments essentiels :

- Une source de lumière monochromatique (visible : lampe à filament de tungstène ; UV : lampe à décharge au deutérium),
- Un monochromateur pour sélectionner la longueur d'onde désirée (prisme, réseau ou filtre coloré),
- Une cuve pour contenir la solution à analyser (visible : verre ; UV : quartz),
- Un détecteur pour mesurer l'intensité de la lumière transmise (Photomultiplicateur ou photopiles).

Le principe de fonctionnement du spectrophotomètre UV-visible est basé sur la loi de Beer-Lambert, qui établit une relation entre la concentration d'une substance en solution et l'absorbance de la lumière qui la traverse. L'appareil mesure l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée. Il réalise une mesure de l'intensité de la lumière qu'il reçoit, une fois celle-ci passée à travers une cuve contenant la solution à étudier. À partir de l'intensité de la lumière monochromatique émise (I_0) et d'après la mesure de l'intensité de la lumière transmise (I), l'appareil calcule l'absorbance (A) selon la formule $A = \log(I / I_0)$.

Il existe actuellement sur le marché des spectromètres UV-visible monofaisceau ou double faisceau, les seconds étant beaucoup plus précis et plus chers.

- **Spectrophotomètre monofaisceau** (figure 8) :

L'utilisation d'un spectrophotomètre monofaisceau exige un pré-réglage :

- ✓ *Choix de la longueur d'onde de travail :*

CHAPITRE II : SPECTROSCOPIE ULTRAVIOLET-VISIBLE

Le spectrophotomètre doit être réglé à la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorbance de la solution étudiée, pour une plus grande précision et une plus grande sensibilité des mesures.

✓ *Réglage du blanc :*

Le solvant et les réactifs utilisés n'étant pas toujours transparents, il est obligatoire de réaliser un « blanc », c'est-à-dire une mise à zéro du dispositif, en ne plaçant que le solvant et le(s) réactif(s) utilisé(s) dans la cuve, avant la mesure de la cuve contenant l'échantillon, et ce pour chaque longueur d'onde étudiée.

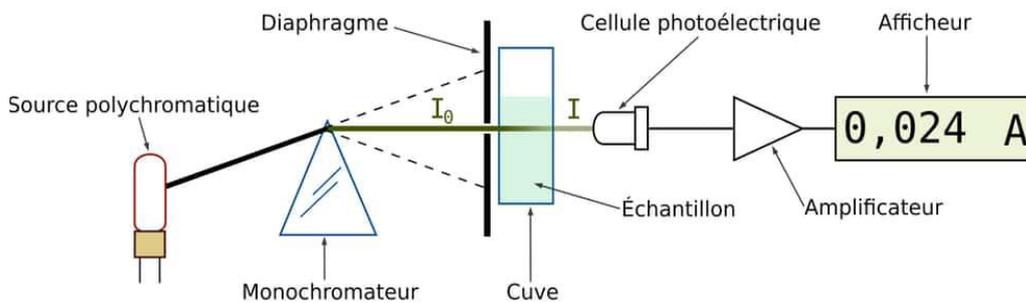


Figure 8 : Schéma de principe d'un spectrophotomètre monofaisceau

• **Spectrophotomètre double faisceau** (figure 9) :

Dans ce type de spectrophotomètre (par ailleurs identique au monofaisceau), il y a deux compartiments : l'un pour placer l'échantillon (cuve de mesure) et l'autre pour placer une référence (cuve de référence contenant le blanc : le solvant).

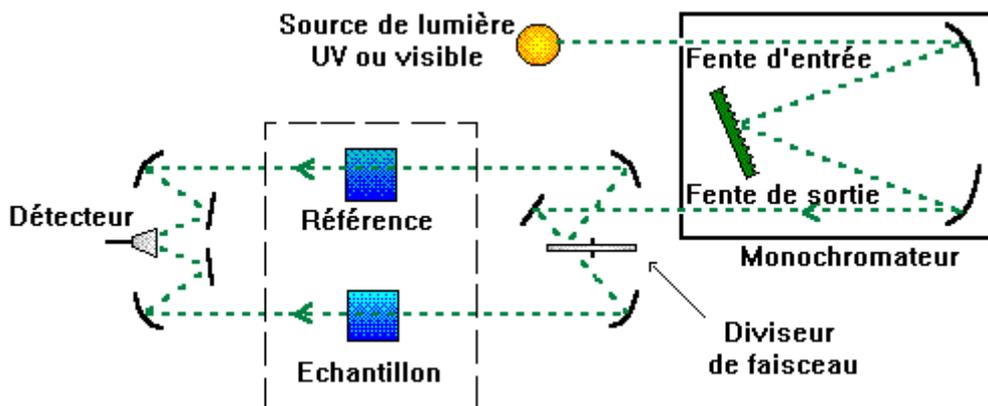


Figure 9 : Schéma de principe d'un spectrophotomètre à double faisceau

CHAPITRE II : SPECTROSCOPIE ULTRAVIOLET-VISIBLE

Le faisceau arrive alternativement sur la cuve de référence (donne l'intensité I_0) et sur la cuve de mesure (mesure de I). La chaîne de mesure détermine I / I_0 et calcule le logarithme afin de donner directement l'absorbance $A = \log I / I_0$. Un miroir semi-transparent ou un miroir tournant envoie le faisceau tantôt d'un côté tantôt de l'autre (cela va très vite : 60 mesures/s).

II.5. Allure du spectre d'absorption

Le spectre d'absorption UV-visible représente généralement le tracé de l'absorbance (A) en fonction de la longueur d'onde (λ en nm) (figure 10). Pour les molécules en solution, les spectres UV-visibles sont continus et se présentent sous forme d'une série de bandes plus ou moins larges, les interactions avec les solvants masquant les structures fines observées en phase gazeuse. La bande d'absorption est caractérisée par sa longueur d'onde λ_{\max} (en nm) et par son coefficient d'extinction molaire (ϵ) qui traduit son intensité. λ_{\max} correspond à la longueur d'onde de la radiation qui provoque la transition électronique et le coefficient d'extinction molaire (ϵ) (l'intensité) est lié au moment dipolaire, sa valeur permettant de savoir si la transition est permise ou interdite.

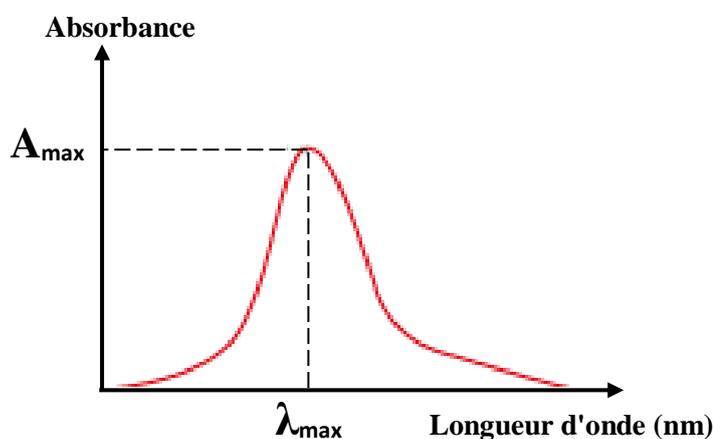


Figure 10 : Allure d'un spectre d'absorption UV-visible

II.6. Règles de sélection

L'absorption, par une molécule, d'un photon dans les domaines UV ou visible, provoque, selon l'énergie du photon absorbé, l'excitation d'un électron et sa transition du niveau fondamental vers un niveau excité d'énergie supérieure. Cependant, toutes les

CHAPITRE II : SPECTROSCOPIE ULTRAVIOLET-VISIBLE

transitions électroniques énergétiquement possibles ne sont pas permises, mais obéissent à des *règles de sélection*. Selon ces règles, seules sont permises :

- Les transitions qui provoquent une variation du moment dipolaire électrique,
- Celles dont les orbitales impliquées sont telles que $\Delta l = \pm 1$ et $\Delta S = 0$ (les transitions ont lieu entre les orbitales de même spin et de symétrie différente).

Les transitions électroniques interdites peuvent cependant avoir lieu, mais les bandes correspondantes seront faiblement intenses.

II.7. Transitions électroniques

II.7.1. Transitions électroniques dans les composés organiques

Dans le cas des composés organiques, les transitions électroniques permises correspondent au passage des électrons des orbitales moléculaires liantes (σ et π) et non liantes (n) occupées, vers des orbitales moléculaires antiliantes (σ^* et π^*) vacantes (figure 11).

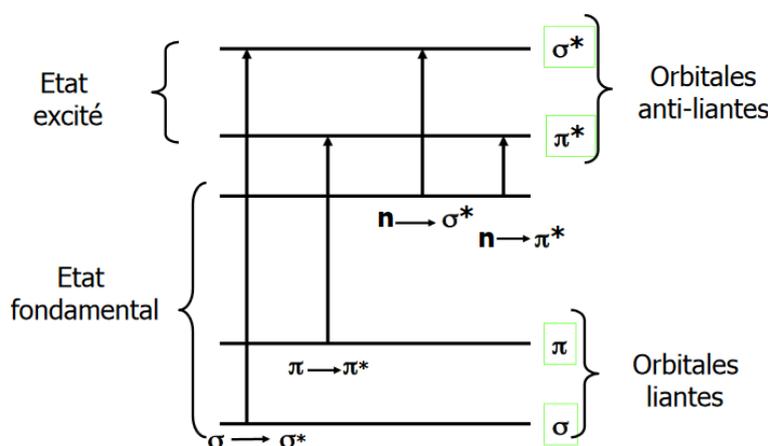


Figure 11 : Diagramme des transitions possibles dans les composés organiques

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

Ce genre de transition est observé dans les alcanes (molécules ne possédant que des liaisons σ simples : C-H ou C-C). Du fait de la grande stabilité des liaisons σ , la transition d'un électron d'une OM liante σ vers une OM antiliante σ^* nécessite une énergie importante et engendre une bande intense située dans l'UV lointain, à des longueurs d'onde inférieures à 200 nm (transition impossible à observer sur un spectre UV-visible).

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

Cette transition, impliquant le passage d'un électron d'une orbitale π liante à une orbitale π^* non liante, est observable dans les composés possédant des groupements fonctionnels insaturés (orbitales π des doubles et triples liaisons). Elle conduit à une bande intense car énergétiquement favorable (différence d'énergie faible). La valeur de la longueur d'onde maximale d'absorption est déterminée par l'environnement de la liaison multiple. λ_{\max} est située entre 165 et 200 nm dans les composés possédant une liaison multiple isolée ($C=C$; $C\equiv C$; $C=O$; ...) et est supérieure à 200 nm dans les molécules conjuguées (butadiène ; hexatriène ; β -carotène ; ...). Le coefficient d'absorption molaire (ϵ) est souvent supérieur à 10 000.

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

Cette transition résulte du passage d'un électron d'une OM non-liante n à une OM antiliante π^* . Considérée comme interdite, elle nécessite beaucoup moins d'énergie que la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ (longueur d'onde plus élevée) et conduit à une plus faible bande d'absorption. Elle est observée dans les chromophores comportant un hétéroatome porteur de doublets électroniques libres appartenant à un système insaturé ($C=O$; $C=S$; $N=O$).

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

Observée dans les molécules saturées contenant des hétéroatomes avec des doublets libres non conjugués (alcools, éthers, amines et dérivés halogénés), cette transition correspond au passage d'un électron du doublet n vers l'orbitale σ^* . Elle nécessite une énergie élevée et donne une bande d'intensité moyenne située à la limite du proche-UV (longueurs d'onde voisines de 200 nm).

II.7.2. Transitions électroniques dans les complexes des métaux de transition

- **Transitions $d \rightarrow d$:**

Les transitions électroniques entre orbitales d se rencontrent dans les complexes des métaux de transition. Selon la théorie du champ cristallin, les cinq orbitales d de l'ion métallique, possédant initialement la même énergie (orbitales dégénérées), sont perturbées par l'approche des ligands et subissent une levée de dégénérescence (éclatement du champ cristallin). Cet éclatement dépend de la nature de l'ion métallique, de son degré d'oxydation, du nombre et de la nature des ligands, ainsi que de la géométrie du complexe.

CHAPITRE II : SPECTROSCOPIE ULTRAVIOLET-VISIBLE

Dans le cas d'un complexe octaédrique par exemple, tel que le complexe $[\text{Ti}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$, l'approche des six ligands fait éclater les cinq orbitales d en deux groupes : un groupe t_{2g} (constitué par les trois orbitales d_{xy} , d_{xz} et d_{yz}) de basse énergie et un groupe e_g (constitué par les deux orbitales $d_{x^2-y^2}$ et d_{z^2}) d'énergie plus élevée, séparés par une énergie Δ_0 dite éclatement du champ cristallin (figure 12).

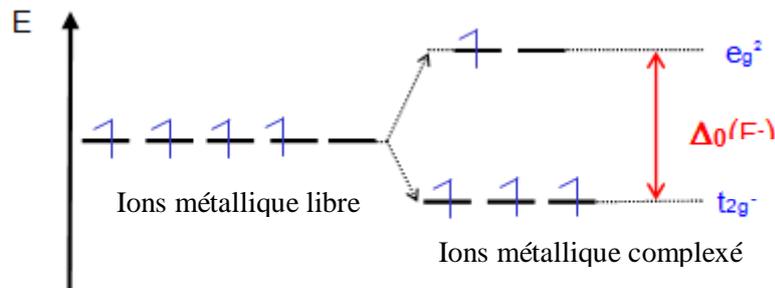


Figure 12 : Dédoublément des orbitales d dans un champ octaédrique

L'absorption par le complexe d'un rayonnement dans le visible (entre 400 et 800 nm) permet à l'électron unique du complexe métallique, situé initialement dans une des trois orbitales t_{2g} , de passer dans une des deux orbitales e_g . On parle de transition d-d, générant une bande d'absorption centrée à environ 510 nm caractéristique du complexe $[\text{Ti}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ de couleur violet-rouge (figure 13).

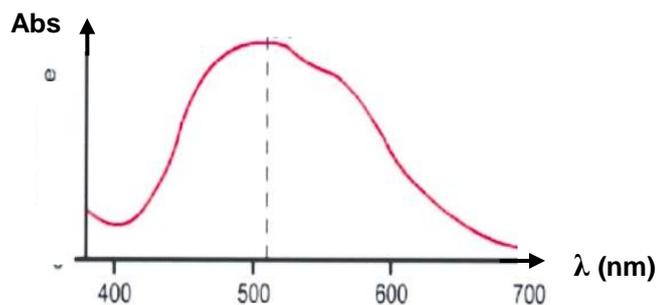


Figure 13 : Bande d'absorption du complexe $[\text{Ti}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ dans le domaine du visible

D'autres formes de champs cristallins se retrouvent dans une multitude d'autres complexes métalliques dotés de géométries différentes (tétraédrique, tétraédrique, plan carré...). Les répartitions des orbitales d dans ces complexes permettent différents types de transitions d-d, qui leur confèrent des couleurs et des modes d'absorption divers dans le

domaine du visible. Les coefficients d'extinction molaires, souvent très faibles, varient entre 0.5 et 100 L. mol⁻¹. cm⁻¹.

Outre la théorie du champ cristallin, d'autres théories, telles que la théorie des liaisons de valence et celle des orbitales moléculaires régissent les complexes métalliques et essaient d'expliquer leurs structures électroniques, la nature de leurs liaisons, leurs propriétés physico-chimiques, les niveaux d'énergie de leurs orbitales d, ainsi que leurs spectres d'absorption dans le domaine UV-visible.

II.8. Facteurs influençant les transition électroniques

II.8.1. Terminologie

- **Groupement chromophore :**

Les chromophores sont des groupements fonctionnels qui, au sein de la molécule, permettent l'absorption de certaines longueurs d'onde dans le domaine de l'ultraviolet, et qui sont responsables de sa couleur. Il s'agit principalement de doubles et triples liaisons carbone-carbone, de systèmes aromatiques, du groupe carbonyle, des liaisons imino (C=N), diazo (N=N), nitro et CY (Y étant un hétéroatome).

- **Groupement auxochrome :**

Un auxochrome est un groupement fonctionnel saturé, qui n'absorbe pas de lui-même dans l'ultraviolet, mais qui, lié à un chromophore, augmente la délocalisation électronique, ce qui a pour effet d'augmenter la longueur d'onde (λ_{\max}) et l'intensité de sa bande d'absorption (ϵ) (Ex. : -OH ; -OR ; -NH₂ ; -NR₂...) (figure 14).

- **Effet bathochrome :**

Déplacement des bandes d'absorption vers les grandes longueurs d'onde dû à une substitution ou à un effet de solvant ($\lambda \uparrow$).

- **Effet hypsochrome :**

Déplacement des bandes d'absorption vers les courtes longueurs d'onde dû à une substitution ou à un effet de solvant ($\lambda \downarrow$).

- **Effet hyperchrome :**

Augmentation de l'intensité d'absorption ($\epsilon \uparrow$).

- **Effet hypochrome :**

Diminution de l'intensité d'absorption ($\epsilon \downarrow$).

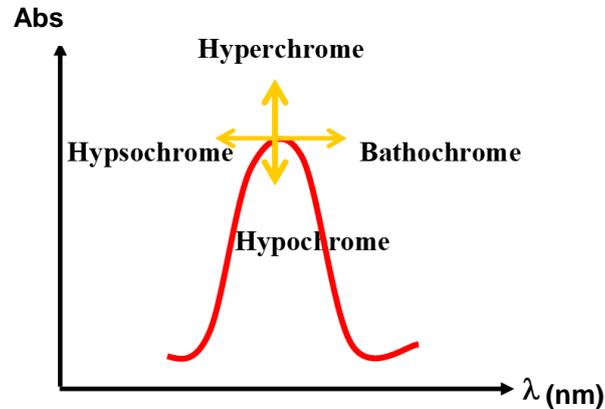
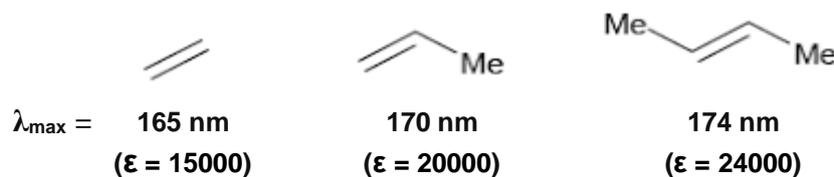


Figure 14 : Différents effets sur la bande d'absorption du chromophore

II.8.2. Effet de la substitution

- La présence de substituants alkyles électrodonneurs sur un groupe éthylénique provoque un déplacement de la position de la bande d'absorption due à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ vers le visible (effet bathochrome). Ce décalage est d'autant plus grand que le nombre de substituants est élevé (il est le plus marqué dans les éthyléniques tri et tétraalkylés) :



- Les substituants électroattracteurs quant à eux (halogènes, groupes nitro, nitrile,...) provoquent une diminution de la longueur d'onde d'absorption maximale (effet hypochrome).
- Les groupes auxochromes (halogènes, -OH, -SH, -OR, -NH₂,...) portés par les chromophores de type C=C ou C=O, participent à la résonance à travers leurs doublets libres, augmentent la conjugaison et engendrent des effets bathochrome et hyperchrome (augmentation de la longueur d'onde maximale et de l'intensité de la bande d'absorption).

II.8.3. Effet de la conjugaison

- Dans un composé éthylénique, la conjugaison des liaisons multiples et des doublets libres entraîne la délocalisation des électrons π , ce qui conduit à un resserrement des niveaux d'énergie et à un accroissement de la longueur d'onde d'absorption maximale (effet bathochrome) (figure 15) :

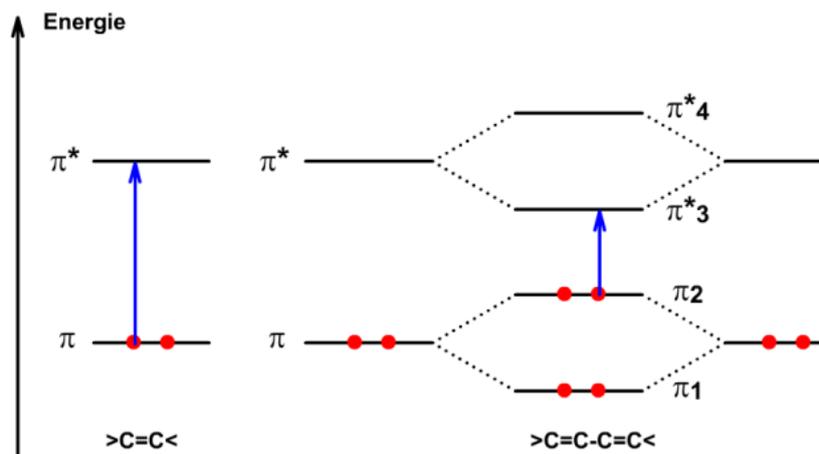
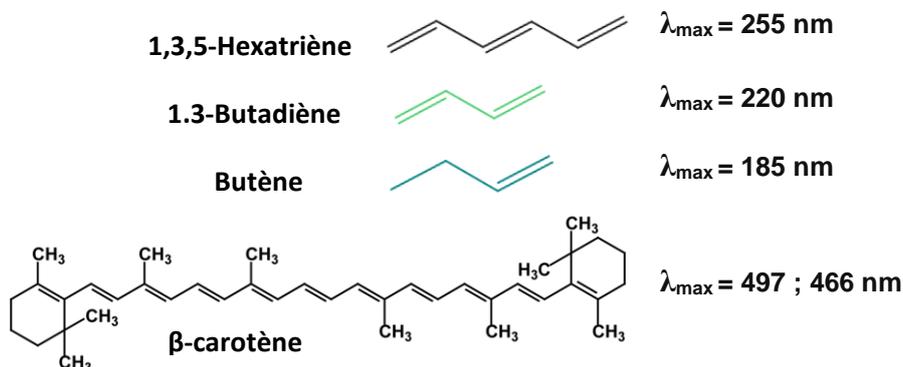


Figure 15 : Resserrement des niveaux d'énergie dû au phénomène de conjugaison

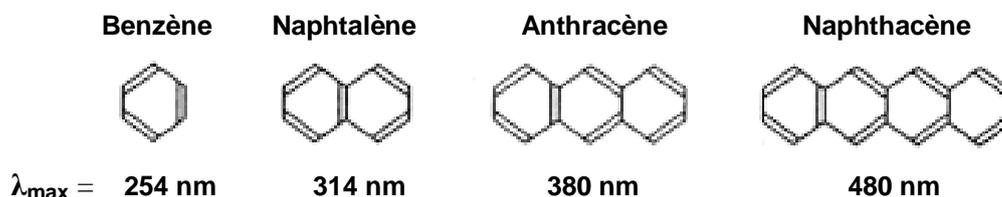
- Les polyènes linéaires renfermant un nombre suffisamment élevé de liaisons multiples conjuguées (7 liaisons doubles et plus) absorbent même dans le visible. Le β -carotène contenant 11 liaisons C=C conjuguées absorbe dans le bleu ($\lambda_{\max} = 497$ et 466 nm dans le chloroforme), ce qui lui confère une couleur orangée :



- Les spectres UV des composés aromatiques présentent plusieurs transitions $\pi \rightarrow \pi^*$. Le spectre du benzène présente 3 bandes d'absorption : $\lambda_{\max} = 254$ nm ($\epsilon = 200$) ; $\lambda_{\max} = 203$ nm ($\epsilon = 7900$) et $\lambda_{\max} = 184$ nm ($\epsilon = 60000$).

CHAPITRE II : SPECTROSCOPIE ULTRAVIOLET-VISIBLE

- Pour les hydrocarbures aromatiques polycycliques (naphtalène, anthracène, naphthacène...), plus le nombre de cycles condensés augmente, plus l'absorption se déplace vers les grandes longueurs d'onde, jusqu'à atteindre la région du visible, et l'intensité des bandes est accrue :



II.8.4. Effet de la conformation

Lorsque le chromophore est un système diénique conjugué, la position de la bande d'absorption due à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ est différente selon que la conformation du diène est *s-cis* ou *s-trans*. Dans le cas du buta-1,3-diène par exemple, les longueurs d'onde d'absorption maximales sont de 214 et 253 nm pour les conformères *s-trans* et *s-cis*, respectivement :



Le coefficient d'extinction molaire est généralement plus élevé pour un dérivé *s-trans* que pour un dérivé *s-cis*.

II.8.5. Effet de solvant

La polarité du solvant modifie l'espacement des niveaux d'énergie $n \rightarrow \pi^*$ et $\pi \rightarrow \pi^*$, ce qui a pour conséquence d'affecter la position, l'intensité et la forme des bandes d'absorption des composés en solution :

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

La stabilisation des électrons n du soluté par formation de liaison hydrogène avec le solvant polaire augmente l'écart énergétique avec le niveau π^* et diminue la longueur d'onde : λ diminue par augmentation de la polarité du solvant (effet hypsochrome) (figure 16).



Figure 16 : Effet de la polarité du solvant sur la transition $n \rightarrow \pi^*$

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

En présence d'un solvant polaire, l'orbitale π^* , plus polaire, est plus stabilisée que l'orbitale π , ce qui diminue l'écart énergétique avec le niveau fondamental et augmente la longueur d'onde : λ augmente par augmentation de la polarité du solvant (effet bathochrome) (figure 17).

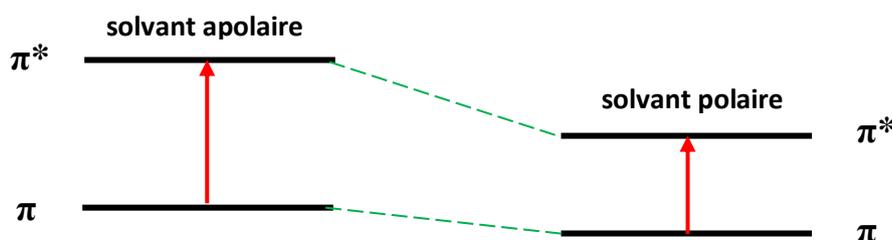


Figure 17 : Effet de la polarité du solvant sur la transition $\pi \rightarrow \pi^*$

II.9. Spectre d'absorption et couleur d'une solution

En spectroscopie UV-visible, un composé est caractérisé par la longueur d'onde d'absorption maximale (λ_{\max}) et par le coefficient d'extinction molaire (ϵ) correspondant. La longueur d'onde du maximum d'absorbance permet d'avoir une idée de la couleur, en se référant au cercle chromatique. Si le maximum d'absorbance correspond à une longueur d'onde appartenant au domaine ultraviolet (200 - 400 nm), le composé est incolore. Si λ_{\max} appartient au domaine du visible (400 - 800 nm), le composé possède la couleur complémentaire de celle correspondant à λ_{\max} .

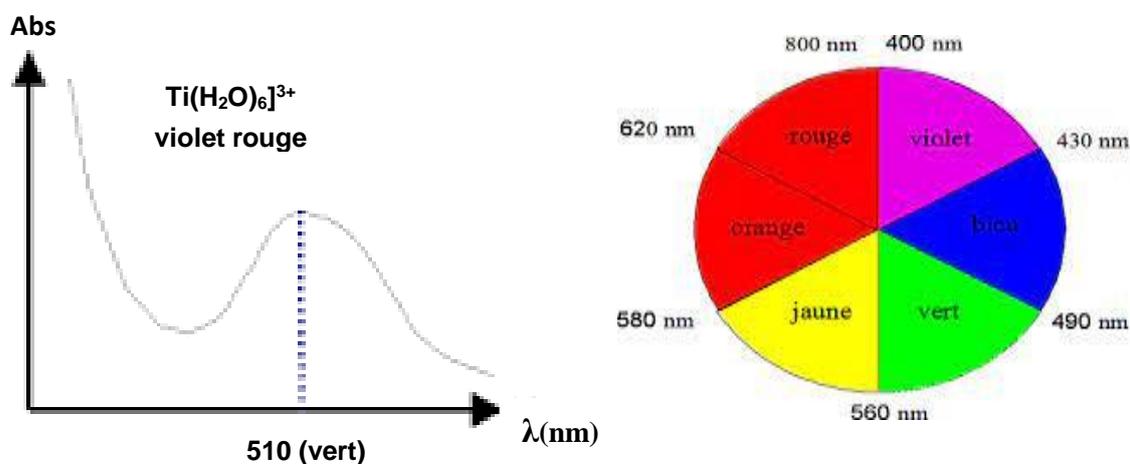


Figure 18 : Spectre d'absorption et couleur de l'ion complexe $Ti(H_2O)_6]^{3+}$

CHAPITRE II : SPECTROSCOPIE ULTRAVIOLET-VISIBLE

A titre d'exemple, le spectre d'absorption de l'ion complexe $\text{Ti}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ présente une bande d'absorption unique autour de 510 nm (région verte du spectre visible). Il apparaît donc à l'œil comme étant violet-rouge (couleur complémentaire sur le cercle chromatique) (figure 18).

II.10. Références bibliographiques

1. *UV-VIS Spectroscopy and its Applications*, H. H. Perkampus, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (1992). doi: 10.1007/978-3-642-77477-5

2. *Fundamentals of Modern UV-Visible Spectroscopy*, T. Owen, Hewlett-Packard, 142 pages (1996).

<https://www.amazon.com/Fundamentals-Modern-UV-Visible-Spectroscopy-Primer/dp/B000GLC90M>

3. *UV/Visible Spectroscopy Absorption Spectroscopy*, U. Sahoo, A. Seth and R. Chawla, LAP LAMBERT Academic Publishing, 1st Edition (2012).

<https://www.perlego.com/book/3362058/uv-visible-spectroscopy-absorption-spectroscopy-pdf>

4. *UV-Vis Spectroscopy*, Chen, Zhebo, Todd G. Deutsch, Huyen N. Dinh, Kazunari Domen, Keith Emery, Arnold J. Forman, Nicolas Gaillard et al., In SpringerBriefs in Energy, 49–62. New York, NY: Springer New York (2013). doi: 10.1007/978-1-4614-8298-7_5

5. *Text book for UV-Visible Spectroscopy*, A. S. Birajdar, Mahipublication (2019).

<https://www.amazon.in/UV-VISIBLE-SPECTROSCOPY-ARUNADEVI-SHANTAPPA-BIRAJDAR/dp/8194091276>

II.11. Exercices d'application

Exercice 1 :

1. a) Comment peut-on obtenir des spectres d'absorption moléculaires UV-visible ?
b) Quelles informations utiles apporte le spectre électronique d'une molécule ?
2. Quelles sont les transitions électroniques rencontrées dans les molécules organiques ? Classez-les par ordres d'énergies et de longueurs d'onde croissants
3. Qu'appelle-t-on effet hypochrome et effet hypsochrome ?

CHAPITRE II : SPECTROSCOPIE ULTRAVIOLET-VISIBLE

Exercice 2 :

Quelles sont toutes les transitions électroniques possibles pour les molécules suivantes :
 CH_4 ; CH_3Cl ; $\text{H}_2\text{C}=\text{O}$

Exercice 3 :

Le spectre UV de l'acétone présente deux bandes d'absorption à :

$$\lambda_{\text{max}} = 280 \text{ nm} (\epsilon_{\text{max}} = 15) \text{ et } \lambda_{\text{max}} = 190 \text{ nm} (\epsilon_{\text{max}} = 100).$$

Identifiez la transition électronique de chacune des deux bandes. Quelle est la plus intense ?

Exercice 4 :

On remplit une cuve de 2 mm avec une solution de benzène de concentration $10^{-5} \text{ mol. L}^{-1}$. Le spectre UV-visible de cette solution montre une bande à la longueur d'onde de 256 nm.

1. Sachant que la transmittance de l'échantillon est de 48 %, calculer le coefficient d'extinction molaire du benzène à 256 nm.

2. Quelle sera à 256 nm l'absorbance du même échantillon placé dans une cuve de 4 mm ?

Exercice 5 :

1. Calculez le ϵ_{max} d'un composé dont l'absorption maximale (A) est de 1,2. La longueur de la cellule est 1 cm, la concentration est 1,9 mg par 25 ml de solution et la masse moléculaire du composé est de 100 g. mol^{-1} .

2. Calculer le coefficient d'absorption molaire d'une solution de concentration 10^{-4} M , placée dans une cuve de 2 cm, avec $I_0 = 85,4$ et $I = 20,3$.

Exercice 6 :

100 mL d'une solution mère (S) de sulfate de nickel(II), de concentration $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$, est préparée par dissolution d'une masse m de sulfate de nickel(II) heptahydraté $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. A partir de cette solution mère on prépare cinq solution filles en introduisant un volume X (mL) de la solution S dans des fioles jaugées de 50 mL et en complétant avec de l'eau distillée

CHAPITRE II : SPECTROSCOPIE ULTRAVIOLET-VISIBLE

jusqu'au trait de jauge. La mesure de l'absorbance des solutions filles, avec une cuve d'épaisseur $b = 1 \text{ cm}$, a donné les résultats suivants :

X (ml)	5	10	15	20	25
$C_{\text{Sol. filles}} \text{ (mol. L}^{-1}\text{)}$					
Abs	0.217	0.415	0.640	0.855	1.100

1. Quelle est la masse de $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ qu'il a fallu peser pour obtenir la solution S.

On donne : $M(\text{Ni}) = 58,7 \text{ g. mol}^{-1}$; $M(\text{S}) = 32,1 \text{ g. mol}^{-1}$.

2. Déterminer la longueur d'onde maximale. Calculer l'énergie correspondante.

3. Compléter le tableau, en donnant un exemple de calcul.

4. Tracer $A = f(C)$. En déduire le coefficient d'absorption molaire dans les conditions de mesure.

Exercice 7 :

On étudie l'absorption de la lumière par une solution renfermant deux composés A et B. Leurs masses molaires sont respectivement $M_A = 200 \text{ g. mol}^{-1}$ et $M_B = 400 \text{ g. mol}^{-1}$.

Dans la solution la concentration en A est de $0,05 \text{ g. L}^{-1}$ et celle en B est de $0,06 \text{ g. L}^{-1}$.

Les coefficients d'extinction molaire sont :

Pour A : $\epsilon_{500} = 500 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{450} = 1000 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Pour B : $\epsilon_{500} = 2000 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{450} = 3000 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

L'épaisseur de la cuve est de 1 cm .

Quelle sera l'absorbance de la solution à deux longueurs d'onde : 500 nm et 450 nm ?

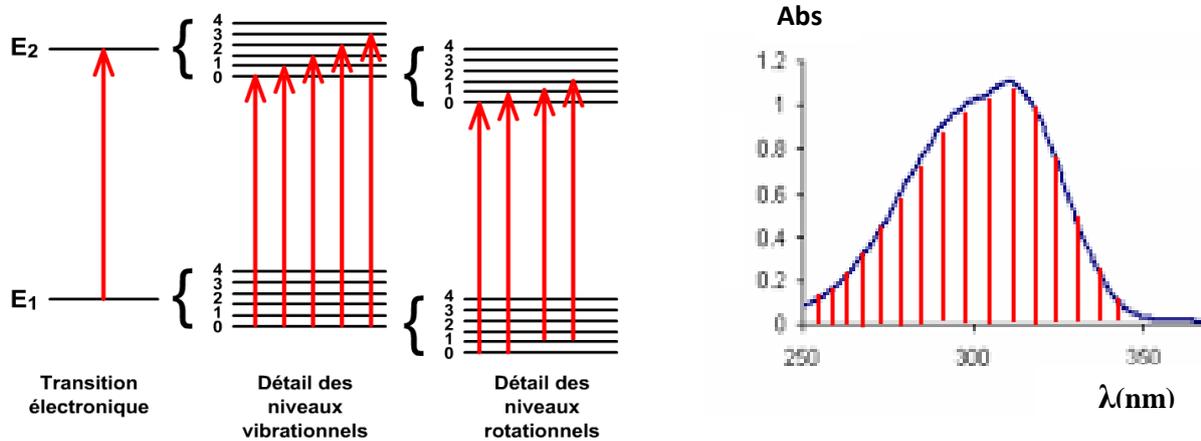
II.12. Corrigé des exercices

Exercice 1 :

1. a) Lors de l'absorption, par une molécule, du rayonnement électromagnétique dont la longueur d'onde se situe dans le domaine de l'ultraviolet et du visible, les électrons de la molécule subissent des sauts électroniques, et passent d'une orbitale moléculaire fondamentale occupée (de basse énergie) à une orbitale moléculaire excitée vacante (d'énergie plus élevée). Ces sauts électroniques induisent de nombreuses transitions vibrationnelles et

CHAPITRE II : SPECTROSCOPIE ULTRAVIOLET-VISIBLE

rotationnelles conduisant à un spectre constitué d'une succession de raies serrées les unes aux autres (spectre de bandes).

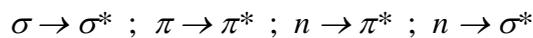


b) Informations utiles apportées par le spectre électronique d'une molécule :

Un spectre UV-visible permet :

- de confirmer la structure d'une molécule et d'indiquer la présence de chromophores,
- de révéler le phénomène de conjugaison dans la molécule, à travers le déplacement des bandes vers le rouge (effet bathochrome),
- de déterminer la couleur de la solution,
- de déterminer la concentration d'une substance dans une solution, en se basant sur l'absorbance de la lumière à différentes longueurs d'onde.

2. Transitions électroniques rencontrées dans les molécules organiques :



Classement par ordres d'énergies et de longueurs d'onde croissants :

$$E_{\sigma \rightarrow \sigma^*} > E_{n \rightarrow \sigma^*} > E_{\pi \rightarrow \pi^*} > E_{n \rightarrow \pi^*}$$

$$E = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda \quad (E \uparrow \quad \lambda \downarrow)$$

$$\underbrace{\lambda_{\sigma \rightarrow \sigma^*}} < \underbrace{\lambda_{n \rightarrow \sigma^*}} < \underbrace{\lambda_{\pi \rightarrow \pi^*} < \lambda_{n \rightarrow \pi^*}}$$

Observable dans : l'UV lointain le Proche UV l'UV

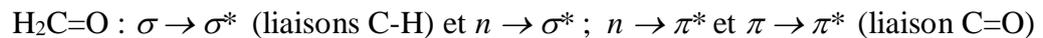
3. *Effet bathochrome* : Déplacement des bandes d'absorption vers les grandes longueurs d'onde dû à une substitution ou à un effet de solvant ($\lambda \uparrow$).

CHAPITRE II : SPECTROSCOPIE ULTRAVIOLET-VISIBLE

Effet hypsochrome : Déplacement des bandes d'absorption vers les courtes longueurs d'onde dû à une substitution ou à un effet de solvant ($\lambda \downarrow$).

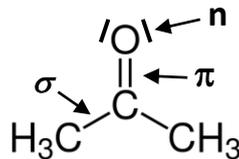
Exercice 2 :

Les transitions électroniques possibles pour les molécules suivantes :



Exercice 3 :

Identification des transitions électroniques des deux bandes de l'acétone :



$\lambda = 280 \text{ nm} : n \rightarrow \pi^*$ et $\lambda = 190 \text{ nm} : \pi \rightarrow \pi^*$

La transition la plus intense est la $\pi \rightarrow \pi^*$

Exercice 4 :

$l = 2 \text{ mm}$; $c = 10^{-5} \text{ mol. L}^{-1}$; $\lambda = 256 \text{ nm}$

1. Calcul du coefficient d'extinction molaire (ϵ) :

$T = 48 \% = 0,48$

$A = -\log T = -\log 0,48 \rightarrow A = 0,32$

$A = \epsilon \cdot l \cdot c \rightarrow \epsilon = A / l \cdot c = 0,32 / 0,2 \cdot 10^{-5} \rightarrow \epsilon = 1,6 \cdot 10^5 \text{ L. mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

2. Calcul de l'absorbance :

$l = 4 \text{ mm}$; $\lambda = 256 \text{ nm}$; $\epsilon = 1,6 \cdot 10^5 \text{ L. mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$A = \epsilon \cdot l \cdot c = 1,6 \cdot 10^5 \cdot 0,4 \cdot 10^{-5} \rightarrow A = 0,64$

(Quand l'épaisseur de la cuve double, l'absorbance double)

CHAPITRE II : SPECTROSCOPIE ULTRAVIOLET-VISIBLE

Exercice 5 :

1. Calcul de ϵ_{\max} :

On applique la loi de Beer Lambert : $A = \epsilon \cdot l \cdot c$

Concentration massique (c_m) = 1,9 mg / 25 ml de solution = 0,076 g. L⁻¹

Concentration molaire : $c = c_m / M = 0,076 / 100 \rightarrow c = 7,6 \cdot 10^{-4}$

$\epsilon_{\max} = A / c \cdot l = 1,2 / 7,6 \cdot 10^{-4} \cdot 1 \rightarrow \epsilon_{\max} = 1579 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

2. Coefficient d'absorption molaire ($c = 10^{-4} \text{ M}$; $l = 2 \text{ cm}$; $I_0 = 85,4$ et $I = 20,3$) :

$A = \epsilon \cdot l \cdot c = \log (I_0 / I) = \log (85,4 / 20,3) = 0.623$

$\epsilon = A / l \cdot c = 0.623 / 2 \cdot 10^{-4} \rightarrow \epsilon = 3115 \text{ L. mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Exercice 6 :

1. Masse (m) de NiSO₄·7H₂O à peser :

Masse molaire de NiSO₄·7H₂O : 280,8 g. mol⁻¹

100 mL d'une solution mère (S) de concentration 0,1 mol. L⁻¹ contient :

$C = 0,1 \text{ mol. L}^{-1}$; $V = 100 \text{ ml} = 0,1 \text{ L}$

$C = n / V \rightarrow n = C \cdot V = 0,1 \cdot 0,1 = 0,01 = 10^{-2} \text{ mol}$

or $n = m / M \rightarrow m = n \cdot M = 0,01 \cdot 280,8 \rightarrow m = 2,808 \text{ g de NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

2. Longueur d'onde maximale (λ_{\max}) et énergie (E) correspondante :

$$\left\{ \begin{array}{l} \lambda_{\max} = 430 \text{ nm (tirée du spectre)} \\ E = h \cdot c / \lambda = 6,626 \cdot 10^{-34} \cdot 3 \cdot 10^8 / 430 \cdot 10^{-9} \rightarrow E = 4,62 \cdot 10^{-19} \text{ J} \end{array} \right.$$

3. Tableau à compléter avec exemple de calcul :

X (ml)	5	10	15	20	25
C _{Sol. filles} (mol. L ⁻¹)	10 ⁻²	2 · 10 ⁻²	3 · 10 ⁻²	4 · 10 ⁻²	5 · 10 ⁻²
Abs	0.217	0.415	0.640	0.855	1.100

Exemple de calcul des concentrations des solutions filles :

Il s'agit de dilutions, on utilise : $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$

Solution mère : $C_1 = 0.1 \text{ mol. L}^{-1}$; $V_1 = 5 \text{ mL}$ (volume de la solution mère prélevé)

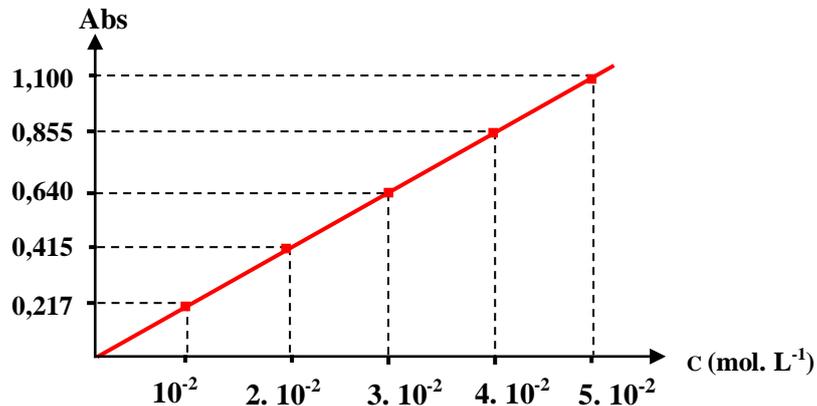
CHAPITRE II : SPECTROSCOPIE ULTRAVIOLET-VISIBLE

1^{ère} solution fille : $V_2 = 50 \text{ mL}$; $C_2 = ?$

$$C_2 = C_1 \cdot V_1 / V_2 = 0,1 \cdot 5 / 50 \rightarrow C_2 = 10^{-2} \text{ mol. L}^{-1}$$

4. Tracé de $A = f(c)$ et valeur du coefficient d'absorption molaire :

$A = f(c)$: Courbe d'étalonnage tracée selon les valeurs de C et Abs tirées du tableau



$A = f(c)$ est une droite passant par l'origine : $y = ax$; il s'agit de la droite $A = \epsilon \cdot l \cdot c$

La pente de la droite : $\epsilon \cdot l = 0,22 \rightarrow \epsilon = 0,22 / l = 0,22 / 1 \rightarrow \epsilon = 0,22 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Exercice 7 :

On applique la loi d'additivité des absorbances : à une longueur d'onde donnée, l'absorbance A d'un mélange de solutions absorbantes est la somme des absorbances individuelles. Selon la loi de Beer-Lambert, l'absorbance est additive (mais non la transmittance) :

$$A = \sum_{i=1}^n A_i(\epsilon_{\lambda,i}, l, C_i) \quad ; \quad A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda,1} \cdot l \cdot c_1 + \epsilon_{\lambda,2} \cdot l \cdot c_2$$

Application :

$$A_{450} = \epsilon_A^{450} \cdot l \cdot c_A + \epsilon_B^{450} \cdot l \cdot c_B \quad ; \quad A_{450} = 1000 \cdot 2,5 \cdot 10^{-4} + 3000 \cdot 1,5 \cdot 10^{-4} = 0,7$$

$$A_{500} = \epsilon_A^{500} \cdot l \cdot c_A + \epsilon_B^{500} \cdot l \cdot c_B \quad ; \quad A_{500} = 500 \cdot 2,5 \cdot 10^{-4} + 2000 \cdot 1,5 \cdot 10^{-4} = 0,425$$

CHAPITRE III :
SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

III.1. Qu'est ce que le rayonnement infrarouge ?

Le rayonnement infrarouge (IR) est un rayonnement électromagnétique dont les longueurs d'onde se situent entre celles de la lumière visible et celles des micro-ondes. Invisible à l'œil humain, il est souvent qualifié de rayonnement thermique, car il interagit avec la matière en créant son réchauffement. Couvrant les longueurs d'onde entre 700 et 10^6 nm (1 mm) dans le spectre électromagnétique, la partie infrarouge est arbitrairement subdivisée en trois régions (figure 19) :

- Le proche infrarouge ou IR-A : vient juste après la couleur rouge dans le visible et s'étend de 14000 à 4000 cm^{-1} (714 – 2500 nm en longueurs d'onde). Il correspond aux longueurs d'onde les plus courtes et donc aux nombres d'onde les plus élevés,
- L'infrarouge moyen ou IR-B : de 4000 à 400 cm^{-1} (2500 – 25000 nm),
- L'infrarouge lointain ou IR-C : de 400 à 10 cm^{-1} (25000 – 10^6 nm) ; il correspond aux longueurs d'onde les plus longues avec les nombres d'onde les plus faibles.

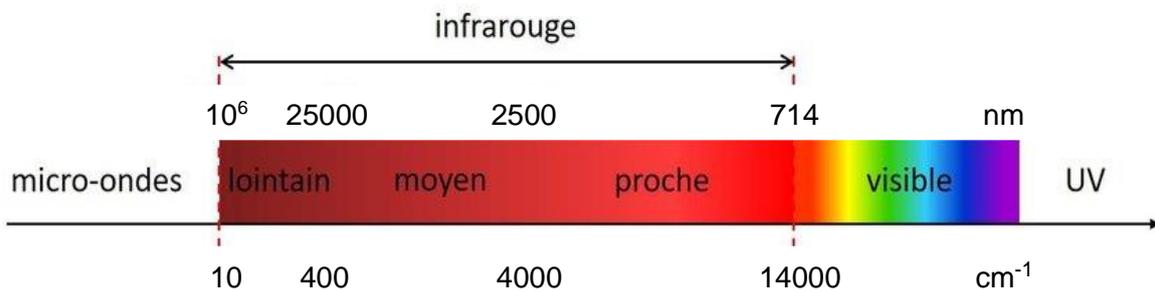


Figure 19 : Spectre du rayonnement infrarouge

Le rayonnement infrarouge a été découvert en 1800 par l'astronome anglais *William Herschel* qui, en analysant la lumière du soleil à l'aide d'un prisme et d'un thermomètre, découvrit au-delà de l'extrémité rouge du spectre visible une zone plus chaude que toutes les autres, qu'il nomma infrarouge (du latin *infra* : « en deçà »), faute de pouvoir la percevoir. Il faudra cependant attendre la fin du 19^{ème} siècle, avec notamment le développement de capteurs infrarouges, pour que les mesures de longueurs d'onde se développent, et que soit déterminée la plage de fréquences du rayonnement infrarouge.

III.2. Spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge, particulièrement sélective, est une des techniques d'analyse les plus couramment utilisées pour identifier les molécules organiques et inorganiques (analyse qualitative), pour déterminer la composition d'un échantillon (analyse quantitative), ainsi que pour obtenir d'autres informations importantes telles que les conformations des molécules, les interactions inter- et/ou intramoléculaires, etc.

La relation entre l'absorption d'un rayonnement IR par une molécule et sa structure moléculaire a été mise en évidence en 1924, où on s'est aperçu que l'énergie du rayonnement infrarouge moyen coïncidait avec celle des mouvements internes de la molécule. Le spectre infrarouge d'une espèce chimique est établi en faisant traverser, à travers un échantillon de cette espèce, un faisceau de lumière infrarouge et on mesurant l'intensité lumineuse transmise par cet échantillon. Le rayonnement infrarouge peut stimuler le mouvement des molécules et des liaisons interatomiques (mouvement de vibration des liaisons chimiques et de rotation). Lorsque la fréquence d'une vibration coïncide avec celle du rayonnement IR dirigé sur la molécule, celui-ci est absorbé. La comparaison entre les rayonnements incident et transmis à travers l'échantillon révèle ainsi la quantité d'énergie absorbée à chaque longueur d'onde et permet de déterminer les principales fonctions chimiques qui constituent l'échantillon.

Pour faciliter l'étude de ce type de vibrations et rotations, on a généralement recours au modèle physique de l'oscillateur harmonique, constitué par deux masses (m_1 et m_2) reliées par un ressort de constante de force k (figure 20).

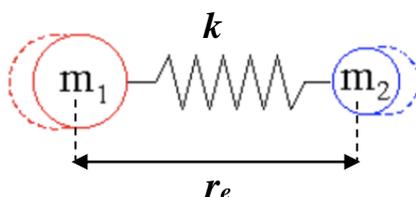


Figure 20 : Modèle de l'oscillateur

Si on écarte les deux masses de la distance d'équilibre r_e , et qu'on relâche le système, celui-ci va entamer un mouvement périodique dont la période dépend de la constante de raideur du ressort k ($\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$) et des deux masses. La fréquence de vibration est donnée par la loi de Hooke :

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

Où μ est la masse réduite du système :

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

Dans le cas d'une liaison chimique entre deux atomes, k est la constante de force de la liaison (k est proportionnelle à l'énergie de liaison) et μ la masse réduite des deux atomes autour de la liaison.

III.3. Spectroscopie infrarouge et mouvements moléculaires

En passant à travers une substance organique, le rayonnement infrarouge est absorbé et provoque des mouvements de vibration internes (élongation ou déformation) et de rotation des molécules des groupes chimiques qui les constituent et qui sont à l'origine des pics et des bandes d'absorption observés sur les spectres IR. Ces derniers permettent de déceler la présence de groupements d'atomes caractéristiques au sein de la molécule et qui sont nécessaires à l'établissement de sa structure.

Différents phénomènes sont observés en spectroscopie infrarouge, selon les régions du spectre :

- le proche infrarouge (700 – 2500 nm en longueurs d'onde), très énergétique, il permet d'étudier des phénomènes complexes (vibrations harmoniques et de combinaisons) ; il est peu utile à l'élucidation structurale des molécules organiques.

- le moyen infrarouge (2500 – 25000 nm) est utilisé pour l'étude des vibrations fondamentales des molécules (et de la structure rotationnelle-vibrationnelle associée) ; particulièrement utiles pour l'élucidation structurale des composés organiques,

- l'infrarouge lointain (25000 – 10⁶ nm), de plus faible énergie, est utilisé pour étudier les rotations des molécules.

III.3.1. Types de vibration moléculaires

L'absorption d'un rayonnement infrarouge a pour effet de faire vibrer la molécule en modifiant les distances interatomiques ou les angles de liaisons (oscillation des angles et

CHAPITRE III : SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

longueurs de liaisons autour de valeurs moyennes à l'équilibre, correspondant au minimum d'énergie potentielle du système).

a) Vibrations des molécules diatomiques (A–B)

Dans le cadre de la mécanique classique, une molécule diatomique A–B peut être assimilée à un oscillateur harmonique de masse réduite μ et de constante de force k (figure 21). Les deux masses m_A et m_B des atomes A et B subissent le mouvement interne de vibration autour de leur position d'équilibre (mouvement d'élongation), avec une fréquence donnée par la loi de Hooke (cf. paragraphe III.2). La fréquence (ou nombre d'onde) de vibration du système A–B dépend de μ et de k .

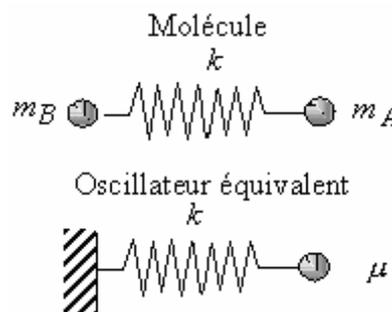


Figure 21 : Molécule diatomique A–B modélisée comme un oscillateur harmonique

b) Vibrations des molécules polyatomiques

Dans une molécule polyatomique, les liaisons subissent deux modes de vibrations : des vibrations d'élongation (ou allongement) et des vibrations de déformation (figure 22).

- Vibrations d'élongation ou de valence (*stretching*) ; notées ν : Elles ont lieu lorsque deux atomes se rapprochent ou s'éloignent périodiquement le long de leur axe commun. On distingue le mode d'élongation symétrique et antisymétrique.
- Vibrations de déformation angulaires (*bending*) : Elles correspondent à des modifications de l'angle de liaison. Différents types de déformations sont possibles : dans le plan (notées δ) et hors du plan (notées γ).

Les vibrations d'élongation se produisent à des nombres d'onde élevés, alors que les vibrations de déformation s'observent vers les faibles nombre d'onde.

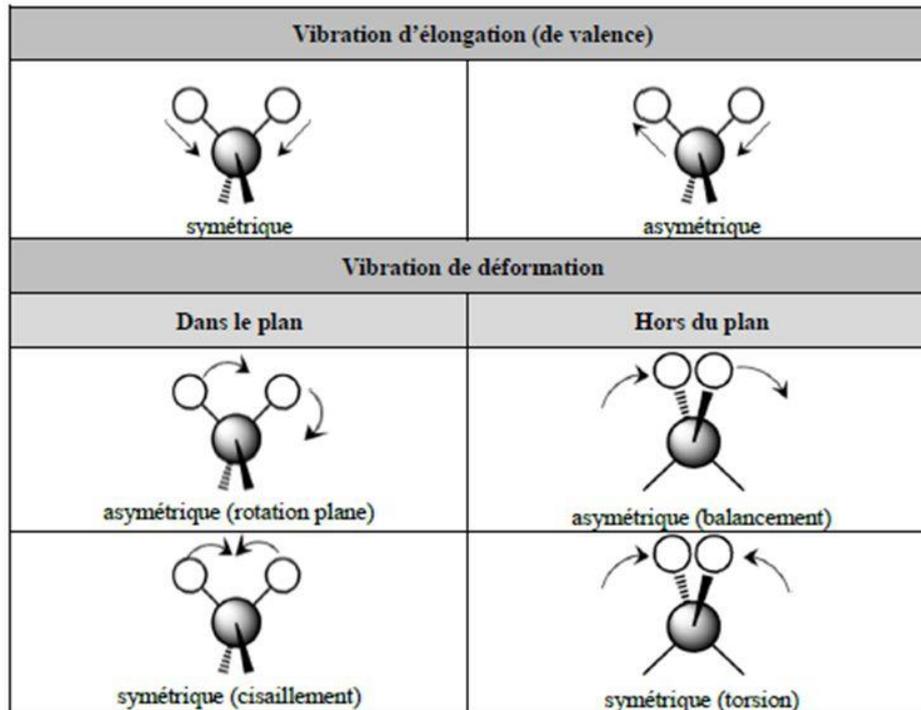


Figure 22 : Modes de vibration dans une molécule polyatomique

III.4. Spectromètres infrarouges

Deux types de spectromètres sont utilisés en spectroscopie infrarouge, dont la différence réside essentiellement dans le système de sélecteurs de longueurs d'onde :

III.4.1. Spectromètre à rayonnement infrarouge dispersif

Il s'agit du spectromètre à balayage conventionnel, construit à partir de monochromateur à prismes de chlorure de sodium, de fluorure de calcium ou de bromure de césium (figure 23).

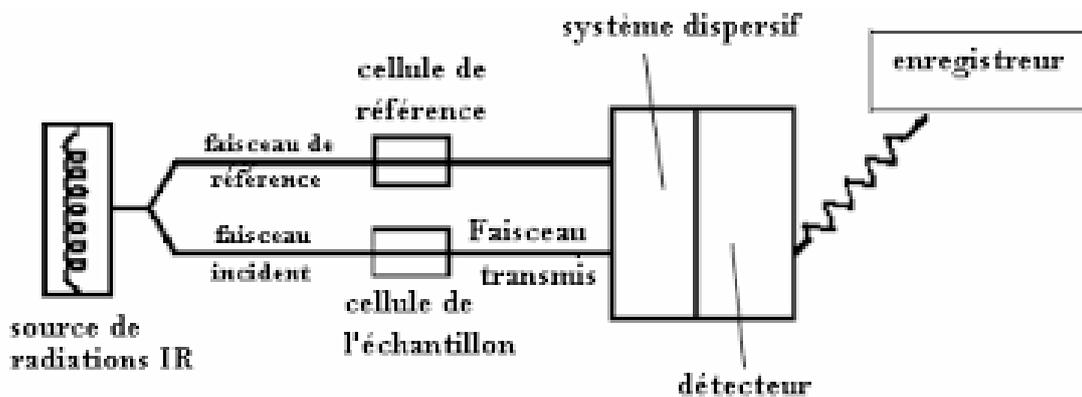


Figure 23 : Spectromètre IR type dispersif

CHAPITRE III : SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

L'appareil utilise un système dispersif qui divise la lumière entrante en ses composants spectraux et où chaque composant est mesuré individuellement, un à la fois. Le détecteur mesure la quantité d'énergie pour chaque fréquence qui passe à travers l'échantillon. Il en résulte un spectre représentant l'évolution de la transmittance (rapport de l'intensité transmise à l'intensité incidente) exprimée en pourcentage (% T) en fonction du nombre d'onde exprimé en cm^{-1} .

La spectroscopie IR dispersive présente certains inconvénients parmi lesquels on peut citer la lenteur des mesures (chaque fréquence étant mesurée individuellement, l'enregistrement d'un spectre prend environ 10 à 15 minutes) et la relative insensibilité (la détection nécessite une quantité raisonnable de produits pour une analyse exploitable).

III.4.2. Spectromètre à transformée de Fourier (IRTF ou FTIR)

Les spectromètres à transformée de Fourier (FT-IR) (non dispersifs) ont été conçus au milieu des années 80 pour remédier aux limitations de la spectroscopie IR dispersive, et pallier notamment, à la faible sensibilité de la technique et à la lenteur d'acquisition des mesures (figure 24).

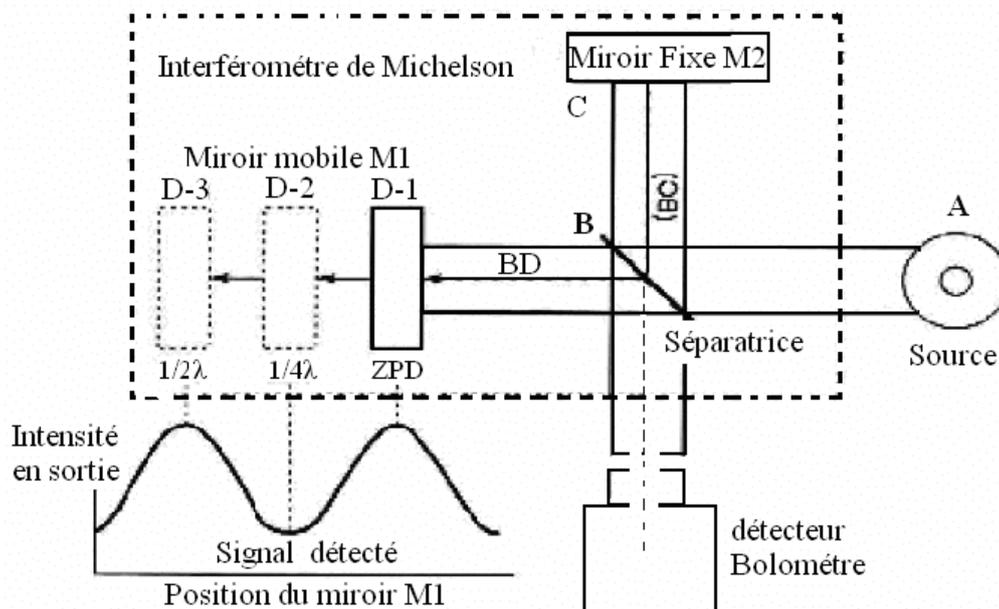


Figure 24 : Spectromètre IR à transformée de Fourier (FTIR)

Contrairement au spectromètre IR dispersif qui divisait la lumière entrante en ses composants spectraux et mesurait chaque fréquence individuellement (à l'aide de filtres ou d'un

CHAPITRE III : SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

monochromateur) selon la plage spectrale étudiée, l'utilisation d'un interféromètre en FTIR permet de mesurer toutes les fréquences de la lumière infrarouge simultanément, ce qui permet d'effectuer des analyses beaucoup plus rapides, de haute résolution et avec un rapport signal / bruit nettement supérieur. Le spectre FTIR est enfin obtenu à travers une opération mathématique, appelée transformée de Fourier, qui permet de convertir les données brutes en un spectre réel.

III.5. Techniques de mesure en spectroscopie FTIR

Selon la nature de l'échantillon étudié (liquide, film, poudre...), plusieurs techniques peuvent être utilisées pour la mise en œuvre de la spectroscopie FTIR : par transmission, par réflexion (spectroscopie de réflexion-absorption infrarouge (IRRAS), par réflexion totale atténuée (ATR) ou par réflexion diffuse (DRIFT). Les trois modes utilisent les mêmes principes de base pour étudier l'interaction entre la lumière infrarouge et la matière, seule la façon dont la lumière infrarouge est détectée est différente.

Le FTIR en transmission, technique la plus ancienne utilisée en spectroscopie infrarouge, exige généralement une préparation préalable spécifique des échantillons afin d'obtenir des spectres utiles. Pour un échantillon solide, un broyage dans une substance solide transparente aux infrarouge, tel que le KBr (pastille de KBr), est généralement réalisé. L'échantillon solide peut aussi être dispersé dans du nujol (paraffine) et déposé sur une pastille de NaCl monocristallin. Un échantillon liquide est déposé entre deux pastilles de NaCl monocristallin comprimées, ou placé dans une cuve dont les fenêtres sont des monocristaux de NaCl ou de CaF₂ (qui a l'avantage de ne pas être altéré par l'eau). Les autres méthodes d'échantillonnage n'exigent aucune préparation particulière de l'échantillon, si ce n'est, dans certains cas, le prélèvement d'une partie de l'échantillon.

III.6. Présentation d'un spectre d'absorption infrarouge

Un spectre infrarouge représente l'évolution de la transmittance T de l'échantillon (en ordonnée) en fonction du nombre d'onde $\bar{\nu}$ (en abscisse) (figure 25).

- La transmittance, ($T \%$), exprime la fraction de l'intensité transmise par rapport à l'intensité incidente : $T = I / I_0$ (I_0 et I étant l'intensité de la radiation respectivement, avant et après la traversée de l'échantillon).
- Le nombre d'onde ($\bar{\nu}$ en cm^{-1}) est l'inverse de la longueur d'onde ($\bar{\nu} = 1 / \lambda$).

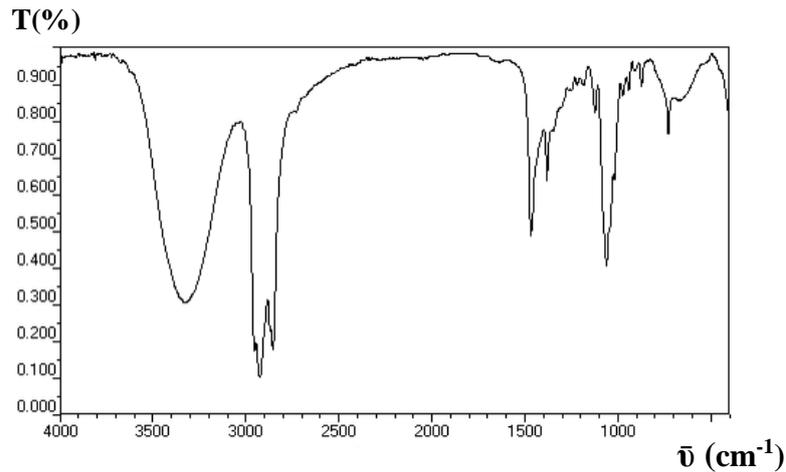


Figure 25 : Exemple de spectre infrarouge; spectre de l'hexan-1-ol

Remarques :

- La transmittance (T) et l'absorbance (A) étant inversement proportionnelles ($A = \epsilon \cdot l \cdot c = \text{Log } I_0 / I = \text{Log } (1 / T)$), une transmittance de 100 % correspond à une absorbance nulle (rayonnement totalement transmis, il n'y a donc pas d'absorption), alors qu'une transmittance nulle correspond à une absorbance infinie (rayonnement totalement absorbé, rien n'est transmis).
- Lorsqu'une partie du rayonnement infrarouge est absorbée, on observe des pics ou des bandes d'absorption orientés vers le bas, dont les nombres d'onde sont caractéristiques de certaines liaisons dans la substance chimique étudiée. L'intensité relative de chaque bande (F : forte, m : moyenne, f : faible....) est également précisée.
- En plus de l'analyse qualitative des composés et de l'identification de leurs structures à partir de leurs signatures spectrales, l'infrarouge est aussi une méthode quantitative, qui permet le dosage d'une substance par la considération des intensités de ses bandes d'absorption (la loi de Beer-Lambert étant toujours vérifiée dans la région infrarouge).

III.7. Interprétation d'un spectre d'absorption infrarouge

En spectroscopie infrarouge, la structure chimique d'une molécule se traduit par un certain nombre de bandes d'absorption observées à des nombres d'onde déterminés. L'interprétation d'un spectre infrarouge consiste à faire correspondre les bandes d'absorption

CHAPITRE III : SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

(à travers leurs nombres d'onde et leurs formes) avec les liaisons chimiques correspondantes, et par extension les groupes caractéristiques de la molécule.

Deux zones sont à distinguer sur un spectre d'absorption infrarouge (figure 26) :

La zone 1 (partie gauche du spectre), correspondant aux nombres d'onde compris entre 4000 et 1400 cm^{-1} , reflétant la plupart des bandes de vibration de valence ou d'élongation (étirement des liaisons) des liaisons dans la substance étudiée (bandes répertoriées dans des tables).

La zone 2 (partie droite du spectre), correspondant aux nombres d'onde inférieurs à 1400 cm^{-1} , appelée *empreinte digitale*, où se trouve les bandes de vibration de déformation angulaire des liaisons (variation d'angles de liaisons) (zone unique à la molécule, difficile à analyser du fait de sa complexité).

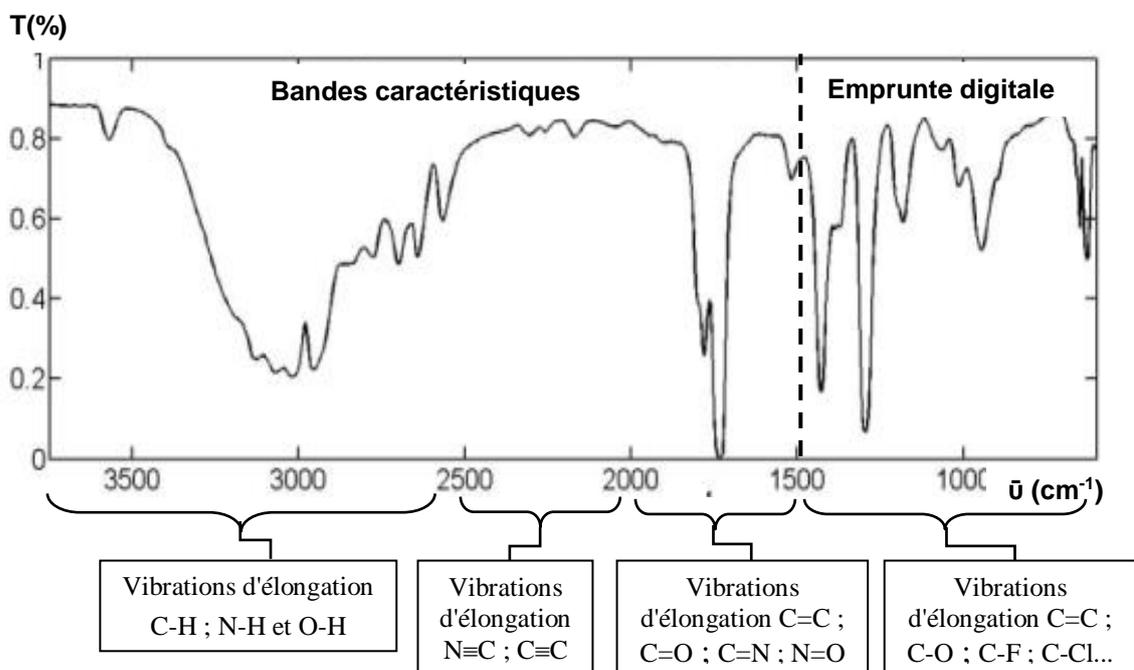


Figure 26 : Les deux zones d'un spectre infrarouge

Dans la partie exploitable du spectre, quatre régions importantes peuvent être distinguées :

- Entre 4000 - 2500 cm^{-1} : région des vibrations d'élongation (étirement) des liaisons C-H ; N-H et O-H

CHAPITRE III : SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

- Entre 2500 - 2000 cm^{-1} : région des vibrations d'élongation des liaisons triples $\text{N}\equiv\text{C}$ et $\text{C}\equiv\text{C}$
- Entre 2000 - 1500 cm^{-1} : région des vibrations d'élongation des liaisons doubles $\text{C}=\text{C}$; $\text{C}=\text{O}$; $\text{C}=\text{N}$ et $\text{N}=\text{O}$
- En deçà de 1500 cm^{-1} : région des liaisons simples $\text{C}-\text{O}$; $\text{C}-\text{F}$; $\text{C}-\text{Cl}$...

III.8. Identification de quelques groupes fonctionnels caractéristiques

Les liaisons des différents groupes fonctionnels au sein d'une molécule organique absorbent différentes longueurs d'onde de rayonnement infrarouge (différents nombres d'onde). Ceci est à la base de l'identification et de la distinction des groupes fonctionnels par spectroscopie infrarouge. Des tables spectroscopiques sont généralement utilisées, et qui présentent les groupes fonctionnels les plus caractéristiques, en précisant les nombres d'onde et les formes des bandes d'absorption de leurs liaisons chimiques. A partir de la table spectroscopique et du spectre IR obtenu, on identifie la nature des liaisons associées aux bandes d'absorption. On en déduit alors le groupe caractéristique présent dans la molécule et la famille chimique à laquelle celle-ci appartient.

Table spectroscopique infrarouge

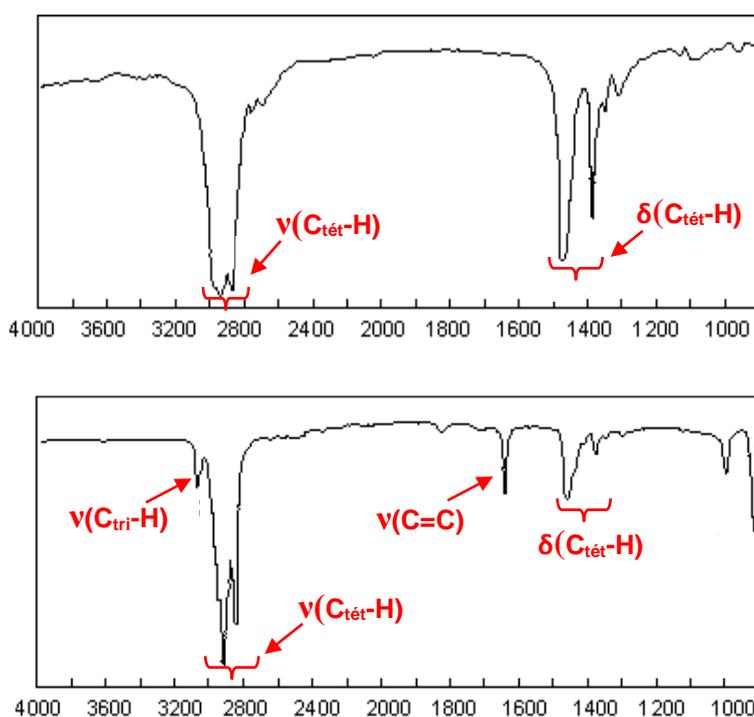
Liaison	Groupe d'atomes caractéristique	Fonction ou famille	Nombre d'onde (cm^{-1})	Intensité
O – H (libre)	Hydroxyle C-OH	Alcool	3 580 – 3 670	Forte
O – H (liée par liaison H)	Hydroxyle C-OH	Alcool	3 200 – 3 400	Forte
	Carboxyle -COOH	Acide carboxylique	3 200 – 3 400	Forte
N – H	C – NH –	Amine, amide	3 100 – 3 500	Moyenne
C – H	Cycle benzénique - C_6H_5	Composés aromatiques	3 030 – 3 080	Moyenne
		Alcane	2 810 – 3 000	Forte
		Alcène	3 000 – 3 100	Moyenne
C = O	Carbonyle	Aldéhyde, cétone	1 650 – 1 730	Forte
	Carboxyle	Acide	1 680 – 1 710	Forte
	CO-O-C	Ester	1 700 – 1 740	Forte
	CO-N	Amide	1 650 – 1 700	Forte
C = C		Alcène	1 625 – 1 680	Moyenne
C – O		Alcool, acide, ester	1 050 – 1 450	Forte
C – C		Alcane	1 000 – 1 250	Forte
C – Cl		Chloroalcane	700 – 800	Forte
C – Br		Bromoalcane	600 – 750	Forte
C – I		Iodoalcane	500 – 600	Forte

CHAPITRE III : SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

Quelques groupes fonctionnels caractéristiques ont été répertoriés dans la table spectroscopique précédente, ainsi que les nombres d'onde et les intensités des bandes d'absorption correspondant aux liaisons chimiques impliquées.

III.9. Bandes d'absorption associées à quelques liaisons chimiques

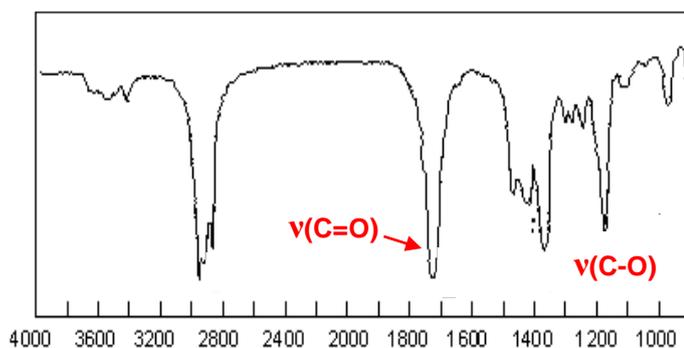
- **Bandes C-H** : Le nombre d'onde dépend de la nature du carbone : il est plus faible pour un carbone tétragonal (C-H) présent dans les alcanes que pour un carbone trigonal (=C-H) dans les alcènes. La liaison C_{tét}-H est caractérisée par des bandes de vibration d'élongation fortes entre 2800 et 3000 cm⁻¹ et par des bandes de vibration de déformation entre 1400 et 1470 cm⁻¹. La liaison C_{tri}-H d'un alcène présentera quant à elle une vibration d'élongation moyennement intense entre 3000 et 3100 cm⁻¹.



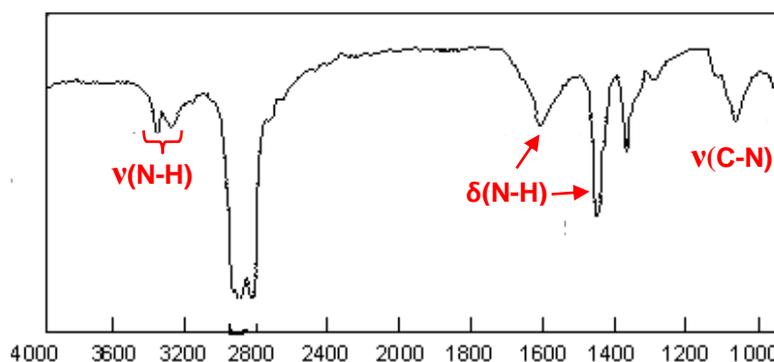
- **Bande C=C** : Elle est plus intense dans les alcènes non conjugués par rapport aux composés aromatiques, où elle est plus faible car délocalisée (nombre d'onde plus faible, entre 1630 et 1680 cm⁻¹).
- **Bande C=O** : Présente dans les acides carboxyliques, les aldéhydes, les cétones, les esters, les amides etc., la position de sa bande de vibration d'élongation (située entre

CHAPITRE III : SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

1650 et 1740 cm^{-1}) dépend de la nature de la fonction. La conjugaison entraîne une augmentation de la longueur d'onde (diminution du nombre d'onde).



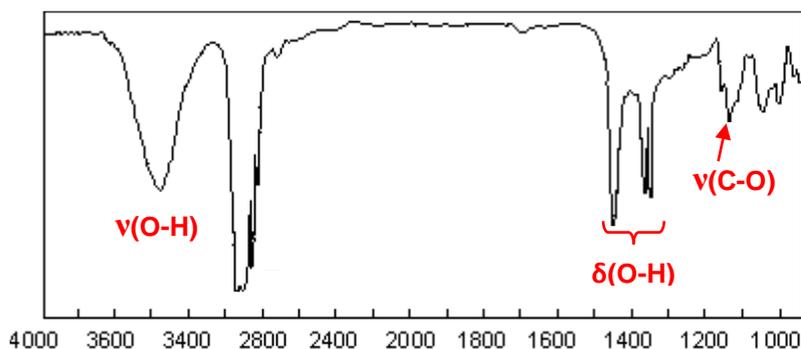
- **Bande C-O** : La liaison C-O est présente dans les acides carboxyliques, les alcools etc. La position de sa bande d'élongation, située entre 1000 et 1450 cm^{-1} , dépend du type de fonction.
- **Bande N-H** : Présente dans les amines, les amides etc., la position de sa bande d'élongation, située entre 3100 et 3500 cm^{-1} , dépend du type de fonction. Le groupe NH_2 d'une amine primaire présentera deux bandes de vibration N-H (modes symétriques et antisymétriques), alors qu'une amine secondaire ne donne qu'une seule bande d'intensité moyenne. Les vibrations de déformation N-H sont caractérisées par des bandes de moyennes intensités entre 1550 et 1650 cm^{-1} pour les amine primaires et entre 1490 et 1600 cm^{-1} pour les amine secondaires.



- **Bande O-H** : Présente dans les alcools et les acides carboxyliques, la forme de sa bande d'élongation permet de différencier entre les deux fonctions. Les alcools présentent une bande d'élongation intense entre 3200 et 3600 cm^{-1} , alors que les acides carboxyliques reflètent une bande beaucoup plus large entre 2500 et 3200 cm^{-1} . Dans

CHAPITRE III : SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

le cas des alcools, la forme et la fréquence d'élongation dépendent de l'existence ou non de liaisons hydrogène (O...H-O), celle-ci conduisant à une diminution du nombre d'onde et à une augmentation de l'intensité. Absorbant autour de 3600 cm^{-1} en l'absence de liaison hydrogène (molécule diluée dans un solvant aprotique apolaire), le nombre d'onde peut descendre à 3200 cm^{-1} , selon le degré d'association (solution concentrée ou en liquide pur).



III.10. Références bibliographiques

1. *A programmed introduction to infrared spectroscopy*, B. W. Cook & K. Jones, Heyden, 1st Edition 1st Printing, Londres (1972).

<https://www.amazon.com/programmed-introduction-infrared-spectroscopy/dp/0855010363>

2. *The Interpretation of Infrared Spectra: Published Reference Sources*, J. P. Coates, Appl. Spectrosc. Rev., 31(1–2), 179–192 (1996). doi: 10.1080/05704929608000568

3. *A Guide to the Complete Interpretation of Infrared Spectra of Organic Structures*, N. P. G. Roeges, Kingston, D. G. I. John Wiley & Sons, New York, NY., Journal of Natural Products, 59(11), 1107–1107 (1996). doi: 10.1021/np960311g

4. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, B. Stuart, Chapter 4, Wiley & Sons, Ltd., New York. (2004). doi: 10.1002/0470011149

5. *Infrared Spectroscopy of Molecules*, U. C. Agarwala, H L Nigam and S. Agrawal, World Scientific Publishing Company; 296 pages, Illustrated Edition (2014). doi: 10.1142/9174

III.11. Exercices d'application

Exercice 1 :

1. Calculer la fréquence ν en Hz et le nombre d'onde $\bar{\nu}$ en cm^{-1} correspondant aux longueurs d'onde λ suivantes : 10 cm ; 10 μm et 300 nm.

2. L'intervalle des longueurs d'onde λ (nm) limite du domaine du visible est environ [380 - 780]. Convertir ces limites en nombres d'onde en cm^{-1} ($c = 3 \cdot 10^8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$).

Exercice 2 :

Quelle est l'énergie d'une radiation :

1. de fréquence $\nu = 4,6 \text{ GHz}$
2. de nombre d'onde 37000 cm^{-1}
3. Quelle est l'énergie pour une mole de ces photons ?

($\nu = 4.6 \text{ GHz}$ et $\bar{\nu} = 37000 \text{ cm}^{-1}$)

N (nombre d'Avogadro) = $6,02 \cdot 10^{23}$

h (constante de Planck) = $6,62618 \cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$

Exercice 3 :

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

2. Même question pour la liaison simple C-O produisant une absorption à 1050 cm^{-1} .

Exercice 4 :

On considère une vibration d'élongation C-H donnant lieu à une absorption à 3100 cm^{-1} . Quelle sera la valeur du nombre d'onde de l'absorption correspondante de l'homologue deutérié C-D ? (On considérera que la valeur de la constante de force est la même dans les deux cas, le deutérium ${}^2_1\text{D}$ est le premier isotope de l'hydrogène).

Exercice 5 :

Attribuer les nombres d'onde aux liaisons qui leur conviennent.

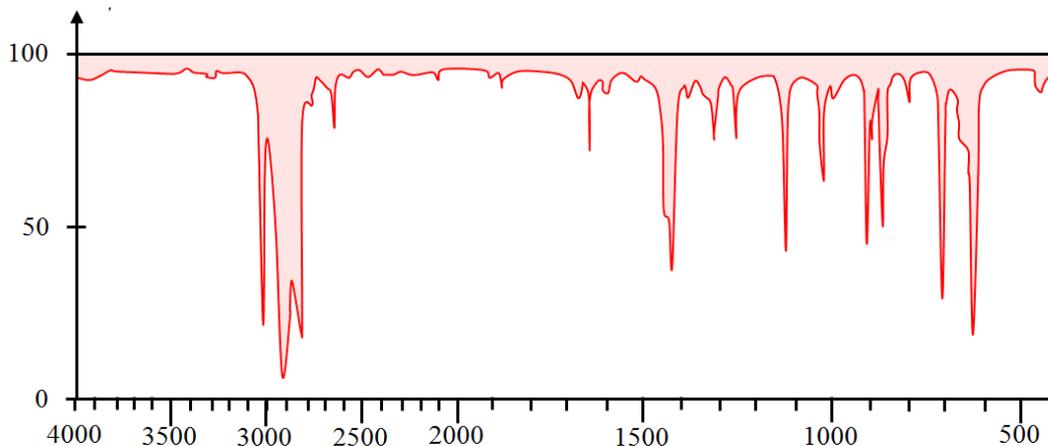
Nombres d'onde (cm^{-1}) : 450 ; 1000 ; 1100 ; 3030 ; 750 ; 600

Liaisons : C-H ; C-I ; C-C ; C-F ; C-Br ; C-Cl

CHAPITRE III : SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

Exercice 6 :

Un extrait du spectre infrarouge d'un composé A est donné ci-dessous.



1. Les molécules du composé A peuvent-elles, a priori, posséder :

- a) Une liaison Ctét – H ?
- b) Une liaison Ctri – H ?
- c) Une liaison C – C ?
- d) Une liaison C = C ?
- e) Une liaison O – H ?

En déduire la fonction du composé A.

2. Le composé A est l'hex-1-ène. Justifier alors les bandes d'absorption du spectre.

Exercice 7 :

Soit la série de bandes IR ($\bar{\nu}$ en cm^{-1}) suivante :

- a) 3372 (l, F) ; 3045 (f) ; 1595 (m) ; 1224 (F)
- b) 2962 (F), rien entre 2800 et 1600 cm^{-1} ; 1450 (m) ; 721 (f)
- c) 3371(f) ; 2924 (F) ; 1617 (f) ; 1467 (m) ; 1378 (f)
- d) 3070 (f) ; 1765 (F) ; 1594 (m) ; 1370 (m) ; 692 (f).

(F : forte, f : faible, m : moyenne, l : large)

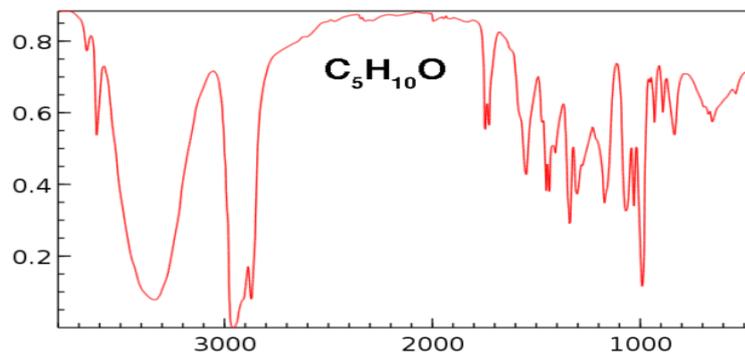
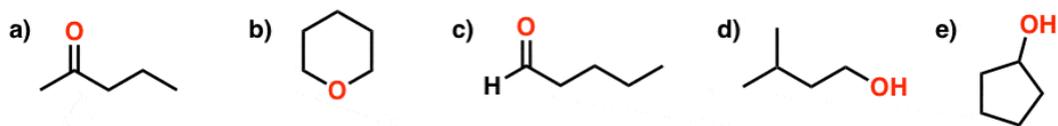
Chaque série correspond à un des composés suivants : acétate de phényle ; octylamine ; phénol ; dodécane.

Attribuer à chaque composé son spectre IR en indexant les bandes.

CHAPITRE III : SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

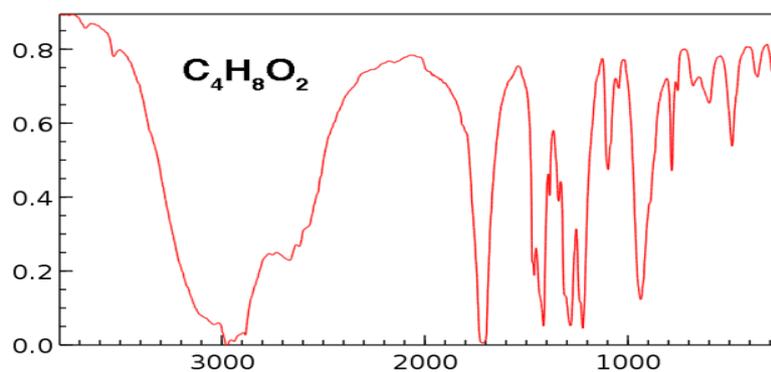
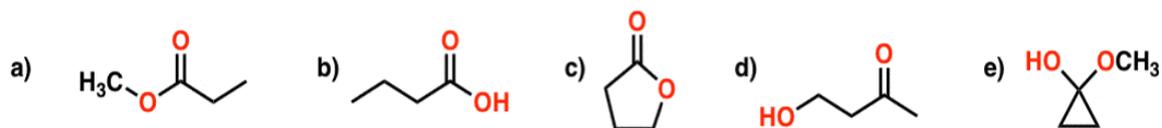
Exercice 8 :

Laquelle de ces molécules de formule brute $C_5H_{10}O$ correspond le mieux au spectre IR ci-dessous :



Exercice 9 :

Laquelle de ces molécules de formule brute $C_4H_8O_2$ correspond le mieux au spectre IR ci-dessous (le produit sent le vomi) :



III.12. Corrigé des exercices

Exercice 1 :

Application de la relation de Planck : $\Delta E = h \nu = h c \bar{\nu} = h c / \lambda$

1. $\nu = c / \lambda$ et $\bar{\nu} = 1 / \lambda$

λ	10 cm	10 μm	300 nm
$\bar{\nu}$ (cm^{-1})	0.1	10^4	$\approx 3,3 \cdot 10^4$
ν (Hz)	$3 \cdot 10^9$	$3 \cdot 10^{14}$	10^{15}

2. $\lambda = 350 \text{ nm} \rightarrow \bar{\nu} = 1 / \lambda = 1 / 350 \cdot 10^{-7} \approx 28571 \text{ cm}^{-1}$

$\lambda = 780 \text{ nm} \rightarrow \bar{\nu} = 1 / \lambda = 1 / 780 \cdot 10^{-7} \approx 12820 \text{ cm}^{-1}$

L'intervalle spectrale du domaine du visible en cm^{-1} est donc [12820 - 28571]

Exercice 2 :

1. $\Delta E = h \nu = 6,62618 \cdot 10^{-34} \times 4,6 \cdot 10^9 = 30,48 \cdot 10^{-25} \text{ J}$

2. $\Delta E = h c \bar{\nu} = 6,62618 \cdot 10^{-34} \times 3 \cdot 10^8 \times 37000 \cdot 10^2 = 735 506 \cdot 10^{-24} \text{ J}$

3. Energie pour une mole de ces photons :

$$\Delta E = N \times h \nu = 6,02 \cdot 10^{23} \times 30,48 \cdot 10^{-25} = 1,83 \text{ J}$$

$$\Delta E = N \times h c \bar{\nu} = 6,02 \cdot 10^{23} \times 735 506 \cdot 10^{-24} = 443 \text{ KJ}$$

Exercice 3 :

Application de la loi de Hooke : $\bar{\nu} = \frac{1}{2 \cdot \pi \cdot c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \rightarrow k = \mu (2 \pi c \bar{\nu})^2$

1. Calcul de la constante de force pour la liaison C=O :

$$\text{Masse réduite du système : } \mu = \frac{M_C \cdot M_O}{M_C + M_O} \times \frac{1}{N} = \frac{12 \cdot 16}{12+16} \times \frac{1}{N} = 1,14 \cdot 10^{-23} \text{ gr}$$

$$k_{\text{C=O}} = 11,9 \cdot 10^3 \text{ g/s}^2 = 1190 \text{ N/m}$$

2. Calcul de la constante de force pour la liaison C-O :

Même mode de calcul : $k_{\text{C-O}} = 446 \text{ N/m}$

CHAPITRE III : SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

On en déduit que $k_{C=O} > k_{C-O}$ (la liaison double C=O plus forte que la liaison simple C-O)

Exercice 4 :

Masse réduite de C-H :
$$\mu_{C-H} = \frac{M_C \cdot M_H}{M_C + M_H} \times \frac{1}{N} = 1,53 \cdot 10^{-24} \text{ gr}$$

Application de la loi de Hooke :
$$\bar{\nu}_{C-H} = \frac{1}{2 \cdot \pi \cdot c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \rightarrow k = \mu (2 \pi c \bar{\nu})^2 = 523 \text{ N/m}$$

Masse réduite de C-D :
$$\mu_{C-D} = \frac{M_C \cdot M_D}{M_C + M_D} \times \frac{1}{N} = 2,85 \cdot 10^{-24} \text{ gr}$$

La constante k étant identique pour les 2 liaisons, on en déduit :

$$\bar{\nu}_{C-D} = \frac{1}{2 \cdot \pi \cdot c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} = 2275 \text{ cm}^{-1}$$

$\bar{\nu}_{C-H}$ (3100 cm^{-1}) est plus grand que $\bar{\nu}_{C-D}$ (2275 cm^{-1}) \rightarrow Effet de la masse

Exercice 5 :

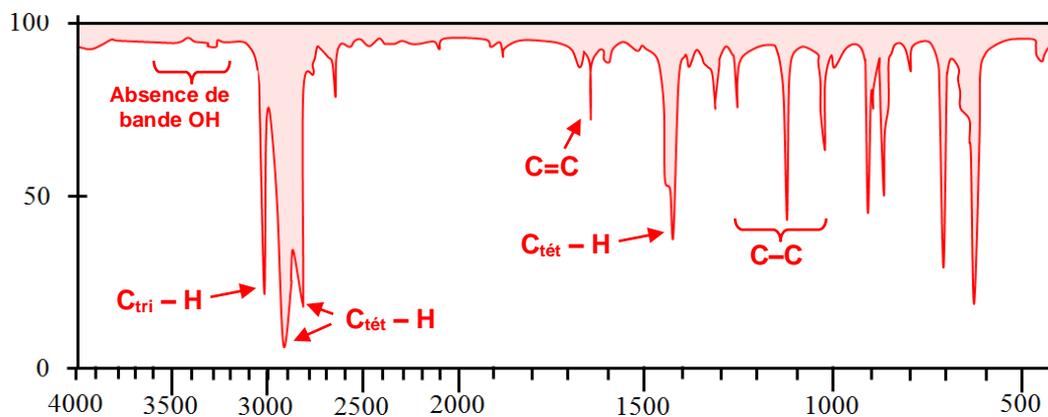
Attribution des nombres d'onde aux liaisons :

C-H (3030 cm^{-1}) ; C-C (1100 cm^{-1}) ; C-F (1000 cm^{-1}) ; C-Cl (750 cm^{-1}) ; C-Br (600 cm^{-1}) ;

C-I (450 cm^{-1})

Exercice 6 :

1. Bandes de possède le composé A :



CHAPITRE III : SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

Bandes observées sur le spectre :

- Liaison C_{tét} – H : 2800 à 3000 cm⁻¹ (F) et 1415 à 1470 cm⁻¹ (F)
- Liaison C_{tri} – H : 3000 à 3100 cm⁻¹ (F)
- Liaison C – C : 1000 à 1250 cm⁻¹ (F)
- Liaison C = C : 1625 à 1685 cm⁻¹ (m)

La molécule ne possède pas de liaison O – H :

- Absence de bande O – H_{libre} entre 3580 et 3650 cm⁻¹ (F)
- Absence de bande O – H_{liée} entre 3200 et 3400 cm⁻¹ (F)

Fonction du composé A :

Comme le composé A possède une double liaison C = C, il possède la fonction alcène. Cette molécule possède des liaisons C_{tét} – H ; C_{tri} – H ; C – C et une double liaison C = C :

Il s'agit de l'hex-1-ène : $\text{CH}_3\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---CH=CH}_2$

Exercice 7 :

En utilisant les tables IR, on peut identifier les composés à travers leurs groupes fonctionnels :

Spectre a : phénol ($\bar{\nu}_{\text{OH}} = 3372 \text{ cm}^{-1}$; $\bar{\nu}_{\text{C-O}} = 1224 \text{ cm}^{-1}$)

Spectre b : dodécane

Spectre c : octylamine ($\bar{\nu}_{\text{N-H}} = 3371 \text{ cm}^{-1}$, $\bar{\nu}_{\text{C-N}} = 1378 \text{ cm}^{-1}$)

Spectre d : acétate de phényl ($\bar{\nu}_{\text{C=O}} = 1765 \text{ cm}^{-1}$)

Exercice 8 :

On donne la formule brute : C₅H₁₀O.

Une telle formule correspond à un indice de déficit en hydrogène (IDH) de 1, ce qui signifie qu'une double liaison ou un cycle est présent dans la molécule. Cela exclut immédiatement d) dont l'IDH est nul et dont la formule moléculaire est donc C₅H₁₂O.

L'examen du spectre révèle une bande large à 3300 cm⁻¹ et l'absence de bande dominante autour de 1700 cm⁻¹ (celle à mi-chemin vers 1700 cm⁻¹ est trop faible pour être associée à un C=O). La bande à 3300 cm⁻¹ renvoie à un alcool (groupe OH). La seule option

CHAPITRE III : SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

logique est e) (cyclopentanol), puisqu'il possède à la fois un groupe OH et un DHI de 1. Il ne peut s'agir de b), cette molécule n'ayant pas de OH.

Les options a) et c) sont également exclues en raison de l'absence de C=O ; l'option b) est exclue du fait de la présence de la bande OH à 3300 cm^{-1} .

Exercice 9 :

Le premier indice est l'odeur de vomis : c'est de l'acide butyrique !

La formule de $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ correspond à un DHI de 1. Nous pouvons déjà exclure le c).

L'examen du spectre IR révèle une bande très intense et large dans la région $3300\text{-}2600\text{ cm}^{-1}$ qui occulte tout le reste. Cette bande ressemble aux bandes typiques des acides carboxyliques, mais cela requiert plus d'informations avant d'être confirmé. On peut au moins exclure a), qui ne présente aucune bande OH.

On observe également une bande importante au-dessus de 1700 cm^{-1} , typique d'un C=O. Nous pouvons en toute sécurité écarter e), qui ne comporte aucun groupe carbonyle.

Il reste donc deux choix : b) (l'acide carboxylique) et d) la cétone/l'alcool.

L'allure de la bande très large et très intense à $3300\text{-}2600\text{ cm}^{-1}$ est un diagnostic de l'acide carboxylique : la réponse est donc b).

CHAPITRE IV :
CHROMATOGRAPHIE

IV.1. Qu'est ce que la chromatographie ?

La chromatographie (du grec *khroma*, couleur et *graphein*, écrire) est une méthode de séparation non destructrice des constituants d'un mélange en phase homogène liquide ou gazeuse en ses différents constituants. La chromatographie peut être analytique (identification et quantification d'une ou de plusieurs substances chimiques) ou préparative (purification et séparation d'un constituant d'un mélange).

Historiquement, le botaniste russe *Mikhail Tswett* a réalisé la première chromatographie, en 1906, en séparant les pigments d'une feuille d'épinard à l'aide d'une colonne de carbonate de calcium (CaCO_3). Il observa alors la séparation, sur la colonne, des colorants végétaux, lors de la filtration de leur solution dans l'éther de pétrole. Des bandes colorées (vertes, oranges, jaunes...) se déployaient ainsi sur la colonne, telles les couleurs d'un spectre lumineux, et pouvaient être analysées qualitativement et quantitativement (figure 27). Il fut le premier à utiliser le mot chromatographie pour cette méthode et à définir les mots chromatogramme, élution et rétention.

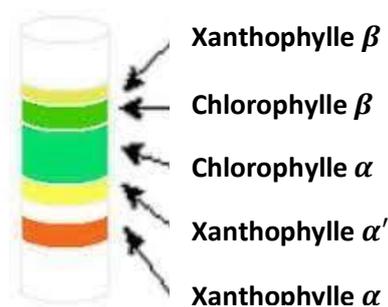


Figure 27 : Formation de bandes colorées lors de la séparation des pigments d'une feuille d'épinard sur une colonne de carbonate de calcium

IV.2. Principe de la chromatographie

Le principe de la chromatographie est basé sur l'entraînement d'un échantillon à l'aide d'un éluant (gazeux ou liquide) appelé phase mobile (PM), à travers une seconde phase fixée sur un support (colonne ou surface plane), dite phase stationnaire (PS). La séparation des constituants de l'échantillon est basée sur leur entraînement différentiel dans la colonne, qu'ils parcourent à des vitesses différentes, selon leurs affinités avec la phase stationnaire (leurs tailles, leurs structures ou leurs polarités). À leur arrivée en bout de colonne, leurs quantités relatives sont mesurées à l'aide d'un détecteur.

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

Chaque constituant du mélange analysé est caractérisé par un coefficient de distribution (aussi appelé *coefficient de distribution de Nernst K*). Celui-ci quantifie le rapport de concentration du constituant entre la phase mobile et la phase stationnaire et se définit comme suit :

$$K = C_s / C_m$$

(C_s et C_m représentent les concentrations du constituant dans la phase stationnaire et dans la phase mobile, respectivement).

IV.3. Classification des méthodes chromatographiques

Il existe différents types de chromatographie, pouvant être classés selon trois modalités différentes :

- Selon la nature physique des phases mobile et stationnaire,
- Selon le procédé opératoire,
- Selon le phénomène mis en œuvre.

IV.3.1. Classification selon la nature physique des phases

On distingue :

➤ **La chromatographie en phase gazeuse (CPG) :**

Développée à partir de 1952 par *A. J. P Martin* et *R. L. M. Synge*, la CPG utilise comme phase mobile un gaz inerte de haute pureté et de faible viscosité (gaz vecteur ou gaz porteur). Le type de gaz utilisé (hélium, azote, argon ou hydrogène) dépend du type de détecteur. La phase stationnaire est un liquide visqueux (hydrocarbure à longue chaîne), en suspension sur un solide fin (la silice), emballé dans un tube capillaire long et fin (colonne).

➤ **La chromatographie en phase liquide (CPL) :**

Chromatographie la plus ancienne, où la phase mobile est un liquide (solvant pur : éthanol, méthanol..., ou mélange de solvants) introduit dans la colonne à débit constant et poussé par une pompe sous haute pression. La phase stationnaire est un solide divisé, qui est soit placé dans un tube (colonne), soit fixé sur une surface inerte. La séparation des analytes s'opère selon leurs interactions chimiques ou physiques avec chacune des deux phases.

➤ **La chromatographie en phase supercritique (CPS) :**

Mise en œuvre pour la première fois en 1962 par *Ernst Klesper*, elle utilise un fluide

supercritique tel que le dioxyde de carbone comme phase mobile. Combinant à la fois les propriétés physiques des liquides et des gaz, le CO₂ supercritique présente plusieurs avantages, dont celui d'éviter l'emploi de solvants, de permettre un transfert de masse rapide et de réduire considérablement les temps d'analyse. La CPS utilise les mêmes géométries de colonnes et la même variété de phases stationnaires que la chromatographie en phase liquide.

IV.3.2. Classification selon le procédé opératoire

On distingue :

➤ ***La chromatographie sur colonne (CC, HPLC, CPG)¹ :***

Chromatographies sur colonne classique (CC), en phase liquide à haute performance (HPLC) ou en phase gazeuse (CPG ou GC). La phase stationnaire est contenue dans une colonne cylindrique en verre ou en métal, et la phase mobile progresse par gravité ou différence de pression.

➤ ***La chromatographie planaire (CCM, CP) :***

La phase stationnaire est sur la surface d'un support plat (chromatographie sur couche mince : CCM) ou dans une feuille de cellulose poreuse (chromatographie sur papier : CP) et la phase mobile se déplace par capillarité ou par gravité.

IV.3.3. Classification selon le phénomène chromatographique mis en œuvre

Selon le phénomène de séparation (mécanisme de séparation dépendant de la nature et de la structure de la phase stationnaire) on distingue :

➤ ***La chromatographie de partage (LLC, GLC) :***

Elle est basée sur le partage des solutés entre deux phases non miscibles : l'une mobile et l'autre stationnaire, la phase stationnaire étant un liquide non miscible avec la phase mobile (mise en jeu de coefficients de partage).

➤ ***La chromatographie d'adsorption (LSC, GSC) :***

Elle est basée sur le partage des solutés entre l'adsorbant solide fixé sur un support (phase stationnaire) et la phase mobile liquide. Chacun des solutés est soumis à une force de rétention par adsorption et une force d'entraînement par la phase mobile.

¹ ***Abréviations anglaises, les plus fréquemment utilisées***

➤ **La chromatographie d'échange d'ions (IEC) :**

Elle est destinée à séparer les composés ionisés selon leurs groupes chargés respectifs. Les ions de l'analyte subissent des interactions ioniques avec des charges opposées fixées sur la phase stationnaire, ce qui entraîne leur rétention. La phase stationnaire est ici constituée d'une matrice immobile contenant des groupes fonctionnels chargés.

➤ **La chromatographie d'exclusion (SEC) :**

Elle est basée sur la différence de pénétration des molécules de l'échantillon dans la phase stationnaire poreuse, qui se comporte comme un tamis et sépare les composés en solution dans la phase mobile en fonction de leur taille. On parle aussi de chromatographie par perméation de gel (GPC).

IV.4. Terminologie propre à la chromatographie

IV.4.1. Terminologie générale

- **Chromatogramme :**

Diagramme résultant d'une chromatographie, qui traduit la variation au cours du temps d'un paramètre relié à la concentration instantanée du soluté en sortie de colonne. Le temps (ou très rarement le volume d'élution) est porté en abscisse et l'intensité du signal de détection en ordonnée. Ce graphique est utilisé à la fois en analyse qualitative (identification des composés par la position du pic) et quantitative (évaluation de la concentration ou de la masse d'un composé à travers l'aire des pics).

- **Colonne chromatographique :**

Tube de diamètres et longueurs variables, en verre ou en acier inoxydable, à l'intérieur duquel s'opèrent les séparations chromatographiques.

- **Elution :**

Entraînement d'un soluté à travers la phase stationnaire par le mouvement de la phase mobile.

- **Phase mobile :**

Phase qui se déplace au contact de la phase stationnaire, en entraînant les solutés à travers la colonne. Elle peut être un liquide (éluant pour la chromatographie en phase liquide) ou un gaz (gaz vecteur pour la chromatographie en phase gazeuse).

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

- **Phase stationnaire :**

Phase fixée sur un support (colonne ou surface plane). Par ses affinités avec les constituants d'un mélange, la phase stationnaire va permettre leur séparation quand la phase mobile les déplace. Elle peut être sous forme :

- D'un solide doué de propriétés adsorbantes (chromatographie d'adsorption),
- D'un liquide non miscible à l'éluant immobilisé sur un support solide inerte (chromatographie de partage),
- D'un gel constituant un tamis (chromatographie par perméation de gel ou d'exclusion),
- D'une résine échangeuse d'ions (chromatographie par échange d'ions).

- **Vitesse linéaire moyenne du soluté et de la phase mobile :**

- La vitesse linéaire moyenne de progression du soluté (V) est donnée par la relation :

$$V = L / t_r$$

(L : longueur de la colonne).

- La vitesse linéaire moyenne de la phase mobile (u) est :

$$u = L / t_m$$

- **Coefficient de partage (ou de distribution) (K ou P) :**

Paramètre (noté K ou P) qui définit la répartition d'un soluté entre la phase mobile et la phase stationnaire pendant le déplacement à travers le système chromatographique. Il est défini comme étant le rapport des concentrations du soluté dans les deux phases :

$$K = C_s / C_m$$

(C_s et C_m représentent les concentrations du soluté dans la phase stationnaire et dans la phase mobile, respectivement).

IV.4.2. Grandeurs de rétention

- **Temps de rétention (t_r) :**

Temps mis par le soluté pour sortir de la colonne (ou temps écoulé entre l'injection et le maximum du pic du composé élué). Il est déterminé au sommet du pic chromatographique. Il est caractéristique d'une espèce pour des conditions d'analyse données et peut servir à l'analyse qualitative (figure 28).

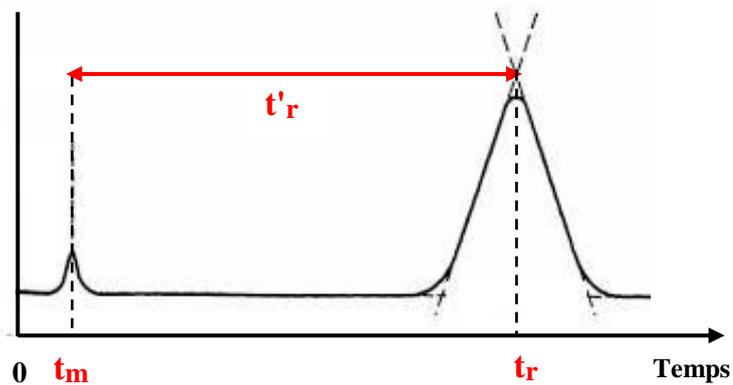


Figure 28 : Exemple de chromatogramme

- **Temps de rétention réduit (t'_r) :**

Fraction de temps que met le soluté pour traverser la phase stationnaire (temps de « séjour » du composé dans la phase stationnaire) :

$$t'_r = t_r - t_m$$

(t_r et t_m représentent le temps de rétention et le temps mort, respectivement).

- **Temps mort (t_m) :**

Temps que met la phase mobile pour traverser la colonne.

- **Volume mort (V_m) :**

Volume de phase mobile qui passe à travers la colonne pour aller d'une extrémité à l'autre de la colonne (pendant le temps t_m) (ou volume occupé par la phase mobile dans une colonne) :

$$V_m = t_m \times D$$

(D : débit de la phase mobile (constant)).

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

- **Volume de rétention (V_r) :**

Volume de phase mobile nécessaire pour faire migrer le soluté d'une extrémité à l'autre de la colonne. Il est associé au temps de rétention (t_r) d'un soluté, et correspond, sur le chromatogramme, au volume de la phase mobile qui s'est écoulé entre l'instant de l'injection et celui correspondant au maximum du pic. Si le débit D est constant :

$$V_r = t_r \times D$$

- **Volume de rétention réduit (V'_r) :**

Volume de phase mobile qui doit passer à travers la colonne pour éluer le soluté S :

$$V'_r = V_r - V_m$$

- **Facteur de rétention (k') (ou facteur de capacité) :**

Facteur caractérisant la rétention d'un soluté dans la phase stationnaire. Il exprime la capacité plus ou moins grande de la colonne à retenir chaque constituant analysé. Indépendant de la longueur de la colonne et du débit de la phase mobile, il est défini par la relation :

$$k' = (t_r - t_m) / t_m = (V_r - V_m) / V_m$$

IV.4.3. Grandeurs caractérisant les performances de la colonne

- **Facteur de séparation (ou sélectivité) (α) :**

La sélectivité définit la position relative de 2 pics, le pic du soluté A sortant avant le pic du soluté B (figure 29). Ce facteur rend compte de la "proximité" des pics (sans tenir compte de leur forme), et peut être exprimé en fonction des temps de rétention ou des coefficients de distribution des 2 solutés :

$$\alpha = t'_{r(B)} / t'_{r(A)} = k'(B) / k'(A) \quad ; \quad (t'_{r(B)} > t'_{r(A)})$$

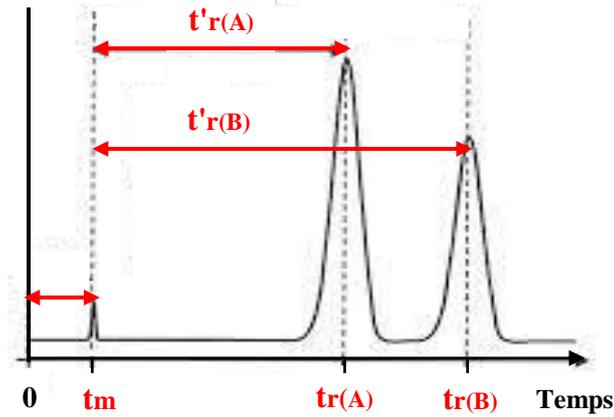


Figure 29 : Séparation de 2 solutés A et B d'un mélange

- **Facteur de résolution (R_s) :**

Paramètre qui définit la plus ou moins bonne séparation de 2 solutés, et donc la pureté des produits collectés (figure 30). Il est exprimé mathématiquement par la relation :

$$R_s = 2 (t_r(B) - t_r(A)) / (\omega_A + \omega_B)$$

(ω : Largeur à la base du pic).

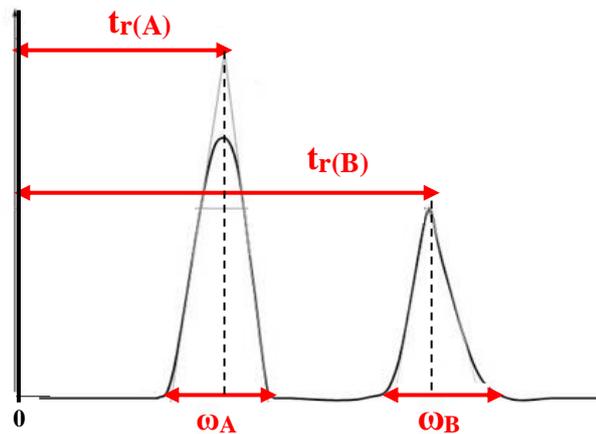


Figure 30 : Résolution des pics de 2 solutés

Pour une bonne résolution, R_s doit être supérieur à 1.5 (figure 31). On optimise le facteur de résolution en modifiant les débits, les températures ou en changeant de type de colonne.

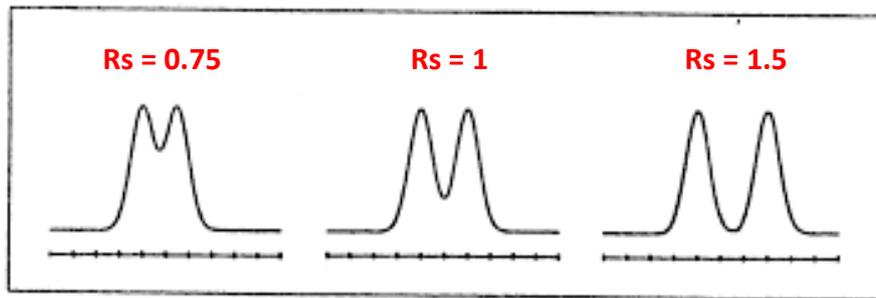


Figure 31 : Influence du facteur R_s sur la qualité de séparation de 2 pics

- **Plateau théorique :**

Portion de phase stationnaire dans laquelle un soluté est en équilibre de répartition entre la phase mobile et la phase stationnaire.

Une colonne de N plateaux théoriques est une colonne divisée en N petits disques cylindriques successifs (figure 32). On considère que la phase mobile progresse non pas de façon continue, mais par sauts successifs d'un plateau théorique à l'autre. Dans chaque plateau théorique, on observe une rétention du soluté S , du fait de l'équilibre de ce produit entre la phase mobile et la phase stationnaire.

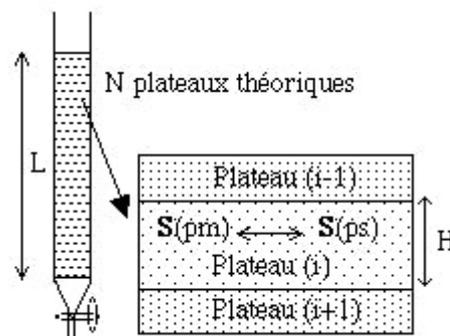


Figure 32 : Modèle des plateaux théoriques

- **Nombre de plateaux théoriques (N_{th}) :**

Nombre de fois qu'un soluté est échangé entre la phase mobile et la phase stationnaire (le passage d'un composé de la phase mobile vers la phase stationnaire puis retour vers la phase mobile représente un plateau). L'efficacité d'une colonne se détermine généralement par le nombre de plateaux théoriques que la colonne aura vis-à-vis du composé considéré.

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

Selon les grandeurs expérimentales, le nombre de plateaux théoriques (N_{th}) est calculé à l'aide des relations suivantes :

$$N_{th} = (t_r / \sigma)^2 = 16 (t_r / \omega)^2 = 5.54 (t_r / \delta)^2$$

(ω : largeur à la base du pic ; σ : largeur à mi-hauteur du pic ; δ : largeur à mi-hauteur du pic).

Plus N_{th} est élevé, plus la colonne est efficace et plus le pic est fin (bonne résolution).

- **Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique (HEPT) :**

Pour exprimer l'efficacité d'une colonne de longueur L et de N_{th} plateaux théoriques, on définit la hauteur H équivalente à un plateau théorique (figure 33) :

$$HEPT = L / N_{th}$$

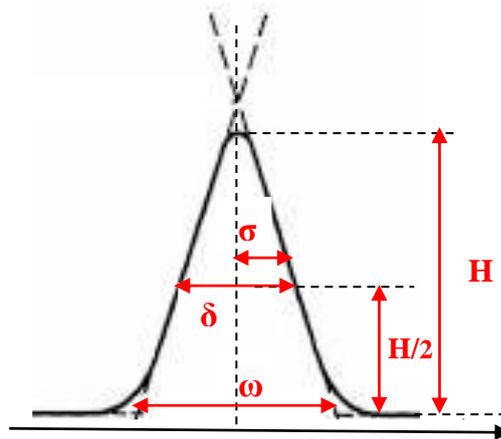


Figure 33 : Caractéristiques d'un pic chromatographique

- **Courbe de Gauss :**

Les pics chromatographiques ont une allure gaussienne ; l'aire des pics est calculée en assimilant le pic à un triangle (figure 33).

La largeur d'une courbe de Gauss est définie par : σ , δ et ω .

σ = écart-type : 1/2 largeur du pic à la hauteur des points d'inflexion, à 60,6 % de la hauteur,

$\delta = 2,35 \sigma$: largeur à mi-hauteur,

$\omega = 4 \sigma = 1,7 \delta$: largeur mesurée à 13,5 % de la hauteur, largeur à la base du pic.

IV.5. Différents types de chromatographie

Parmi les différentes classifications des techniques chromatographiques, celle fondée sur la nature de la phase mobile permet de distinguer, globalement, deux grandes familles :

- *Les chromatographies en phase gazeuse (CPG)* : la phase mobile est un gaz tel que l'hélium, l'hydrogène, l'argon et l'azote.

- *Les chromatographies en phase liquide (CPL)* : la phase mobile est un liquide tel que les solutions de PBS éthanol, méthanol, etc.

IV.5.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG / GC)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique de séparation utilisée pour la séparation des mélanges de substances volatiles et thermostables. Cette technique a été développée dans les années 1950 par les chimistes britanniques *A. J. P Martin* et *R. L. M. Synge*, récipiendaires du prix Nobel de chimie 1952 pour l'invention de la chromatographie de partage. Dotée d'une sensibilité et d'un pouvoir de séparation exceptionnels, elle est largement utilisée dans des domaines aussi nombreux et variés que la chimie fine, l'agro-alimentaire, l'industrie pétrolière, l'industrie des matières plastiques, l'industrie pharmaceutique,...

Dans la CPG, la phase mobile est un gaz vecteur. On distingue :

➤ *La chromatographie gaz-liquide (GLC)* :

C'est une chromatographie de partage où la phase stationnaire est un liquide immobilisé sur un support solide par imprégnation ou par greffage sur la paroi interne de la colonne (colonnes capillaires). La substance greffée sur la colonne est en général un polymère siliconé, inerte chimiquement et tenant bien la température.

➤ *La chromatographie gaz-solide (GSC)* :

C'est une chromatographie d'adsorption où la phase stationnaire est un solide poreux (polymère poreux ou substance adsorbante, telle que la silice ou un tamis moléculaire), réservé à l'analyse de mélanges de molécules très volatiles (gaz, hydrocarbures légers...).

IV.5.1.1. Description et principe de la technique

Le principe de la chromatographie en phase gazeuse est basé sur l'utilisation d'un gaz vecteur (gaz non réactif de haute pureté, pouvant être l'azote, l'argon, l'hélium ou l'hydrogène selon le détecteur utilisé) comme une phase mobile. La phase stationnaire est soit

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

un adsorbant solide (chromatographie gaz-solide : GSC), soit un liquide adsorbé sur un support inerte (chromatographie gaz-liquide : GLC). La séparation repose sur la différence d'affinité des constituants d'un mélange pour la phase mobile et pour la phase stationnaire.

Le mélange à analyser est injecté à l'aide d'une micro seringue. Une fois vaporisés par l'injecteur, les composés sont entraînés dans la colonne par le gaz vecteur et séparés les uns des autres en fonction de leur affinité avec la phase stationnaire, avant d'être détectés en sortie de colonne. Les appareils de CPG sont fréquemment couplés avec un spectromètre de masse (CPG-SM, ou GC-MS), ce qui permet d'identifier les analytes au fur et à mesure de leur élution.

Qu'il s'agisse de la GLC ou de la GSC, la phase stationnaire provoque un phénomène de rétention chromatographique. Il en résulte que les constituants du mélange injecté se déplacent tous moins vite que la phase mobile et que leurs vitesses de migration respectives sont inégales. A la sortie de la colonne se trouve un détecteur relié à un enregistreur. Lorsqu'un constituant du mélange arrive au niveau du détecteur, celui-ci transmet un signal à l'enregistreur, qui l'affiche sous forme d'un pic chromatographique. Un exemple de chromatogramme est donné en figure 34.

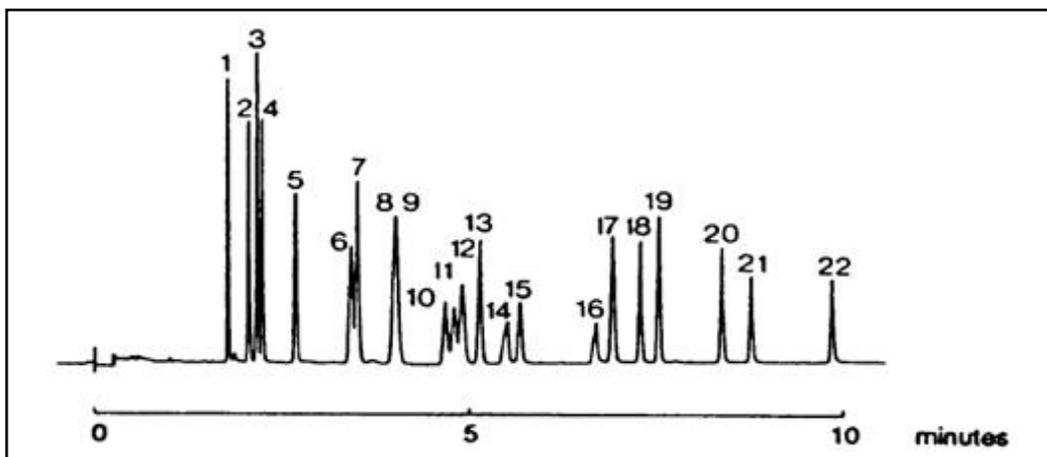


Figure 34 : Chromatogramme en CPG d'un mélange de 22 constituants

Le temps de sortie de chaque constituant, nommé temps de rétention (t_r), caractérise de façon qualitative le constituant. L'aire du pic permet, par ailleurs, de déterminer la concentration massique de chaque soluté dans le mélange analysé (analyse quantitative).

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

IV.5.1.2. Appareillage

Le chromatographe, appareil utilisé pour réaliser une analyse par CPG, est constitué de trois éléments essentiels : l'injecteur, le four contenant la colonne et le détecteur (figure 35) :

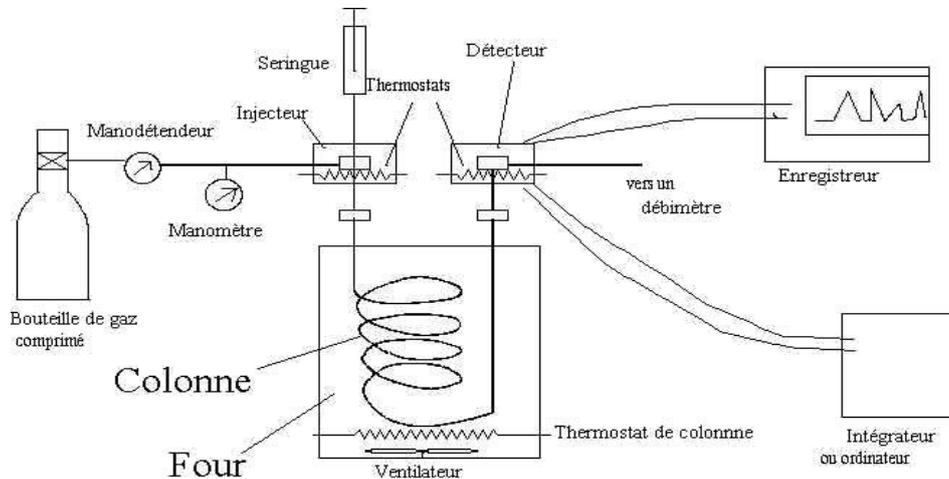


Figure 35 : Schéma d'un chromatographe en phase gazeuse

a) L'injecteur :

Il permet d'introduire un liquide qui doit être vaporisé instantanément avant d'être transféré dans la colonne (figure 36). En plus d'être la porte d'entrée de l'échantillon dans le chromatographe, l'injecteur a deux autres fonctions : vaporiser et entraîner en tête de colonne l'échantillon mélangé au gaz vecteur. La température de l'injecteur doit être réglée de manière à entraîner la vaporisation de tous les analytes de l'échantillon : elle est généralement maintenue à 50 °C au-dessus de la température d'ébullition de l'analyte le moins volatil.

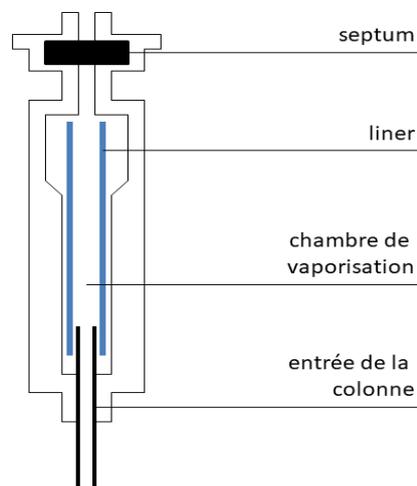


Figure 36 : Schéma d'un injecteur

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

Les caractéristiques des injecteurs, ainsi que les modes d'injection, diffèrent suivant les types de colonnes auxquels ils sont réunis. L'injection de l'échantillon peut se faire manuellement pour une vitesse d'analyse faible, ou bien être automatique pour les applications à vitesse d'analyse élevée. Certains injecteurs sont munis d'une fonction « *Split / Splitless* », qui permet de ne pas injecter la totalité de l'échantillon ; cela peut être utile dans le cas d'échantillon en solution concentrée, pour éviter de surcharger la colonne.

b) La colonne :

Il existe deux types de colonne : les colonnes remplies et les colonnes capillaires.

- Les colonnes remplies ont un diamètre de quelques millimètres, une longueur de l'ordre du mètre, et sont enroulées sous forme hélicoïdale (figure 37). Elles sont remplies d'un support poreux, inerte et stable à température élevée, imprégné de 5 à 20% de phase stationnaire. Le support le plus utilisé est la diatomite, roche sédimentaire constituée par l'accumulation de coquilles poreuses de diatomées dans les lacs et les mers. Les colonnes remplies sont aujourd'hui supplantées par les colonnes capillaires, dont le pouvoir de résolution est supérieur.

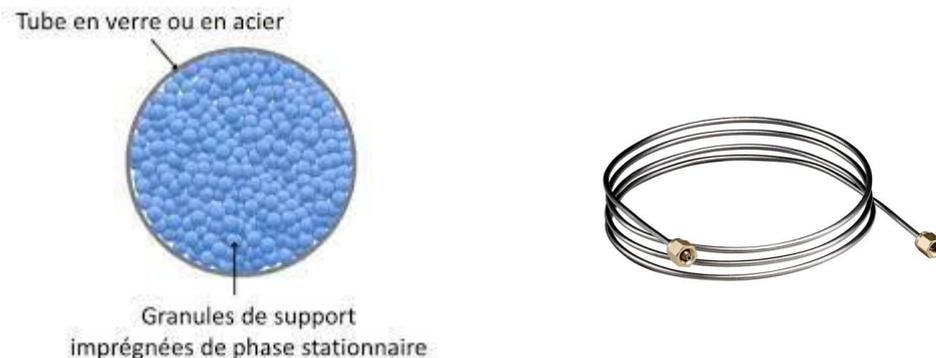


Figure 37 : Schéma (en coupe) et photo d'une colonne remplie

- Les colonnes capillaires sont de simples tubes d'acier inoxydable, de verre ou de silice fondue (matériau inerte vis-à-vis de la phase stationnaire et des échantillons), de diamètre intérieur compris entre 0,1 et 0,5 mm et d'une longueur typique de plusieurs dizaines de mètres (pouvant aller jusqu'à 100 m) (figure 38). Pour tenir dans l'appareil, la colonne est enroulée, avec des spirales ayant 10 à 30 cm de diamètre. La surface interne de ce tube est recouverte d'une faible épaisseur de phase stationnaire (film liquide de 0,1 à 5 μm d'épaisseur), soit déposée soit greffée sur la surface interne de la colonne.

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

La quantité de phase stationnaire étant faible, de faibles volumes d'échantillon ($< 1 \mu\text{L}$) doivent être injectés pour éviter la saturation de la colonne (en mode « *split* », un volume d'échantillon plus important peut être injecté, vaporisé, puis en partie transféré vers la colonne).



Figure 38 : Schéma (en coupe) et photo d'une colonne capillaire

c) Le four :

Le four est une enceinte thermostatée dans laquelle se trouve la colonne (figure 39). Il permet une programmation de température ajustable de 20°C (-100°C pour certains systèmes) à 450°C , et qui est également équipé d'un système de refroidissement rapide. La programmation de la température du four est un facteur essentiel à l'obtention d'une bonne séparation avec une durée d'analyse acceptable. En effet, plus la température du four est élevée, plus les analytes se déplacent rapidement dans la colonne, moins ils interagissent avec la phase stationnaire, et donc moins bonne est leur séparation. A l'inverse, plus la température du four est basse, meilleure est la séparation, mais plus longue est l'analyse. Le choix de la température est donc un compromis entre la durée de l'analyse et le niveau de séparation désiré.

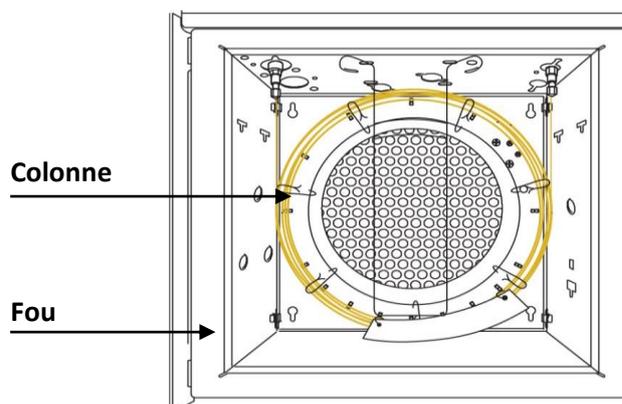


Figure 39 : Colonnes et four

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

Un gradient de température peut être appliqué au four pour éluer tous les composés (*Isotherme* : la température est constante tout au long de l'analyse ; *Gradient* : la température s'élève pendant l'analyse).

d) Le détecteur :

En sortie de colonne, les analytes rencontrent le détecteur, aujourd'hui généralement couplé à un enregistreur numérique du signal qui permet son traitement. Cet élément mesure en continu une grandeur proportionnelle à la quantité des différents analytes. Actuellement deux types de détecteurs sont utilisés sur la plateforme de chimie analytique :

- *Le TCD (détecteur à conductibilité thermique), ou catharomètre :*

Il est basé sur la mesure des variations de conductibilité thermique des mélanges gazeux en fonction de leur composition (figure 40). Le catharomètre est à réponse universelle, mais relativement peu sensible. Il utilise comme gaz vecteurs l'hélium et l'hydrogène.

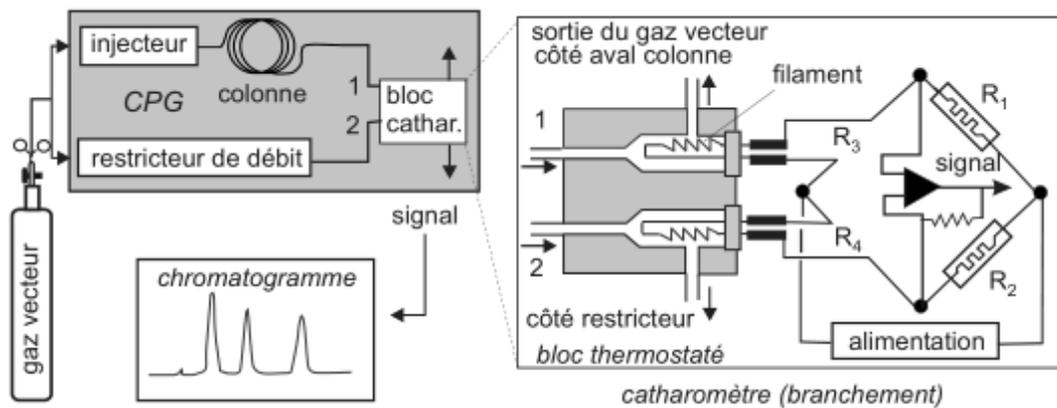


Figure 40 : Détecteur à conductibilité thermique (TCD)

- *Le FID (détecteur à ionisation de flamme) :*

Il est beaucoup plus sensible que le catharomètre, mais ne donne de réponse qu'aux composés organiques (figure 41). L'échantillon apporté par le gaz vecteur après séparation sur la colonne est brûlé dans une flamme d'hydrogène-air. Cette combustion forme des ions et particules chargées, responsables du passage d'un courant d'ionisation, entre deux électrodes, que l'on amplifie grâce à un électromètre. Il est typiquement utilisé avec les gaz vecteurs azote, hélium et hydrogène.

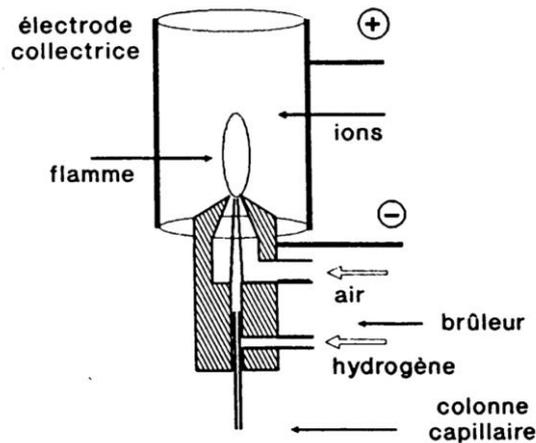


Figure 41 : Détecteur à ionisation de flamme (FID)

- D'autres types de détecteurs sont utilisés en chromatographie phase gazeuse dont :

- *Le spectromètre de masse (GC / MS)* : Plus coûteux que le FID et nécessitant une maintenance régulière, le couplage GC / MS est le plus utilisé en recherche. Parmi les nombreux avantages qu'il présente, on peut citer celui d'identifier les analytes au fur et à mesure de leur élution, de détecter les composés à l'état de traces (concentrations < 1 pg), de réclamer peu d'échantillon (volume injecté de l'ordre du μL), d'être rapide et hautement sélectif, puisqu'il associe les caractéristiques de la chromatographie (séparation des différents constituants d'un mélange) à une analyse par spectrométrie de masse (détermination des masses moléculaires des constituants).

- *Le détecteur thermoionique (NPD)* : Spécifique des composés azotés, phosphorés, ou halogénés, il utilise comme gaz vecteur l'azote. Il est utilisé dans les secteurs pharmaceutique, agroalimentaire et de l'environnement.

- *Le détecteur à capture d'électrons (CED)* : Permet la détection de traces de composés organiques possédant des groupes électroattracteurs (halogènes, nitro,...), pour lesquels il est sensible et hautement sélectif. Il est généralement utilisé par les professionnels de l'industrie pharmaceutique, du secteur de l'environnement et de l'investigation médico-légale.

- *Le détecteur à photométrie de flamme (FPD)* : Utilisé pour l'étude de divers métaux, tels que le bore, l'arsenic, le chrome, l'étain, et de composés contenant du phosphore ou du soufre. Il est utilisé pratiquement dans tous les secteurs et notamment dans les domaines pétroliers, environnementaux, pharmaceutiques, agroalimentaires...

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

- *Le détecteur à photoionisation (PID)* : Convient à la détection de faibles concentrations de composés organiques volatils (COV), ainsi que certains composés inorganiques, dans les plages ppm et ppb.

- *Le détecteur d'émission atomique (AED)* : Il est principalement utilisé pour l'étude de combustibles, notamment le diesel, le pétrole et l'essence, et sert parfois à la détection de composés organiques volatils contenus dans l'eau.

IV.5.1.3. Domaines d'application

Compte tenu de ses nombreux avantages, la chromatographie en phase gazeuse est largement utilisée dans des domaines d'application divers et variés, aussi bien en recherche scientifique que dans le domaine industriel. Parmi ces domaines d'application, on peut citer :

- *Recherche scientifique* : Utilisation en chimie analytique pour séparer et analyser les composés (gaz ou liquides) contenus dans un échantillon, susceptibles d'être vaporisés sans se décomposer. Utilisation pour tester la pureté d'une substance particulière, ou pour séparer les différents constituants d'un mélange.
- *Industrie chimique* : Application dans de nombreuses industries pour le contrôle qualité, et pour l'identification et/ou la quantification des constituants d'un mélange.
- *Industrie alimentaire* : Evaluation de la sécurité et de la palatabilité des produits alimentaires (en analysant les niveaux d'additifs et de contaminants, et en s'assurant qu'il y a suffisamment de molécules aromatiques ou de saveurs).
- *Industrie cosmétique et parfums* : Séparation et identification des huiles essentielles issues de plantes aromatiques et cosmétiques par couplage CPG / SM. Détermination de la composition d'huiles essentielles, de parfums.
- *Industrie pharmaceutique* : Recherches de substances biochimiques et biologiques pour l'élaboration de nouveaux médicaments notamment par couplage CPG / SM. Utilisation pour le contrôle qualité des matières premières et produits finis (identification et quantification de très faibles quantités d'impuretés). Contrôle de certains gaz à usage médical (protoxyde d'azote...). Vérification de la présence de solvants résiduels dans les principes actifs. Utilisation pour les analyses de toxicologie, de screening pharmacologique ou de biodisponibilité.

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

- *Energie* : Utilisation pour le contrôle et l'optimisation des procédés dans le domaine de la pétrochimie et du raffinage. Analyse des hydrocarbures liquides et gazeux dans l'industrie pétrolière et la pétrochimie. Recherche de certains éléments particulièrement prisés dans les produits pétroliers (soufre, azote, oxygène et composés halogénés).
- *Secteur environnemental* : Vérification de la présence de polluants environnementaux dans les systèmes d'eau et les habitats naturels. Analyse des polluants organiques volatils et semi-volatils : COV, HAP, alcanes, dosage et identification des pesticides, analyse des gaz (CO₂, N₂...).
- *Exploration spatiale* : Caractérisation de certaines espèces moléculaires provenant d'expériences de biologie embarquées dans les sondes spatiales. Recherche de molécules organiques dans les échantillons de sol prélevés par les atterrisseurs.
- *Police scientifique* : Utilisation pour tester le dopage, la consommation de drogues et la présence d'exhausteurs de performance dans les grands événements sportifs. Utilisation dans les services de sécurité des aéroports et en médecine légale.

IV.5.2. Chromatographie en phase liquide (CPL / LC)

La chromatographie en phase liquide (CPL) est une technique de séparation complémentaire de la chromatographie en phase gazeuse (CPG) pour l'analyse de solutés peu volatils ou thermodégradables. Elle se distingue de la CPG par la variété des phases stationnaires utilisées, et donc par la nature des interactions mises en jeu, ainsi que par une température moins élevée, ce qui accroît la force de ces interactions et augmente la sélectivité.

C'est une technique d'analyse quantitative, qualitative et séparative largement utilisée en chimie analytique, ainsi qu'en chimie organique et en biochimie. Elle est aussi devenue la technique analytique de référence dans de nombreux domaines requérant la séparation et la quantification de composés présents dans différentes matrices (cosmétiques, pharmaceutiques, environnementales, biologiques etc.).

Il existe différents types de chromatographies en phase liquide, suivant la méthode de séparation utilisée :

- Chromatographie sur couche mince (CCM),
- Chromatographie sur papier (CP),

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

- Chromatographie en phase liquide sur colonne classique (CC),
- Chromatographie liquide à haute pression / performance (HPLC),
- Chromatographie d'exclusion ou par perméation de gel (SEC),
- Chromatographie par échange d'ions (IEX),
- Chromatographie par adsorption.

D'une manière générale, la chromatographie en phase liquide repose sur la séparation de composés entraînés par un liquide (phase mobile) à travers un adsorbant solide (phase stationnaire) qui est soit placé dans un tube (colonne chromatographique), soit fixé sur une surface inerte. La séparation des constituants d'un mélange s'opère selon leurs interactions chimiques ou physiques avec la phase mobile et la phase stationnaire.

IV.5.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La Chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique de chromatographie planaire, dont la phase mobile est liquide (solvant). Elle est principalement utilisée dans les laboratoires, car facile à mettre en œuvre, ne nécessite que peu de matériel et donne des résultats facilement interprétables. Elle est couramment utilisée pour séparer les composés dans un but d'analyse (CCM analytique) ou de purification (CCM préparative).

a) Description et principe de la technique

La CCM repose sur le principe de la chromatographie d'adsorption (polarité des molécules), selon lequel les constituants d'un mélange se séparent entre une phase stationnaire et une phase mobile liquide, selon leurs affinités différentielles pour les deux phases. La phase stationnaire dans ce cas est étalée, de façon uniforme, sur une surface plane (plaque en verre, en matière plastique ou feuille d'aluminium) qui est recouverte d'une mince couche de 0.2 à 0.3 mm d'épaisseur de gel de silice, de cellulose, d'alumine ou même de grains de résines échangeuses d'ions.

La technique consiste à déposer sur la plaque une tache et à la laisser éluer en la trempant dans un solvant ou un mélange de solvant (éluant) (figure 42). L'éluant diffuse par capillarité à travers la phase stationnaire. Chacun des constituants de l'échantillon est alors soumis à l'action de rétention de la phase stationnaire (contrôlée par des phénomènes d'adsorption) et à la force d'entraînement par la phase mobile. Chaque constituant se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant. Cette vitesse dépend à la fois des interactions électrostatiques (de type liaison hydrogène) entre le constituant et la phase stationnaire polaire

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

et de sa solubilité dans la phase mobile, les substances de faible polarité migrant plus rapidement que les constituants polaires.

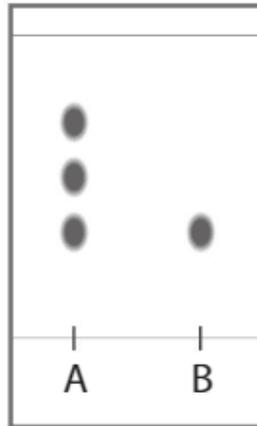


Figure 42 : Schéma d'une plaque chromatographique

La CCM peut aussi avoir un but préparatif, notamment pour purifier et récupérer de petites quantités de produits de synthèse ou de composés naturels. Dans ce cas, des plaques de verre sont souvent utilisées comme support, sur lesquelles est étalée une couche d'adsorbant d'une épaisseur variant entre 0.5 et 2 mm. Après migration, la bande contenant le produit purifié est grattée, puis le soluté est récupéré par solubilisation dans un solvant adéquat, suivie d'une simple filtration par gravité pour éliminer la silice.

- **Choix de l'éluant :**

Le choix de l'éluant est crucial car il permet d'ajuster les vitesses différentielles de migration des composés. L'éluant est choisi en fonction de la polarité des composés à séparer. Il est constitué d'un solvant ou d'un mélange de solvants miscibles (solvants polaires et apolaires).

- **Révélation des taches :**

Dans le cas de solutés incolores, la visualisation des taches peut se faire de différentes manières :

- *Par fluorescence* : Dans certaines plaques, un agent de fluorescence est incorporé à la phase stationnaire, ce qui permet de révéler les taches sous une lampe UV.

- *A l'aide d'un réactif chimique* : Dans le cas où les solutés n'absorbent pas en UV, différents réactifs chimiques sont alors utilisés pour la révélation. Les réactifs les plus

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

couramment utilisés sont le diiode, le permanganate de potassium ou l'acide phosphomolybdique. Par ailleurs, de nombreux révélateurs spécifiques de la présence de fonctions chimiques sont utilisés, dont la 2,4-DNPH pour les aldéhydes et les cétones, le réactif de Dragendorff pour les alcaloïdes (notamment en pharmacognosie), la ninhydrine pour les acides aminés (en microbiologie), etc.

- **Identification des constituants :**

L'identification des constituants du mélange se fait par comparaison avec des témoins, en calculant le R_f (rapport frontal ou facteur de rétention) de chaque soluté. Le facteur de rétention mesure le déplacement des solutés sur la plaque CCM. Sa valeur, comprise entre 0 et 1, est obtenue en divisant la hauteur de migration de la tâche par la hauteur de migration de l'éluant (figure 43). Il est caractéristique du soluté, du matériau de la plaque et de l'éluant :

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par le constituant}}{\text{distance parcourue par l'éluant}}$$

La phase stationnaire étant plus polaire que la phase mobile, les solutés peu polaires tendent à migrer plus rapidement sur la plaque, donnant un R_f élevé, alors que les solutés polaires sont fortement adsorbés, migrent plus lentement et donnent un R_f plus faible.

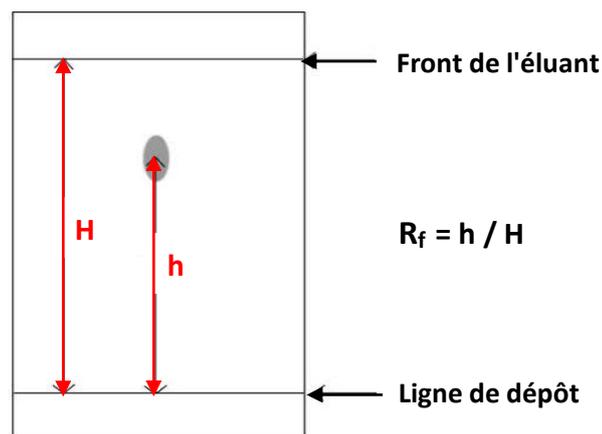


Figure 43 : Rapport frontal d'un soluté

b) Appareillage

L'appareillage utilisé pour la CCM est relativement simple (figure 44) ; il est constitué :

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

- **D'une plaque** (verre, matière plastique ou feuille d'aluminium) sur laquelle est étalée uniformément une couche mince de matériau adsorbant (gel de silice ou alumine) constituant la phase stationnaire,

- **D'une cuve chromatographique**, sous forme d'un récipient habituellement en verre de forme variable, fermé par un couvercle étanche,

- **De l'échantillon** (environ 1 μL), sous forme de solution diluée déposée à l'aide d'un capillaire sur la ligne de dépôt, préalablement tracée, de la plaque CCM qui est plongée dans la cuve contenant la phase mobile,

- **De l'éluant**, solvant pur ou mélange de solvants, qui migre lentement le long de la plaque en entraînant les différents constituants de l'échantillon.

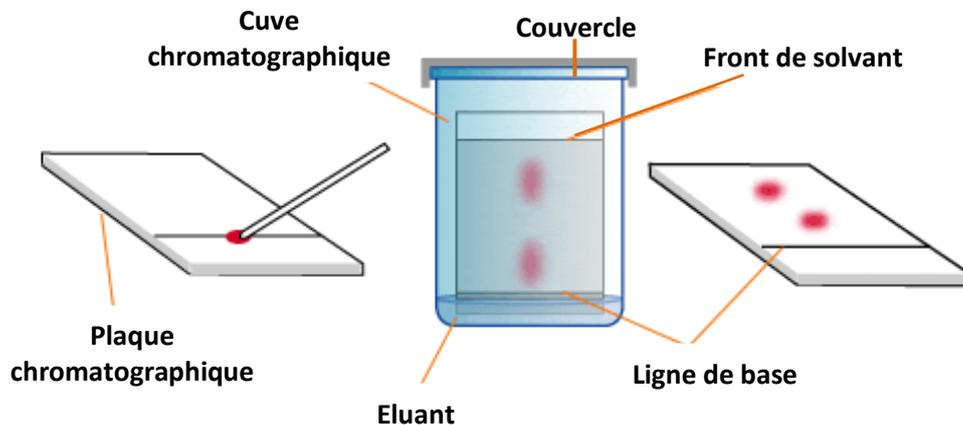


Figure 44 : Appareillage utilisé en CCM

c) Applications

Facile à mettre en œuvre, rapide, polyvalente (analyses qualitative et quantitative) et peu onéreuse, la CCM est largement utilisée, aussi bien en recherche que dans de nombreux domaines industriels. Parmi les applications types de la CCM on peut citer :

- *L'analyse de résidus médicamenteux et d'antibiotiques dans les échantillons agro-alimentaires et environnementaux,*
- *L'identification et la quantification des colorants, des ingrédients, des conservateurs et des édulcorants dans les produits agro-alimentaire et cosmétiques,*
- *Le contrôle qualité et les tests de pureté sur les formulations pharmaceutiques,*
- *Le criblage rapide et à haut débit avant analyse par HPLC,*
- *L'évaluation de l'avancement des réactions chimiques.*

IV.5.2.2. Chromatographie sur papier (CP)

La chromatographie sur papier (CP) est une technique de chromatographie plane dont la phase mobile est liquide, le plus souvent un solvant organique et l'eau. Elle est principalement utilisée pour l'analyse de composés très polaires, tels les acides aminés, les sucres et les composés polyfonctionnels. Comparée à la CCM, la chromatographie sur papier demande un temps de réalisation nettement plus long et conduit à une moins bonne séparation.

a) Description et principe de la technique

La chromatographie sur papier est une chromatographie de partage basée sur la différence de solubilité des espèces à séparer. La phase mobile est souvent un mélange de solvant organique et d'eau. La phase stationnaire est constituée des molécules d'eau adsorbées par la cellulose du papier ou liées aux molécules de cellulose. On peut utiliser du papier filtre ordinaire, ou mieux, du papier filtre Whatman, ayant un faible taux d'impuretés et dont les caractéristiques sont uniformes.

La solution d'échantillon déposée sur la phase stationnaire et le solvant, en se déplaçant par capillarité, fait migrer les constituants du mélange à des vitesses variables selon leurs solubilités (tout comme dans le cas de la CCM) (figure 45).

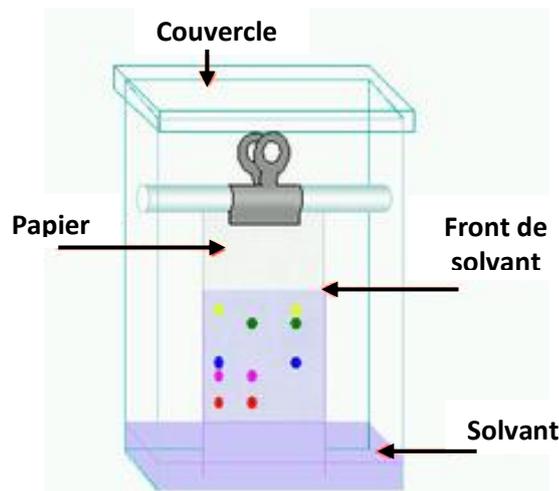


Figure 45 : Schéma d'une chromatographie sur papier

D'une manière générale, les espèces les plus solubles dans l'éluant migrent relativement plus rapidement. A l'inverse, les solutés les plus solubles dans l'eau (ceux pouvant former des associations par liaisons hydrogène avec l'eau) sont fortement retenus par

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

la phase stationnaire et se déplacent donc plus lentement. Les substances peuvent être identifiées en calculant la valeur du rapport frontal (R_f) qui peut être comparée à celles se trouvant dans les tables.

b) Appareillage

Le protocole opératoire de la chromatographie sur papier est identique à celui de la CCM et nécessite un appareillage semblable. La phase stationnaire dans la CCM est constituée d'une couche mince de silice ou d'alumine étalée sur une plaque de verre, de matière plastique ou sur une feuille d'aluminium, alors que de la cellulose de papier filtre est utilisée en chromatographie sur papier.

c) Applications

Malgré l'apparition de la CCM, la chromatographie sur papier conserve toute sa valeur pour la séparation de nombreuses substances, les plus polaires notamment. Parmi les applications de cette technique, on peut citer son utilisation pour :

- *La séparation de pigments colorés* (pigments issus de différents types de feuilles de plantes et d'algues, quelque soit leurs couleurs, tels les chlorophylles et les caroténoïdes),
- *L'analyse des antibiotiques et la détermination des polluants dans l'eau,*
- *L'analyse des empreintes digitales d'ADN et d'ARN* (dans les laboratoires de pathologie et des sciences médico-légales),
- *La détection de la présence ou l'identification de certains composés organiques* (tels que les glucides et les acides aminés, à partir d'un mélange complexe de composés organiques).

IV.5.2.3. Chromatographie sur colonne classique (CC)

La chromatographie sur colonne classique est une technique préparative largement utilisée en chimie et en biochimie pour séparer et isoler les constituants d'un mélange. C'est la technique chromatographique la plus ancienne, dans laquelle les composants d'un échantillon se distribuent sélectivement entre une phase stationnaire contenue dans une colonne en verre et une phase mobile liquide.

a) Description et principe de la technique

La chromatographie sur colonne (CC) est une chromatographie d'adsorption dont le principe de séparation est basé sur la différence d'affinité existant entre les constituants d'un mélange, la phase mobile (un éluant qui les entraîne) et la phase stationnaire (un solide adsorbant qui a tendance à les retenir plus ou moins). Cette technique permet de séparer pratiquement tous les mélanges possibles, à condition de trouver les bonnes conditions.

Expérimentalement, une solution concentrée du mélange à analyser est déposée au sommet d'une colonne de longueur et de section variables, remplie de silice ou d'alumine (phase stationnaire). La séparation des constituants du mélange résulte de l'écoulement continu d'un éluant à travers la colonne par gravité.

b) Appareillage

La chromatographie sur colonne utilise un matériel simple constitué (figure 46) :

- *D'une colonne*, sous forme d'un tube en verre rempli d'adsorbant (phase stationnaire), avec une plaque en verre fritté ou un tampon de laine de verre à la base,
- *D'une phase stationnaire* constituée le plus souvent de gel de silice (ou d'alumine),
- *D'une phase mobile (éluant)*, solvant (ou mélange de solvants ; exemple : cyclohexane / acétate d'éthyle) approprié servant à faire migrer les produits sur la colonne (élution). L'élution peut se faire selon un gradient de solvant polaire, en faisant varier la polarité de l'éluant. L'éluant est recueilli par petites fractions dans des tubes étiquetés.

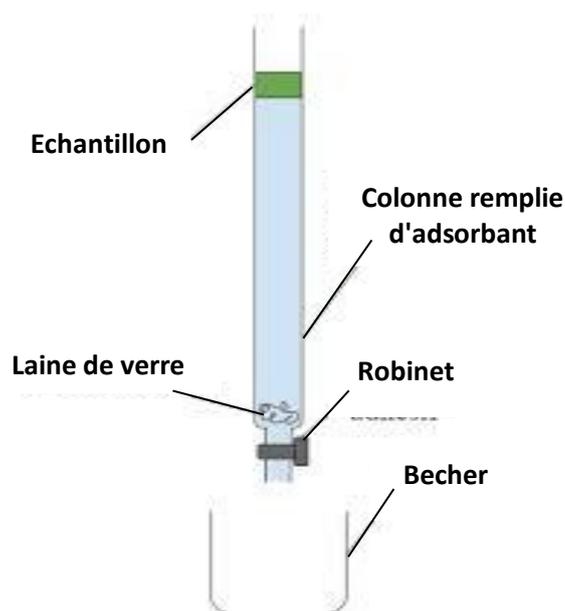


Figure 46 : Schéma d'une colonne chromatographique classique

c) Applications

.Depuis son invention, en 1906, par le botaniste russe *Mikhail Tsvet*, la chromatographie sur colonne n'a pas cessé de voir ses champs d'application s'élargir et s'étendre à des domaines d'activité de plus en plus nombreux et variés. Elle est devenue la technique incontournable pour la séparation et la purification de toute sorte de produits à haut degré de pureté dans différents secteurs parmi lesquels :

- *Les laboratoires de recherche* (chimie, biochimie, médecine, toxicologie, répression des fraudes...),
- *Les industries chimiques et parachimiques* (cosmétiques, produits phytosanitaires, parfums, polymères...),
- *Les industries pharmaceutiques et agroalimentaires* (séparation et purification des médicaments biologiques et de synthèse, séparation de colorants alimentaires),...

Cette généralisation de l'utilisation de la chromatographie sur colonne peut-être liée à quelques avantages indéniables, dont notamment la diversité de ses d'applications potentielles, selon la nature du solvant utilisé, la possibilité de séparer de grandes quantités d'un échantillon, le faible coût de la facilité d'élimination de la phase stationnaire.

Certains inconvénients sont tout de même associés à cette technique, dont la durée de l'élution (plusieurs heures sont parfois nécessaires à certaines séparations), la grande quantité d'adsorbant et d'éluant utilisés et l'absence de détecteur permettant de suivre son développement.

IV.5.2.4. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) compte aujourd'hui parmi les techniques les plus utilisées dans les laboratoires d'analyse chimique, du fait de ses performances et de ses nombreux avantages. Elle constitue, en effet, l'aboutissement de la chromatographie sur colonne classique (CC), dont elle a compensé les lacunes et amélioré les performances, et présente de nombreux avantages par rapport à la chromatographie en phase gazeuse (CPG) (elle est préférée à la CPG dans le cas de composés thermosensibles, de composés très polaires ou de masses molaires élevées).

Parmi les nombreux avantages de la HPLC on peut citer :

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

- Son extrême précision et sa grande sensibilité, permettant l'analyse et l'identification de composés à l'état de traces,
- Sa vitesse d'analyse rapide,
- Sa grande flexibilité en termes de types d'échantillons et de composés testés (identification et quantification d'une grande variété de composés organiques ou inorganiques, y compris les composés polaires, ioniques et les macromolécules),
- Sa capacité à analyser des composés thermiquement instables ou non volatils, du fait qu'elle utilise des solvants liquides à des températures modérées,
- La possibilité d'agir sur la sélectivité entre les analytes par le choix de la colonne et de la composition de l'éluant,
- Son couplage avec d'autres techniques de détection (spectroscopie UV-visible ou spectrométrie de masse) permettant des analyses plus approfondies.

a) Description et principe de la technique

La HPLC est une méthode basée sur la chromatographie liquide classique dans laquelle un liquide est utilisé comme phase mobile (solvant ou mélange de solvants de polarités différentes) et un système d'infusion à haute pression est utilisé pour pomper cette phase mobile dans une colonne équipée d'une phase stationnaire constituée d'un solide finement divisé. En traversant la colonne, les composants de l'échantillon sont séparés en fonction de leur interaction avec les phases stationnaire et mobile (principe de séparation basé sur le partage différentiel des molécules à séparer dans les deux phases), puis visualisés sous forme de pics grâce à un détecteur approprié.

Il existe deux possibilités, selon la polarité des phases :

- *HPLC en phase normale* : la phase stationnaire est polaire (groupements amine, nitrile, diol,... greffés sur silice) et la phase mobile est un solvant apolaire (hexane, heptane, iso-octane,...). Les solutés les plus polaires sont élués en dernier.
- *HPLC en phase inverse* : la phase stationnaire est apolaire, obtenue par greffage d'hydrocarbures à longues chaînes sur un support tel que des particules de silice (SiOR avec R souvent une chaîne alkyle en C8, C18,...), par des liaisons covalentes. La phase mobile est un solvant polaire (eau, acétonitrile, éthanol,...). Les solutés les plus apolaires sont élués en dernier.

b) Appareillage

D'une manière générale, un appareil de chromatographie liquide haute performance est constitué par les éléments de base suivants (figure 47) :

- *Un réservoir de phase mobile*, le plus souvent une bouteille en verre, contenant des solvants purs ou des mélanges de solvants dans des concentrations connues.

- *Une pompe*, équipement le plus important de l'instrument HPLC. Elle permet de délivrer la phase mobile sous des pressions de 100 à 400 bars, selon la taille des particules de la phase stationnaire, de la longueur de la colonne et du débit. Elle est munie d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. Elle s'utilise soit en mode isocratique (avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse), soit en mode gradient (avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluants).

Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques μl à plusieurs ml/min. Le débit de la chromatographie préparative est plus grand, et nécessite parfois des milliers de ml/min.

- *Un système d'injection*, permettant d'injecter l'échantillon à analyser dans le système d'HPLC sans modifier la pression dans la colonne. Deux systèmes d'injection sont généralement disponibles, une injection manuelle, ou une injection automatique. Dans les deux cas, l'injection se fait à travers une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe, allant de 1 à 100 μL . Le remplissage de la boucle d'injection se fait à l'aide d'une seringue.

- *Une colonne*, élément majeur de l'appareil dont dépend la bonne séparation des solutés, est souvent en acier inox inerte aux produits chimiques. Sa section est constante, de diamètre compris entre 4 et 20 mm pour des longueurs généralement de 15 à 30 cm. Le remplissage (silice, silice greffée ou particules polymériques) a une granulométrie de 3, 5 ou 10 μm .

La plupart des colonnes HPLC actuelles sont peu polaires et hydrophobes, elles sont dites à phase inverse. Parmi elles, les colonnes de type C18 sont les plus largement utilisées. Elles correspondent à un greffage d'une chaîne carbonée de 18 carbones $(\text{CH}_2)_{17}\text{-CH}_3$ sur le gel de silice. Les phases stationnaires C8, un peu moins apolaires sont également assez courantes.

La colonne est souvent précédée d'une précolonne (ou colonne de garde), plus courte (0,4 à 1 cm), et remplie de la même phase stationnaire, ce qui permet de retenir les impuretés.

- *Un four*, pour gérer correctement la température de la colonne.

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

- *Un détecteur*, (UV-visible, réfractométrie, fluorimétrie, ou spectrométrie de masse), il est nécessaire pour mettre en évidence la sortie des solutés de la colonne (la plupart des composés étant incolores et donc invisibles à l'œil nu), et de fournir un signal proportionnel à la quantité de chacun d'eux dans un mélange.

- *Un enregistreur*, permettant d'obtenir le tracé appelé chromatogramme.

- *Un logiciel d'exploitation*, servant à l'acquisition, au traitement et compte rendu des résultats chromatographiques.

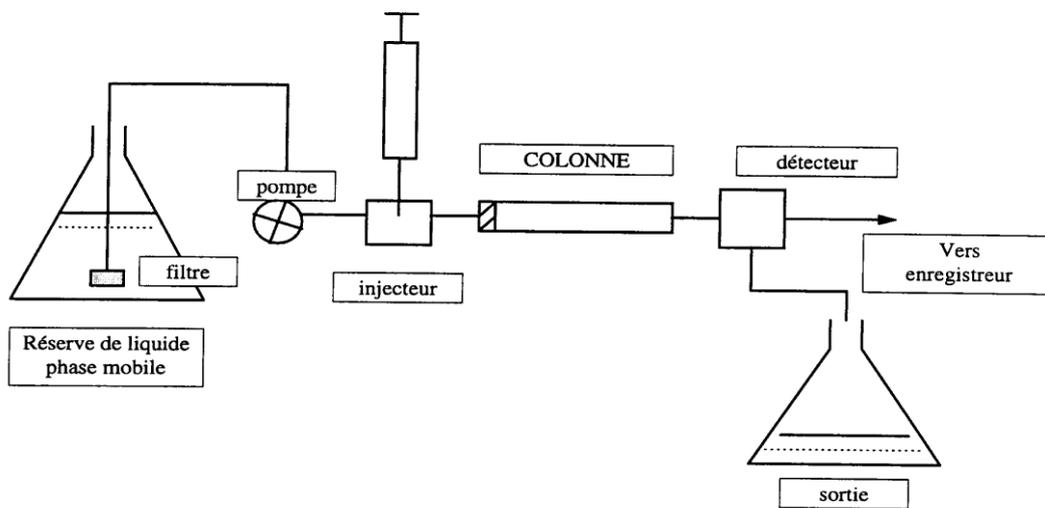


Figure 47 : Schéma d'un chromatographe en phase liquide à haute performance

a) Applications

La chromatographie en phase liquide à haute performance présente une large gamme d'applications, qui recouvrent une grande partie du domaine de la chromatographie en phase gazeuse auquel s'ajoute celui de l'analyse des composés thermosensibles ou de masses moléculaires très grandes et (ou) polaires. Elle est largement utilisée dans les laboratoires de recherche ou d'analyse d'une myriade de secteurs, tels que :

- *La biochimie* (analyse de petites molécules, de peptides, de composés complexes tels que les protéines, les anticorps...),

- *La cosmétologie* (analyse des produits cosmétiques d'origines naturelle ou de synthèse, de matières premières et de produits finis),

- *La pharmacie* (recherche et développement, contrôle qualité de fabrication et d'analyse des impuretés et de dégradation des médicaments),

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

- *L'agro-alimentaire* (caractérisation de la qualité des ingrédients dans les denrées alimentaires et les boissons),
- *Le contrôle antidopage* (analyse des drogues, tests de substances interdites chez les athlètes,...),
- *L'environnement* (détection et quantification de contaminants divers, notamment dans les secteur de l'eau et des écosystèmes aquatiques)...

IV.5.2.5. La chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

La phase stationnaire est ici constituée d'une résine poreuse ou de billes de gel agissant comme un tamis moléculaire. Contrairement aux autres modes de chromatographie, elle repose sur l'absence d'interaction entre le soluté et la phase stationnaire. La séparation des composants d'un mélange se fait selon leurs tailles moléculaires, et donc, selon la différence de pénétration de leurs molécules dans la phase stationnaire : les petites molécules pourront pénétrer à l'intérieur des pores des particules de gel, et seront ainsi fortement retenues dans la colonne, alors que les grosses molécules, ne pouvant pas pénétrer dans les pores, seront exclues et migreront donc rapidement avec la phase mobile (figure 48).

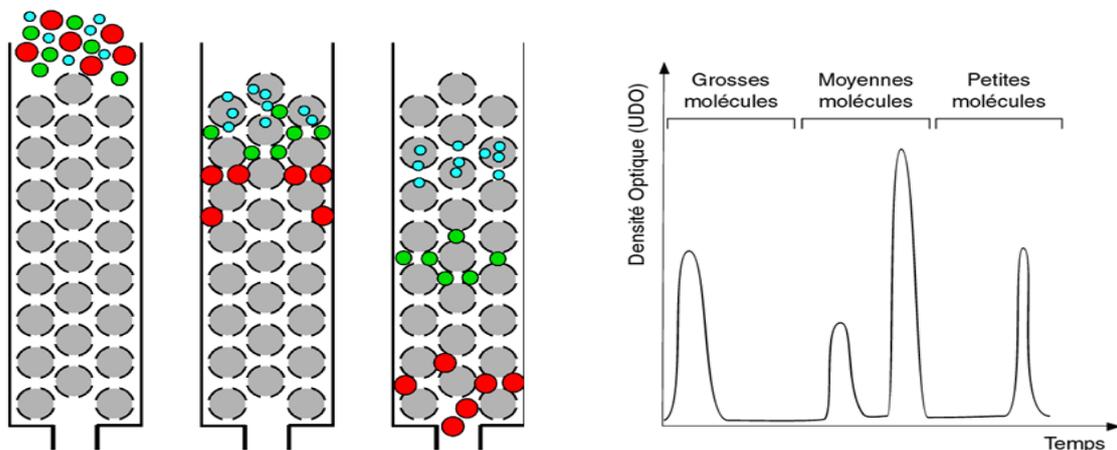


Figure 48 : Principe de séparation de la chromatographie d'exclusion

La chromatographie d'exclusion stérique (dite aussi chromatographie de filtration sur gel) est utilisée pour la caractérisation de la masse et de la structure moléculaire de tous les types de macromolécules (protéines, polymères naturels, polymères synthétiques...).

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

a) Volume total de la colonne

Soit une colonne de volume total (V_t) remplie d'un gel solvato :

$$V_t = V_0 + V_i + V_g$$

$V_0 = V_m$ = volume mort (volume d'eau externe aux granules de gel),

V_i = volume d'eau interne aux granules de gel,

V_g = volume du gel.

b) Masse moléculaire d'une macromolécule

Le calcul de la masse moléculaire (MM) d'une macromolécule se fait de deux manières :

- En portant le logarithme de la masse moléculaire en fonction du volume d'élution (V_e) : $\log MM = f(V_e)$. La courbe d'étalonnage (obtenue avec des polymères étalons de même nature chimique et de même topologie que la macromolécule à analyser) permet de déduire la masse moléculaire de la macromolécule inconnue à partir de son volume d'élution (figure 49).

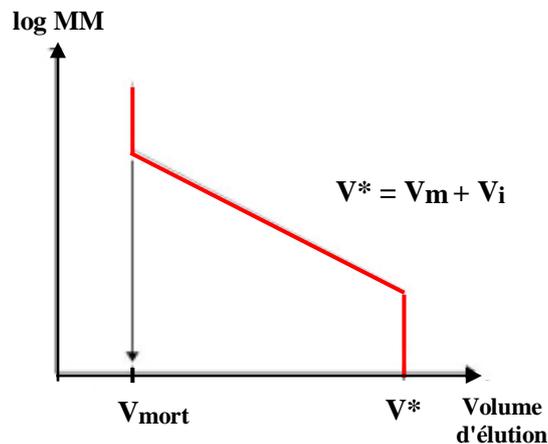


Figure 49 : Courbe d'étalonnage $\log MM = f(V_e)$

- En portant le logarithme de la masse moléculaire en fonction de K_{AV} (coefficient de partage entre la phase liquide et la phase gel) : $\log MM = f(K_{AV})$.

Avec :

$$K_{AV} = (V_e - V_m) / (V_t - V_m)$$

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

V_e = volume d'élution de la molécule ($V_e = D \times t_r$),

V_t = volume total (mesuré en remplissant la colonne d'eau),

V_m = volume mort (déterminé en mesurant le V_e d'une substance totalement exclue).

IV.5.2.6. Chromatographie par échanges d'ions (IEX)

Dans la chromatographie par échanges d'ions, la phase stationnaire est une résine chargée positivement ou négativement, qui interagit, de façon réversible, avec les ions de l'échantillon de charges opposées. Les cations sont retenus sur une colonne d'échange de cations, tandis que les anions sont retenus sur une colonne d'échange d'anions. L'élution peut se faire avec une solution de composition constante ou avec un gradient de pH et (ou) de force ionique.

Le principe de séparation repose sur des processus d'échange d'ions entre les analytes entraînés par la phase mobile et la résine fixée sur la colonne. C'est toujours le contre-ion associé à la phase stationnaire qui est échangé avec les composés ionisés à séparer (figure 50).

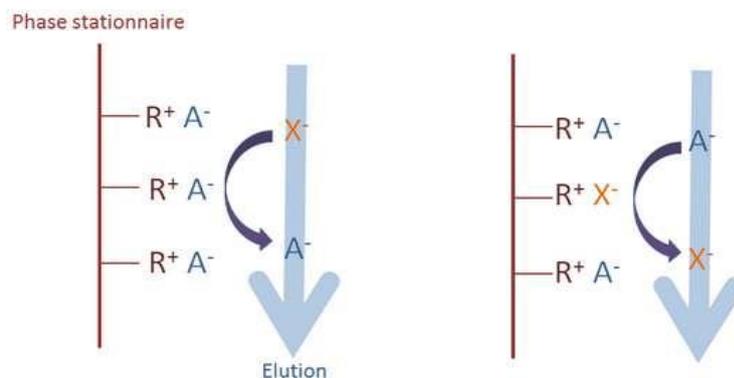


Figure 50 : Exemple de séparation par chromatographie ionique.

Echange d'anion X^- d'un soluté avec un contre-ion A^- de la phase stationnaire

Il existe deux types de chromatographie ionique : *rétenion des anions* (la phase stationnaire est composée d'un groupement cationique et la phase mobile est anionique) et *rétenion des cations* (la phase stationnaire est composée d'un groupement anionique et la phase mobile est cationique).

La chromatographie d'échange d'ions, rapide et sélective, est utilisée dans différents domaines : l'environnement pour l'analyse des eaux ultrapures, potables ou usées et polluées,

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

la biochimie pour isoler et purifier les échantillons de protéines, l'alimentaire, la pharmaceutique, l'industrie des semi-conducteurs...

IV.5.2.7. La chromatographie d'adsorption

La phase stationnaire est constituée d'un solide polaire et adsorbant (silice non greffée, silice greffée polaire...), la phase mobile est un éluant isocratique apolaire ou un gradient de polarité. Les solutés s'adsorbent de façon sélective sur la surface de la phase stationnaire (figure 51). Il se produit une succession d'adsorptions et de désorptions, ces dernières étant provoquées par l'ajout d'un solvant en fin de séparation.

Les interactions mises en jeu sont de nature électrostatiques (liaison hydrogène, interactions de Van der Waals, π - π).

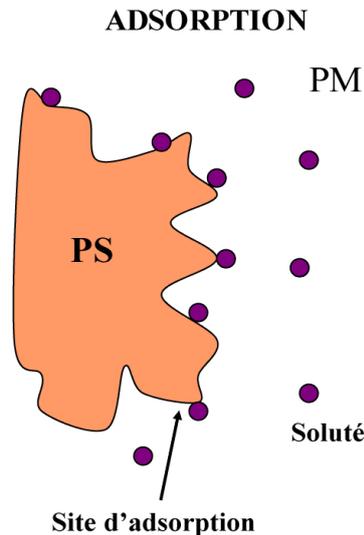


Figure 51 : Adsorption du soluté sur la surface de la phase stationnaire

Cette technique est utilisée dans plusieurs domaines, notamment en immunologie, pour la technique de purification des anticorps, ou en biochimie, pour l'isolation des protéines et des antigènes.

IV.6. Références bibliographiques

1. *Chromatography*, By Rajbir Singh, Mittal Publications, 197 pages, 1st Edition (2002).

https://books.google.dz/books/about/Chromatography.html?id=uBYxwNd6L-UC&redir_esc=y

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

2. *The Essence of Chromatography*, By Colin F. Poole, Elsevier Science; 936 pages, 1st Edition (2002).

<https://www.sciencedirect.com/book/9780444501981/the-essence-of-chromatography>

3. *Thin-Layer Chromatography: A Modern Practical Approach*, by Peter Wall, Roger M. Smith (Series Editor), (RSC Chromatography Monographs, Volume 12), 1st Edition (2005).

<https://www.amazon.com/Thin-Layer-Chromatography-Practical-Approach-Monographs/dp/085404535X>

4. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, By Lloyd R. Snyder, Joseph J. Kirkland, John W. Dolan, 960 pages (2009).

[doi:10.1002/9780470508183](https://doi.org/10.1002/9780470508183)

5. *Advances in Chromatography*, Edited By Eli Grushka, Nelu Grinberg, Volume 52, 272 pages, 1st Edition (2019).

<https://www.routledge.com/Advances-in-Chromatography-Volume-52/Grushka-Grinberg/p/book/9780367378776>

6. *Modern Practice of Gas Chromatography*, Edited By Eugene F. Barry, 912 pages, (2004).

[doi:10.1002/0471651141](https://doi.org/10.1002/0471651141)

7. *Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse*, J. Tranchant, Paris [FRA] : Masson (Editeur), 700 pages, 4^{ème} Edition (1995).

https://belinra.inrae.fr/index.php?lvl=notice_display&id=247968

8. *Advances in Chromatography*, Volume 42, Publié par Phyllis R. Brown and Eli Grushka, Taylor & Francis Inc., 460 pages (2003).

<https://www.angusrobertson.com.au/books/advances-in-chromatography/p/9780824709501>

9. *Chromatographic Methods Development*, Edited By Gregory K. Webster and Laila Kott, Jenny Stanford Publishing, 1st Edition (2019).

<https://doi.org/10.1201/9780429201721>

10. *Basic Gas Chromatography*, By Harold M. McNair, James M. Miller & Nicholas H. Snow, 288 pages, John Wiley & Sons, 3rd Edition (2019).

<https://www.target.com/p/basic-gas-chromatography-3rd-edition-by-harold-m-mcnair-james-m-miller-nicholas-h-snow-hardcover/-/A-86308809>

IV.7. Exercices d'application

- *Chromatographie en phase gazeuse (CPG)*

Exercice 1 :

On sépare 2 composés A et B par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne de 2,0 mètres.

Calculer la résolution, sachant que $t_{rA} = 300$ secondes, $t_{rB} = 318$ secondes et que les largeurs à la base des pics, extrapolées par les tangentes aux points d'inflexion sont respectivement de 20 secondes pour A et 21,2 secondes pour B. Qu'en pensez-vous? Justifier votre réponse.

Exercice 2 :

Deux espèces chimiques, A et B sont séparées par chromatographie gazeuse isotherme, à l'aide d'une colonne de 2,00 m ayant 5000 plateaux théoriques, au débit de 15,0 ml/min.

Le pic de l'air non absorbé apparaît au bout de 30 s ; le pic de A apparaît au bout de 5 min et celui de B au bout de 12 min.

1. Calculer le volume mort V_M de la colonne et les volumes de rétention V_A et V_B
2. Calculer les volumes réduits V'_A et V'_B
3. Calculer les coefficients de rétention k'_A et k'_B
4. Quelles sont les largeurs à la base des pics A et B ?
5. Quelle est la valeur de H pour cette colonne ?
6. Déterminer la valeur de la sélectivité α de cette séparation ?
7. Calculer la résolution R_s de la séparation ?
8. Commenter brièvement les valeurs de k' et de R_s ?

Exercice 3 :

Les mycotoxines sont des molécules toxiques libérées par les moisissures. L'analyse par CPG des deux mycotoxines, nivalénol et déoxynivalénol, conduit à :

Colonne capillaire : 10 m x 0,53 mm ; Température : 260 °C

Débit : 1,2 ml / min ; Vitesse linéaire : $\mu = 544,2$ cm / min

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

Gaz vecteur N₂ ; Détecteur FID

$\omega(\text{nivalérol}) = 0,167 \text{ min}$; $\omega(\text{déoxynivalérol}) = 0,176 \text{ min}$

$t_r(\text{nivalérol}) = 3,9 \text{ min}$; $t_r(\text{déoxynivalérol}) = 4,1 \text{ min}$

1. Calculez le temps mort (min) et le volume mort (ml).
2. Calculez le facteur de sélectivité α entre les deux solutés analysés.
3. Calculez le facteur de résolution R_s dans ces conditions d'analyse. Discuter
4. Quelle colonne, de même diamètre et même phase stationnaire, faudrait-il-utiliser pour obtenir la séparation du nivalérol et du déoxynivalérol avec une résolution de 1,5. R_s est proportionnel à la racine de L (L étant la longueur de la colonne).

Exercice 4 :

Le chromatogramme de la nicotine a été obtenu dans les conditions suivantes :

CPG : Colonne remplie

Phase stationnaire : 10% Carbowax 20M/2% KOH sur 80/100 Chromosorb W AW

Dimensions de la colonne : 183 cm (longueur) \times 2 mm (diamètre intérieur)

Débit de la phase mobile : 20 mL / min.

Quantité injectée : 1 μ L

Four : 200 °C. Temps de rétention de la nicotine = 3,20 min

Four : 180 °C. Temps de rétention de la nicotine = 6,60 min

1. Calculer la vitesse linéaire (en cm / sec) de la phase mobile dans la colonne.
2. En déduire le temps mort de cette analyse.

L'étude thermodynamique de l'influence de la température sur les temps de rétention montre que ces deux grandeurs sont liées par la relation suivante : $\log (t_r - t_m) = (A / T) + B$ où A et B sont des constantes pour un composé donné et une colonne donnée.

3. Calculer le temps de rétention de la nicotine à 160 °C.
4. Peut-on éluer la nicotine en 1 min, sachant que la température limite d'utilisation de la colonne et de 250 °C ?

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

- *Chromatographie en couche mince (CCM)*

Exercice 1 :

On a réalisé la chromatographie sur couche mince de deux échantillons (A) et (B), et d'un corps pur (R) servant de référence. L'étude du chromatogramme a permis de repérer les positions des différentes taches après révélation.

Front du solvant : 8 cm.

Echantillon A : deux taches situées à 3 et 5 cm de la ligne de base.

Echantillon B : une seule tache située à 6 cm de la ligne de base.

Echantillon référence : $R_f = 0,75$.

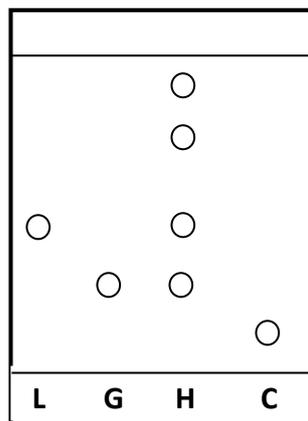
1. Dessiner le chromatogramme.

2. Sachant que le rapport frontal de la menthe est $R_f = 0,75$, est ce que l'échantillon A contient la menthe ?

3. Cette chromatographie permet-elle d'identifier un ou plusieurs corps pur contenus dans les échantillons (A) et (B) ?

Exercice 2 :

On veut déterminer les constituants d'une huile essentielle (H). On réalise le chromatogramme ci-dessous.



L : linalol ; G : géraniol ; H : produit synthétisé ; C : citral

Front du solvant : 3,6 cm.

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

1. A quoi correspondent les deux lignes horizontales tracées sur le chromatogramme ?
2. A quoi sert l'éluant ?
3. A l'aide du chromatogramme déterminer les constituants de l'huile essentielle ?
4. Calculer le rapport frontal du constituant (L), dont la tache est située à 1,3 cm de la ligne de base.

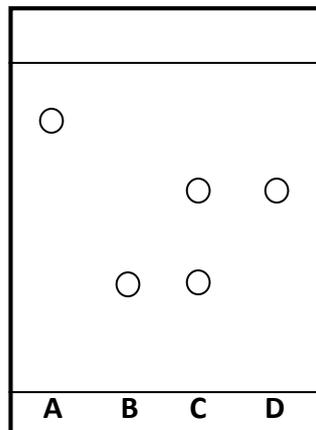
Exercice 3 :

On réalise la chromatographie sur couche mince d'un médicament, dont le chromatogramme obtenu est présenté ci-dessous.

On pose une goutte de ce médicament sur la ligne de dépôt et on pose sur la même ligne une goutte de chacun des corps suivants : l'aspirine, le paracétamol et la caféine.

On admet que l'espèce chimique qui a le plus grand rapport frontal parmi ces corps est l'aspirine et celui qui a le plus petit rapport frontal est le paracétamol.

1. Identifier chacune des espèces A, B, C et D.
2. Quelle est la composition du médicament ?



Exercice 4 :

On a réalisé une analyse qualitative d'un médicament par chromatographie sur couche mince. Le chromatogramme obtenu est représenté ci-dessous.

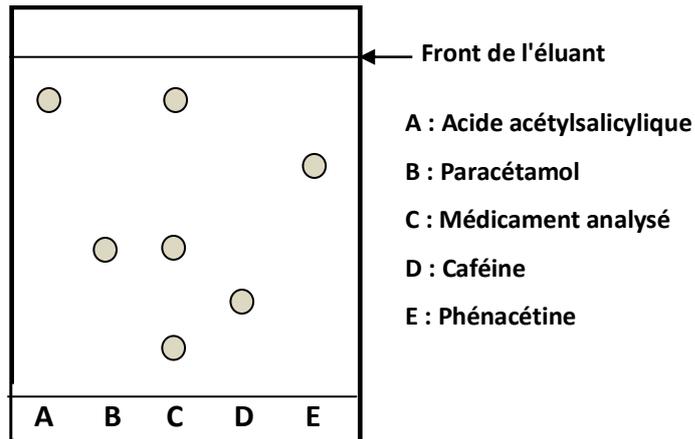
1. En chromatographie sur couche mince, pourquoi les espèces d'un mélange se séparent-elles ?
2. Que peut-on dire de la composition de ce médicament ? Justifier.

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

3. Déterminer alors le rapport frontal des constituants mis en évidence dans ce médicament.

Un autre médicament contient de l'acide acétylsalicylique, du paracétamol et de la caféine.

4. Pour un déplacement d'éluant, depuis la ligne de dépôt, égal à 5,0 cm, représenter le chromatogramme obtenu avec le même éluant et une plaque identique.



• Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

Exercice 1 :

Le chromatogramme du Prozac (antidépresseur) a été enregistré dans les conditions suivantes :

HPLC. Colonne C18 : 15 cm x 4.6 mm

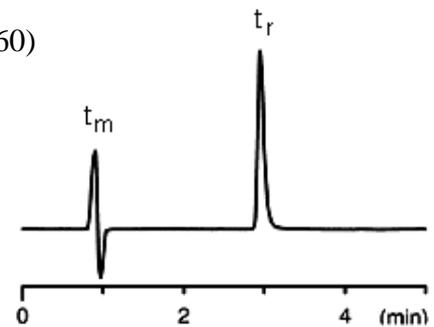
Phase mobile : Acetonitrile / 25 mM KH_2PO_4 pH 7.0 (40:60)

Débit : 2 ml / min. Température : 30 °C

Détecteur UV : 254 nm. Injection : 1 μL

Calculer :

1. Le temps de rétention
2. Le volume de rétention
3. Le temps mort
4. Le volume mort
5. Les volume et temps de rétention réduits
6. Le facteur de rétention



Chromatogramme du Prozac

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

Exercice 2 :

Les conditions opératoires pour une analyse HPLC sont les suivantes :

Longueur de la colonne : 10 cm	Température : 20 °C
Débit : 1 ml / mn	Teneur en méthanol : 35 %
Pression en tête de la colonne : $69 \cdot 10^5$ Pa	Temps mort : 41 s

Le tableau des résultats est le suivant :

Nom du soluté	Largeur à mi-hauteur (s)	Temps de rétention (s)
Uracile (A)	10,9	69
Phénol (B)	13,1	182

Déterminer :

1. Les temps de rétention réduit t'_R et les facteurs de capacité (facteur de rétention) k' .
2. Le nombre de plateaux théoriques N_{th} (efficacité).
3. La hauteur équivalente à un plateau théorique HEPT.
4. Le facteur de séparation (facteur de sélectivité) α , le facteur de résolution R_s .

Exercice 3 :

Les temps de rétention de 2 herbicides A et B d'un mélange à séparer sont respectivement égaux à 10,60 et 11,53 min sur une colonne de 25,0 cm. Une espèce non retenue passe sur la colonne en 1,20 min. Les largeurs (à la base) des pics de A et B sont respectivement égales à 1,05 et 1,15 min.

Calculer

1. La résolution de la colonne
2. Le nombre moyen de plateaux théoriques dans la colonne
3. La hauteur équivalente à un plateau théorique
4. La longueur de la colonne nécessaire pour obtenir une résolution de 1,5

Exercice 4 :

Nous étudions la séparation de trois composés par chromatographie haute performance. L'expérience a lieu à 20 °C avec une pression en tête de colonne de $49 \cdot 10^5$ Pa. Le débit de la phase mobile est de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ et la longueur de la colonne est de 15 cm. La

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

phase mobile traverse la colonne dans 41 s. La séparation chromatographique a donné les résultats présentés dans le tableau ci-dessous : Résultats de la séparation par HPLC de trois composés.

Composés	t_r (min)	ω (min)
Toluène	1,83	0,14
Diéthylphtalate	2,62	0,34
Diméthylphtalate	3,23	0,42

1. Quel est le principe de la chromatographie ?
2. La chromatographie utilise une colonne C18 et un mélange de solvant d'élution éthanol / hexane. Préciser le type de chromatographie utilisé ?
3. Calculez pour chaque composé le facteur de rétention et le nombre de plateaux théoriques.
4. Calculez pour les couples toluène/diéthylphtalate et diéthylphtalate/diméthylphtalate le facteur de sélectivité α et la résolution R_s .

- *Autres exercices sur la chromatographie*

Exercice 1 :

Un mélange de trois acides aminés : Asp ($pH_i = 2,87$), Arg ($pH_i = 10,76$) et Leu ($pH_i = 6$), est soumis à une chromatographie sur colonne échangeuse de cations. L'élution est effectuée à l'aide d'un tampon à $pH = 6$.

Dans quel ordre peut-on prévoir la sortie de ces acides aminés ?

Exercice 2 :

On veut séparer 3 acides aminés : l'acide glutamique (Glu), la leucine (Leu) et la lysine (Lys) par chromatographie sur une résine polystyrénique substituée par des groupements sulfonates ($-\text{SO}_3^-$). Les pH isoélectriques de ces acides aminés sont respectivement : 3,22 ; 5,98 ; 9,74 à 25°C .

On dépose ces 3 acides aminés sur la colonne, à $pH 2$, puis on élue en amenant progressivement le pH à 7.

Quels acides aminés sont élués et dans quel ordre ? (On considérera que les interactions acides aminés-résine sont uniquement d'ordre électrostatiques).

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

Exercice 3 :

Un mélange d'immunoglobulines G (PM = 160 000 Da) et d'albumine sérique bovine (PM = 67 000 Da) est déposé sur colonne de séphadex G-100 (limite d'exclusion = 100 000 Da).

Tracer un diagramme d'élution vraisemblable (DO en fonction de V_e) en indiquant le volume mort.

Exercice 4 :

On fait une chromatographie d'exclusion sur Sephadex (limite d'exclusion égale à 100 000 de PM). Un mélange d'aldolase (145 000 Da) et d'ovalbumine (45 000 Da) est déposé sur la colonne. Si le temps de rétention de l'ovalbumine est de 10 minutes et le débit de la colonne de 5 ml / min, calculez le volume d'élution de la protéine. Le V_e de l'aldolase est, quant à lui, de 10 ml.

Indiquer le volume mort de la colonne et donner l'ordre d'élution des protéines. Si vous devez déterminer la MM en fonction du coefficient de partage [$\log MM = f(K_{AV})$], il vous manque un paramètre. Lequel ?

IV.8. Corrigé des exercices

- *Chromatographie en phase gazeuse (CPG)*

Exercice 1 :

Les largeurs des pics, extrapolés par les tangentes aux points d'inflexion omégas :

$$\omega_A = 20 \text{ s} \quad ; \quad \omega_B = 21,2 \text{ s}$$

La résolution : $R_s = 2 (t_{rB} - t_{rA}) / (\omega_A + \omega_B)$

$$R_s = 2 (318 - 300) / (21,2 + 20) = 0,87$$

Les deux composés ne sont pas correctement séparés (pour une bonne résolution, R_s doit être supérieur à 1.5).

Exercice 2 :

1. Volume mort (V_M) de la colonne et volumes de rétention V_A et V_B : $V_i = t_i \times D$

$$V_M = 0,5 \times 15 = 7,5 \text{ ml} \quad ; \quad V_A = 5 \times 15 = 75 \text{ ml} \quad ; \quad V_B = 12 \times 15 = 180 \text{ ml}$$

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

2. Volumes réduits (V'_i) : $V'_i = t'_i \times D = V_i - V_m$ (avec $t'_i = t_i - t_m$)

$$t'_A = 5 - 0,5 = 4,5 \text{ min} \quad ; \quad t'_B = 12 - 0,5 = 11,5 \text{ min}$$

$$V'_A = 4,5 \times 15 = 67,5 \text{ ml} \quad ; \quad V'_B = 11,5 \times 15 = 172,5 \text{ ml}$$

3. Coefficients de rétention (k'_A) et (k'_B) : $k' = t'_r / t_m$

$$k'_A = 4,5 / 0,5 = 9 \quad \text{et} \quad k'_B = 11,5 / 0,5 = 23$$

4. Largeurs à la base (ω) des pics A et B : $N_{th} = 16 (t_r / \omega)^2$; $\omega = 4 \times t_r / \sqrt{N_{th}}$

$$\omega_A = 4 \times 300 / \sqrt{5000} = 17,0 \text{ sec} \quad \text{et} \quad \omega_B = 4 \times 720 / \sqrt{5000} = 40,8 \text{ sec}$$

5. Valeur de HEPT pour la colonne : $HEPT = L / N_{th}$

$$HEPT = 200 / 5000 = 0,04 \text{ cm / plateau}$$

6. Sélectivité (α) de la séparation : $\alpha = t'_B / t'_A = k'_B / k'_A$

$$\alpha = 11,5 / 4,5 = 23 / 9 = 2,56$$

7. résolution (R_s) de la séparation : $R_s = 2 (t_B - t_A) / (\omega_B + \omega_A)$

$$R_s = 2 (720 - 300) / (40,8 + 17,0) = 14,5$$

8. Commentaire :

- Pour k' les valeurs sont élevées. Composés retenus donc temps de rétention long et sûrement élargissement des pics.

- Valeur de R_s très importante. La résolution de la séparation est très bonne, mais le compromis entre le temps de rétention et la résolution n'est sûrement pas optimisé. Il est préférable de baisser le temps d'analyse et de perdre un peu en résolution.

Exercice 3 :

1. Temps mort et volume mort : $u = L / t_m$

$$t_m = L / u = 10 \cdot 10^2 / 544,2 = 1,84 \text{ min}$$

$$V_m = t_m \times D = 1,84 \times 1,2 = 2,2 \text{ ml}$$

2. Facteur de sélectivité α : $\alpha = t'_{rB} / t'_{rA} = t_{rB} - t_m / t_{rA} - t_m$

$$\alpha = (4,1 - 1,84) / (3,9 - 1,84) = 1,1$$

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

3. Facteur de résolution R_s : $R_s = 2 (t_{rB} - t_{rA}) / (\omega_A + \omega_B)$

$$R_s = 2 (4,1 - 3,9) / (0,167 + 0,176) = 1,16 \text{ (mauvaise résolution car } < 1,5)$$

4. Colonne à utiliser pour $R_s = 1,5$:

$$R_s = x\sqrt{L} \text{ et } R'_s = x\sqrt{L'}$$

$$R_s / R'_s = \sqrt{L} / \sqrt{L'}$$

$$\sqrt{L'} = \sqrt{L} (R'_s / R_s) = \sqrt{10} (1,5 / 1,16) = 4,089$$

$$L' = 16,72 \text{ m}$$

Exercice 4 :

1. Le débit $D = V / t = \pi r^2 L / t$ or la vitesse $u = L / t$ d'où $u = D / \pi r^2$

$$u = 20 / \pi (0,1)^2 \text{ soit } 637 \text{ cm / min ou } 10,6 \text{ cm / sec}$$

2. $t_m = L / u$ soit $t_m = 183 / 10,6 = 17,26 \text{ sec} = 0,29 \text{ min}$.

3. Pour la nicotine $t'_r = t_r - t_m = 2,91 \text{ min à } 200 \text{ °C}$ et $6,31 \text{ min à } 180 \text{ °C}$.

L'expression reliant la température au temps de rétention conduit à 2 équations avec 2 inconnues : $\log (2,91) = A / 473 + B$ et $\log (6,31) = A / 453 + B$

La résolution donne $A = 8408$ et $B = -16,7$; d'où $t_r = 15,44 \text{ min à } T = 433 \text{ °K}$ soit 160 °C

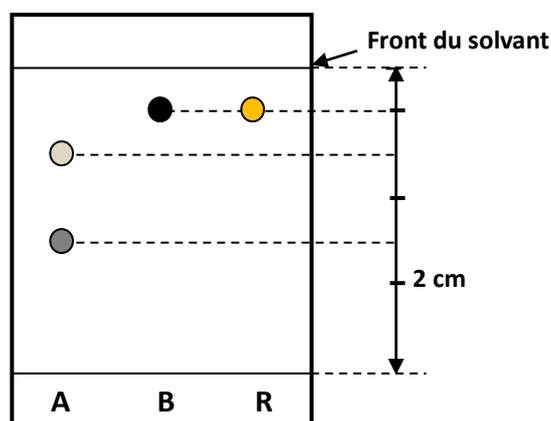
4. A 250 °C soit $T = 523 \text{ °K}$ on obtient $t'_r = 0,53 \text{ min}$ soit $t_r = 0,82 \text{ min}$.

On peut donc éluer la nicotine en 1 min en étant à une température inférieure à la température limite d'utilisation de la colonne (250 °C)

• *Chromatographie en couche mince (CCM)*

Exercice 1 :

1. Le chromatogramme :



CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

2. Rapport frontal de la menthe : $R_f = h / H = 0,75 \Rightarrow h = R_f \times H = 0,75 \times 8 = 6 \text{ cm}$

L'échantillon A ne contient pas la menthe.

3. Cette chromatographie permet d'identifier la menthe (R) contenue dans B.

Exercice 2 :

1. Ligne de front et ligne de dépôt.

2. L'éluant permet de faire migrer les différentes espèces chimiques.

3. Les espèces chimiques (L), (G) et (C) sont pures (une seule tache chacune). L'huile essentielle (H) est constituée de 4 espèces chimiques (4 tâches). Une tâche a migré à la même hauteur que celle du géraniole et une autre à la même hauteur que celle du linalol : l'huile essentielle contient donc ces deux espèces chimiques.

4. Rapport frontal de (L) : $R_f = h / H = 1,3 / 3,6 \Rightarrow R_f = 0,36$ (h tirée du chromatogramme).

Exercice 3 :

1. (A) qui a le plus grand rapport frontal est l'aspirine.

(B) qui a le plus petit rapport frontal est le paracétamol.

(C) qui n'est pas un corps pur est le médicament dont on cherche la composition.

(D) est la caféine.

2. Le médicament contient le paracétamol et la caféine et il ne contient pas l'aspirine.

Exercice 4 :

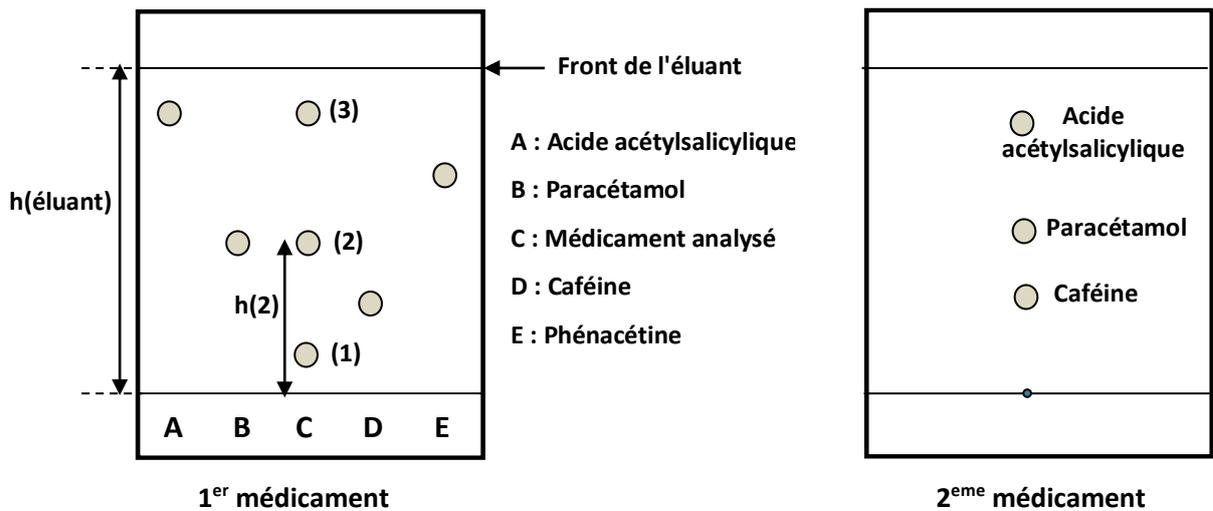
1. En chromatographie sur couche mince, les espèces d'un mélange se séparent car elles ont des solubilités dans l'éluant (phase mobile) et des affinités pour la phase stationnaire différentes.

2. Le chromatogramme du médicament a fait apparaître 3 taches : le médicament est donc un mélange de trois constituants :

Le constituant n° 2 du médicament a migré à la même hauteur que le paracétamol : le médicament contient donc du paracétamol.

Le constituant n° 3 du médicament a migré à la même hauteur que l'acide acétylsalicylique : le médicament contient donc de l'acide acétylsalicylique.

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE



Par ailleurs, aucun corps pur de référence n'a migré à la même hauteur que le constituant n° 1 du médicament : ce dernier ne peut donc pas être identifié.

3. On a : $R_f(2) = h(2) / H = 2,8 / 5,4 = 0,52 \Rightarrow R_f(2) = R_f(\text{Paracétamol}) = 0,52$
 (les distances h et H étant mesurées sur le chromatogramme)

De même, on a : $R_f(1) = 0,11$ et $R_f(3) = R_f(\text{Acide acétylsalicylique}) = 0,87$

4. Il faut calculer les distances (h) parcourues par chacun des constituants.

Ainsi, on a : $h(\text{Paracétamol}) = R_f(\text{Paracétamol}) \times H = 0,52 \times 5,0 \Rightarrow h(\text{Paracétamol}) = 2,6 \text{ cm}$

De même, on trouve : $h(\text{Acide acétylsalicylique}) = 4,4 \text{ cm}$

Grâce au chromatogramme, on calcule le rapport frontal de la caféine et on calcule $h(\text{caféine})$.

On trouve : $h(\text{caféine}) = 1,5 \text{ cm}$

- **Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)**

Exercice 1 :

1. Le temps de rétention (t_r) : $t_r = 3 \text{ min}$ (tiré du chromatogramme)

2. Le volume de rétention (V_r) : $V_r = t_r \times D$

$$V_r = 3 \times 2 = 6 \text{ ml}$$

3. Le temps mort (t_m) : $t_m = 1 \text{ min}$ (tiré du chromatogramme)

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

4. Le volume mort (V_m) : $V_m = t_m \times D$

$$V_m = 1 \times 2 = 2 \text{ ml}$$

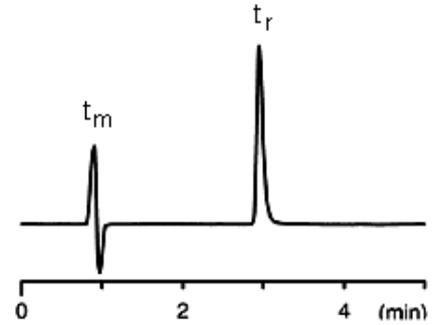
5. Volume et temps de rétention réduits :

- Volume réduit (V'_r) : $V'_r = V_r - V_m$

$$V'_r = 6 - 2 = 4 \text{ ml}$$

- Temps réduit (t'_r) : $t'_r = t_r - t_m$

$$t'_r = 3 - 1 = 2 \text{ min}$$



6. Le facteur de rétention (k') : $k' = (t_r - t_m) / t_m$ ou $k' = (V_r - V_m) / V_m$

$$k' = (3 - 1) / 1 = 2$$

Exercice 2 :

Uracile (A) ; Phénol (B)

1. Temps de rétention réduits et facteurs de capacité :

- Temps de rétention réduit (t'_r) : $t'_r = t_r - t_m$

$$t'_r(\text{A}) = 69 - 41 = 28 \text{ sec} \quad ; \quad t'_r(\text{B}) = 182 - 41 = 141 \text{ sec}$$

- Facteurs de capacité (k') : $k' = t'_r / t_m$

$$k'(\text{A}) = 28 / 41 = 0,68 \quad ; \quad k'(\text{B}) = 141 / 41 = 3,44$$

2. Nombre de plateaux théoriques (N_{th}) : $N_{th} = 5.54 (t_r / \delta)^2$

$$- N_{th}(\text{A}) = 5,54 \times (69 / 10,9)^2 = 222 \quad ; \quad N_{th}(\text{B}) = 5,54 \times (182 / 13,1)^2 = 1069$$

L'efficacité de la colonne correspond au $N_{th}(\text{max})$, soit $N_{th}(\text{B}) = 1069$

3. Hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) : $HEPT = L / N_{th}(\text{max})$

$$- HEPT = 10 / 1069 = 9,35 \cdot 10^{-3} \text{ cm}$$

4. Facteur de séparation et facteur de résolution :

- Facteur de séparation (α) : $\alpha = t'_r(\text{B}) / t'_r(\text{A}) = 141 / 28 = 5,03$

- Facteur de résolution (R_s) : $R_s = 2 (t_r(\text{B}) - t_r(\text{A})) / (\omega_A + \omega_B)$

$$R_s = 2 (t_r(\text{B}) - t_r(\text{A})) / 1,7 (\delta_A + \delta_B)$$

$$R_s = 2 (182 - 69) / 1,7 (13,1 + 10,9) = 5,53 \text{ (Très bonne résolution car } R_s \gg 1,5)$$

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

Exercice 3 :

1. Résolution de la colonne : $R_s = 2 (t_r(B) - t_r(A)) / (\omega_A + \omega_B)$

$$R_s = 2 (11,53 - 10,60) / (1,15 + 1,05) = 0,84$$

2. Nombre moyen de plateaux théoriques ($N_{th(moy)}$) : $N_{th(moy)} = (N_{th(A)} + N_{th(B)}) / 2$

Avec : $N_{th} = 16 (t_r / \omega)^2$

- $N_{th(A)} = 16 (t_r(A) / \omega(A))^2 = 16 (10,60 / 1,05)^2 = 1630$

- $N_{th(B)} = 16 (t_r(B) / \omega(B))^2 = 16 (11,53 / 1,15)^2 = 1608$

- $N_{th(moy)} = (1630 + 1608) / 2 = 1619$

3. Hauteur équivalente à un plateau théorique HEPT : $HEPT = L / N_{th(moy)}$

$$HEPT = 250 / 1619 = 0.15 \text{ mm}$$

4. Longueur de la colonne nécessaire pour obtenir une résolution de 1,5 :

R_s est proportionnel à \sqrt{L} , alors : $R'_s / R_s = \sqrt{(L' / L)}$

$$1,5 / 0,84 = \sqrt{(L' / 25)} \quad L' = 25 (1,5 / 0,84)^2 \approx 80 \text{ cm}$$

Exercice 4 :

1. Le principe de fonctionnement de la HPLC :

Les composés à séparer sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans la colonne chromatographique. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne, grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont caractérisés par des pics.

2. Il s'agit d'une chromatographie de partage en phase inverse (phase stationnaire apolaire).

3. Facteur de rétention et nombre de plateaux théoriques pour chaque composé :

- Facteur de rétention (k') : $k' = (t_r - t_m) / t_m$

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

$$k'(\text{toluène}) = (109,8 - 41) / 41 = 1,68$$

$$k'(\text{Diéthylphtalate}) = (157,2 - 41) / 41 = 2,83$$

$$k'(\text{Diméthylphtalate}) = (193,8 - 41) / 41 = 3,73$$

- Nombre de plateaux théoriques (N_{th}) : $N_{th} = 16 (t_r / \omega)^2$

$$N_{th}(\text{Toluène}) = 16 (1,83 / 0,14)^2 = 2734$$

$$N_{th}(\text{Diéthylphtalate}) = 16 (2,62 / 0,34)^2 = 950$$

$$N_{th}(\text{Diméthylphtalate}) = 16 (3,23 / 0,42)^2 = 946$$

4. Facteurs de sélectivité et résolutions :

- Facteur de sélectivité (α) : $\alpha = (t_{rB} - t_m) / (t_{rA} - t_m)$

$$\alpha(\text{Toluène/Diéthylphtalate}) = (157,2 - 41) / (109,8 - 41) = 1,68$$

$$\alpha(\text{diéthylphtalate/diméthylphtalate}) = (193,8 - 41) / (157,2 - 41) = 1,31$$

- Résolution : $R_s = 2 (t_{rB} - t_{rA}) / (\omega_A + \omega_B)$

$$R_s(\text{Toluène/Diéthylphtalate}) = 2 (2,62 - 1,83) / (0,34 + 0,14) = 3,29$$

$$R_s(\text{diéthylphtalate/diméthylphtalate}) = 2 (3,23 - 2,62) / (0,42 + 0,34) = 1,60$$

• *Autres exercices sur la chromatographie*

Exercice 1 :

Si les trois acides aminés ont été retenus sur la colonne, c'est que la charge de la colonne a été réalisée à un pH inférieur au plus petit des pH_i , soit un pH inférieur à 2,87, afin que les acides aminés se présentent sous une forme chargée positivement et qu'ils puissent être retenus par la résine échangeuse de cations, chargée négativement.

Acide aminé	pH_i	Charge à $pH < 2,87$	Charge à $pH 6$
Asp	2,87	+	-
Leu	6	+	Neutre (50%/50%)
Arg	10,76	+	+

A un pH de 6, Asp, chargé négativement, est élué de la colonne. Leu est ensuite éluée. Arg, toujours chargée positivement à $pH = 6$ reste sur la colonne et n'est donc pas éluée.

CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

Exercice 2 :

Cet exercice met en jeu une chromatographie échangeuse d'ions. Une résine polystyrénique substituée par des groupements sulfonate ($-\text{SO}_3^-$) est chargée négativement et est donc une résine échangeuse de cations.

Lorsque le pH est supérieur au pH_i , l'acide aminé est chargé négativement (forme anionique). Lorsque le pH est inférieur au pH_i , l'acide aminé est chargé positivement (forme cationique).

Le tableau ci-dessous donne les charges des 3 acides aminés, à $\text{pH} = 2$ et à $\text{pH} = 7$.

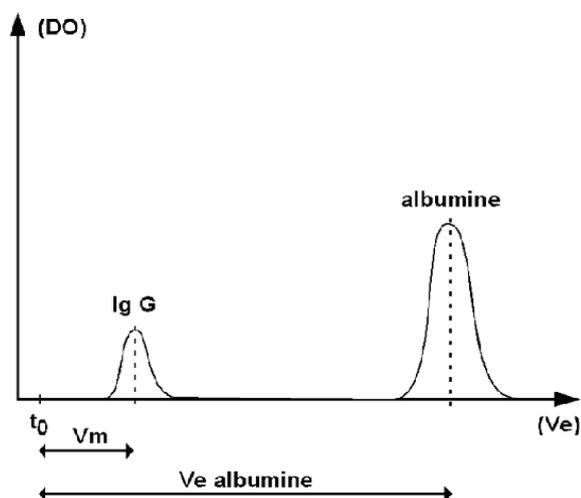
Acide aminé	pH_i	Charge à $\text{pH} = 2$	Charge à $\text{pH} = 7$
Glu	3,22	+	-
Leu	5,98	+	-
Lys	9,74	+	+

Ainsi, à $\text{pH} = 2$, les trois acides aminés sont chargés positivement, et seront retenus lors du passage sur la colonne.

A $\text{pH} = 7$, seuls Glu et Leu, chargés négativement, seront élués. Lys reste fixée à la colonne. Glu est élué en premier ($\text{pH}_i = 3,22$), puis Leu ($\text{pH}_i = 5,98$).

Exercice 3 :

Ci-dessous un diagramme d'éluion vraisemblable pour une chromatographie d'exclusion séphadex G-100 (limite d'exclusion = 100 000 Da), sur laquelle on aurait déposé un mélange d'immunoglobulines G (PM = 160 000 Da) et d'albumine sérique bovine (PM = 67 000 Da).



CHAPITRE IV : CHROMATOGRAPHIE

On a représenté la mesure de la densité optique (DO) de l'éluant en fonction du volume d'éluion (V_e). Les Ig G présentent un poids moléculaire supérieur à la valeur de la limite d'exclusion de la colonne (100 000 Da). Elles seront donc éluées en premier, et donneront la valeur du volume mort de la colonne ($V_m = V_e(\text{IgG})$). L'albumine de poids moléculaire 67 000 g/mol, sera incluse dans le gel et éluée plus tard, avec un $V_e(\text{albumine})$ qui est égal à V_e .

Exercice 4 :

Volume d'éluion de l'ovalbumine : $V_e = t_r \times D = 10 \times 5 = 50 \text{ ml}$

L'aldolase ne pourra pas rentrer dans les pores des billes du gel ($P_{M(\text{aldolase})} > \text{limite d'exclusion de } 100\,000$). Elle sera donc éluée en premier, et son volume de rétention correspond donc au volume mort : $V_0 = 10 \text{ ml}$

$$K_{AV} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$$

Avec $V_t = \text{volume totale de la colonne} = V_0 + V_{\text{billes}} + V_i$

On ne connaît pas V_{billes} et V_i . On ne peut donc pas déterminer le log MM en fonction de K_{AV} .