

Université Larbi Ben M'Hidi Oum El Bouaghi
Faculté des Science Exactes Et Science de la Nature et de la vie
Département Des Science de la Matière



Filière : Chimie

Polycopié :

***Méthode d'analyses spectroscopiques
et chromatographiques***

Cours et exercices corrigés

Présenter par : Dr. Soulef AZIZI

Maître de conférences « A »

AVANT-PROPOS

Ce polycopié de méthode d'analyse spectroscopique et chromatographique mis à la disposition de nos étudiants et l'ensemble de l'équipe pédagogique du Département de Sciences de la Matière de la matière ; présente les principales techniques de spectroscopie et de chromatographie en fournissant les bases théoriques et en exposant les applications, notamment à la détermination des structures et à l'analyse chimique. Il couvre les spectroscopies : rotationnelle, vibrationnelle, la spectroscopie électronique, ainsi chromatographie Liquide haute performance, la chromatographie en phase gazeuse et leurs couplage à la spectrométrie de masse. Bénéficiant de mon expérience en pédagogie, le polycopié propose de nombreux exercices corrigés.

Le polycopié est destiné aux étudiants des Master de Chimie pour les spécialités Analytique, Matériaux et Pharmaceutique ainsi que pour les étudiants de pharmacie et de la poste graduation en chimie et en biologie. Son contenu résulte de la lecture de nombreux ouvrages et documents dont la plupart sont cités dans les références bibliographiques. Il a pour objectifs les points suivants :

- ✓ Le rayonnement électromagnétique et son interaction avec les atomes et les molécules.
- ✓ Caractéristiques générales des méthodes expérimentales. Symétrie moléculaire.
- ✓ Spectroscopie rotationnelle. spectroscopie vibrationnelle. Spectroscopie électronique.
- ✓ Appareillage de la spectroscopie UV-vis, la spectroscopie IR et la spectroscopie de masse et détaille le fonctionnement des sources d'ions et des analyseurs de masse mis en œuvre dans les principaux instruments commerciaux d'aujourd'hui.
- ✓ Identifier les constituants principaux d'un appareil de chromatographie liquide et gaz, y compris leurs caractéristiques importantes.
- ✓ Comprendre les principaux mécanismes de la séparation chromatographique.
- ✓ Conditions chromatographiques de séparation et de détection.
- ✓ Analyse par chromatographie utilisant la spectrométrie de masse comme détecteur (LC-MS et CPG-SM).
- ✓ Interprétation des spectres et identification structurale.

Biographie de l'auteur

AZIZI Soulef, Maitre de conférences class A, Responsable de la formation Master Chimie Pharmaceutique et chef de l'équipe de recherche Sciences des Matériaux et Environnement à l'Université Larbi Ben M'Hidi.

Modules enseignés dans le même contexte

- Méthodes spectroscopiques I -SAE3- (Master I Chimie Analytique).
- Instrumentations de spectrométrie et d'imagerie II -SAE13- (Master II Chimie Analytique).
- Analyse physico-chimique et instrumentation -MCHPH12- (Master I Chimie Pharmaceutique).
- TP Spectroscopie (Master I Chimie des Matériaux).

Sommaire

AVANT-PROPOS	2
CHAPITRE I : PRINCIPES GENERAUX DE LA SPECTROSCOPIE	10
I. DEFINITION	10
II. DOMAINES D'APPLICATION DE LA SPECTROSCOPIE	10
III. INTERACTION RAYONNEMENT-MATIERE	11
III.1. Rayonnement	11
III.1.1 Nature ondulatoire du rayonnement électromagnétique	11
III.1.2 Nature corpusculaire du rayonnement électromagnétique	12
III.2. Niveaux d'énergie moléculaire	13
III.3. Interaction entre l'onde et la matière	14
IV. REGLES DE SELECTION	16
V. ETUDE EXPERIMENTALE : DONNEES CARACTERISTIQUES DES SPECTRES D'ABSORPTION	16
EXERCICES CORRIGES	19
CHAPITRE II : SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION DANS L'UV-VISIBLE	23
I. INTRODUCTION	23
II. DOMAINE SPECTRAL DANS L'UV-VIS	23
III. PRINCIPE ET REGLES DE SELECTION	24
IV. SPECTRE D'ABSORPTION	24
V. LES DIFFERENTS TYPES DE TRANSITION ELECTRONIQUES	24
V.1. Transition $\sigma \rightarrow \sigma^*$	25
V.2. Transition $n \rightarrow \pi^*$	26
V.3. Transition $n \rightarrow \sigma^*$	26
V.4. Transition $\pi \rightarrow \pi^*$	26
V.5. Transition $d \rightarrow d^*$	26

VI. FACTEURS INFLUENÇANT LES TRANSITIONS ELECTRONIQUES	27
VI.1. Terminologie	27
VI.2. Effet de la substitution	29
VI.3. Effet de la conjugaison	29
VI.3.1. Composés éthyléniques	29
VI.3.2. Composés benzéniques	31
VI.4. Effet du solvant	33
VI.5. Effet du pH	33
VII. APPLICATION DE LA SPECTROMETRIE UV-VISIBLE	34
VII.1. Analyse qualitative	34
VII.2. Analyse quantitative	34
VII.3. Additivité de l'absorbance	35
VII.4. Limites de validité de la loi de Beer-Lambert	36
VIII. INSTRUMENTATION DANS L'UV-VISIBLE	36
VIII.1. Sources lumineuses	37
VIII.2. Monochromateur	38
VIII.3. Diviseur de faisceau ou photomètre	38
VIII.4. Appareils de dispersion	39
VIII.5. Détecteurs	39
IX. APPLICATIONS DE LA SPECTROSCOPIE UV-VISIBLE	41
IX.1. Analyse qualitative	41
IX.2. Analyse quantitative	41
EXERCICES CORRIGES	44
CHAPITRE III : SPECTROSCOPIE DE VIBRATION DANS L'INFRAROUGE	56
I. INTRODUCTION	56
II. PRINCIPE DE LA SPECTROSCOPIE IR	57
III. VIBRATIONS MOLECULAIRES	57
III.1. Molécule diatomique	57

III.2. Types de vibration	58
IV. SPECTRES IR ET ABSORPTIONS CARACTERISTIQUES DES LIAISONS	60
IV.1. Les alcanes	60
IV.2 Alcanes cycliques	61
IV.3. Les alcènes	61
IV.4. Les alcynes	62
IV.5. Les aromatiques	62
IV.6. Les alcools et phénols	64
IV.7. Aldéhydes et cétones	65
IV.8 Acides carboxyliques COOH	66
IV.9. Amines	67
IV.10. Les nitriles	67
IV. APPAREILLAGE	68
EXERCICES CORRIGES	70
CHAPITRE IV : SPECTROMÉTRIE DE MASSE	83
I. INTRODUCTION	83
II. APPLICATIONS	83
III. PRINCIPE DE BASE	84
IV. SPECTRE DE MASSE	84
V. ANALYSE SPECTRALE	85
V.1. Masse de l'ion moléculaire	85
V.2. Parité de l'ion moléculaire	86
V.3. Amas isotopique	86
V.4. Exploitation des ions fragments	87
V.4.1. Réarrangement de McLafferty	87
V.4.2. Fragmentations caractéristiques de quelques classes chimiques	88
VI. APPAREILLAGE	103
VI.1. Techniques d'ionisation	103

VI.1.1 Techniques d'ionisation en phase gazeuse	103
VI.1.2. Techniques d'ionisation par désorption	104
VI.1.3. Techniques d'ionisation par évaporation	106
VI.2. Analyseurs de masse	109
VI.2.1. Spectromètres de masse à secteur magnétique	109
IV.2.2. Spectromètres de masse quadripolaires	110
VI.2.3. Spectromètre de masse à piège ionique	111
VI.2.4. Spectromètres de masse à temps de vol	112
VII. SPECTROMETRES DE MASSE EN TANDEM (MS/MS)	113
EXERCICES CORRIGES	114
CHAPITRE V : LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (CLHP)	125
I. GENERALITES	125
II. DOMAINES D'APPLICATION DE LA CLHP	125
III. CHROMATOGRAPHIE CLASSIQUE	126
III.1. Description	126
IV. PRINCIPE GÉNÉRAL DE LA CLHP	128
IV.1.1. Les réservoirs de phase mobile	129
IV.1.2. Pompe	130
IV.1.5. Les détecteurs	132
V.1. La chromatographie d'adsorption	137
V.2. La chromatographie de partage liquide-liquide	138
V.3. La chromatographie d'échange d'ions	139
V.4. La chromatographie d'exclusion	140
V.5. La chromatographie d'affinité	142
VI. PRECAUTIONS GENERALES	146
VII. CHROMATOGRAMME ET GRANDEURS DE RETENTION	146
VII.1. Chromatogramme	146
VII.2. Elution	147

VII.3. Le temps de rétention	147
VII.4. Le temps mort	147
VII.5. Le temps de rétention réduit	147
VII.6. Le volume de rétention	148
VII.7. Le volume de rétention	148
VII.8. Vitesse linéaire moyenne du soluté et de la phase mobile	148
VII.9. Le facteur de capacité	148
VII.10. Facteur de sélectivité	149
VIII. EFFICACITE D'UNE COLONNE	149
IX. RESOLUTION	150
X. EQUATION DE VAN DEEMTER	151
XI. OPTIMISATION D'UNE ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE	152
EXERCICES CORRIGES	153
CHAPITRE VI : CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE CPG	170
I. INTRODUCTION	170
II. PRINCIPE	170
III. DESCRIPTION D'UN CHROMATOGRAPHE EN PHASE GAZEUSE	171
III.1. Schéma d'appareillage	171
III.2. Réserve de gaz vecteur	171
III.3. chambre d'injection	172
III.3.1. Injecteur split / splitless	172
III.3.2. Injecteur à vaporisation directe -on column	172
III.3.3. Injecteur à température programmable –PTV-	173
III.4. Four	173
III.5. Colonnes	174
III.5.1. Les colonnes remplies	174
III.5.2. Les colonnes capillaires (à tube ouvert)	174
III.6. Détecteurs	176

III.6.1. Détecteur à conductibilité thermique –TCD-ou Catharomètre	177
III.6.2. Détecteur à ionisation de flamme : F.I.D -flamme ionisation detector-	177
III.6.3. Détecteur par capture d'électron -E.C.D-	178
III.6.4 Couplage de la CPG à la Spectroscopie de Masse	178
III.7. Chromatographie Multidimensionnelle	181
IV. CHOIX DES CONDITIONS OPERATOIRES	181
V. FACTEURS INFLUENÇANT LES SEPARATIONS	182
V.1 Température	182
V.2. Vitesse de la phase mobile	182
V.3. Caractéristiques de la colonne	182
V.4. Formation de dérivés	182
VI. APPLICATION	184
VII. GRANDEURS ELEMENTAIRES DE LA CPG	184
VIII. INDICES DE KOVATS	184
IX. ANALYSE QUANTITATIVE	185
EXERCICES CORRIGES	186
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	193

CHAPITRE I : PRINCIPES GENERAUX DE LA SPECTROSCOPIE

I. DEFINITION

La spectroscopie est l'étude du rayonnement électromagnétique émis, absorbé ou diffusé par les atomes ou les molécules. Elle fournit des informations sur l'identité, la structure et les niveaux énergétiques des atomes et des molécules grâce à l'analyse de l'interaction des rayonnements électromagnétiques avec la matière.

L'analyse des rayonnements en leurs différentes fréquences s'effectue à l'aide d'appareils appelés spectrographes ou spectromètres : elle permet d'obtenir leurs spectres électromagnétiques.

Etymologiquement, un spectre est une image. Le terme apparaît pour la première fois en français dans la traduction d'un ouvrage de Newton pour désigner l'image formée par la décomposition de la lumière (Fig.1). On appelle maintenant spectre toute trace (en général graphique) de la réponse de la matière à une perturbation extérieure. Cette perturbation est souvent une onde électromagnétique.



Fig.1 : Observation du spectre visible (Expérience d'Isaac Newton, 1666).

II. DOMAINES D'APPLICATION DE LA SPECTROSCOPIE

La spectroscopie permet d'expliquer un grand nombre de phénomènes qui nous entourent en permanence : la couleur de nos habits, la couleur du ciel....

Dans les laboratoires, elle permet:

- ✓ l'identification des molécules ;
- ✓ la détermination des structures ;
- ✓ l'étude des cinétiques de réaction ;
- ✓ la détermination des mécanismes réactionnels ;
- ✓ les dosages ;

- ✓ les analyses médicales (IRM, scintigraphie, mammographie...);
- ✓ Elle connaît aussi des applications importantes enastrochimie.

III. INTERACTION RAYONNEMENT-MATIÈRE

III.1. Rayonnement

III.1.1 Nature ondulatoire du rayonnement électromagnétique

Un rayonnement électromagnétique (ou radiation électromagnétique) est une onde constituée par deux champs oscillants : un champ électrique E et un champ magnétique H à la fois perpendiculaires entre eux et perpendiculaires à la direction de propagation (Fig.2).

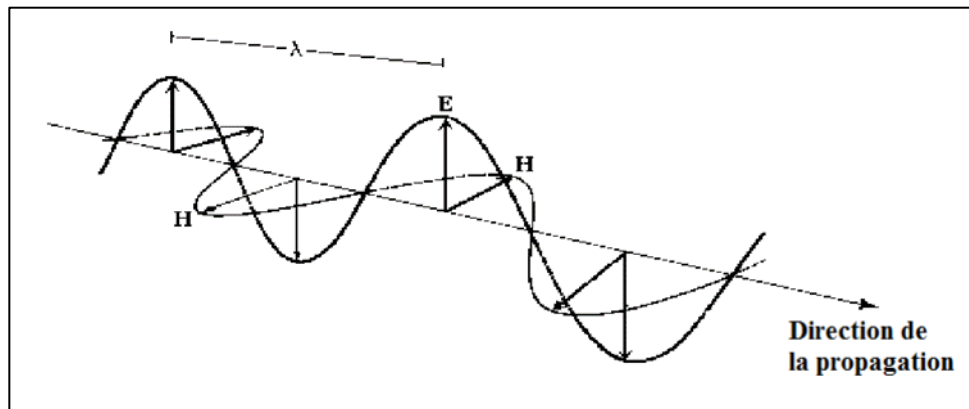


Fig.2 : Propagation d'une onde électromagnétique dans l'espace.

On caractérise un rayonnement électromagnétique par sa fréquence, sa longueur d'onde ou son nombre d'onde.

Fréquence(Hertz)	Longueur d'onde (mètre)	Nombre d'onde (m^{-1})
$\nu = \frac{1}{T}$	$\lambda = cT = \frac{c}{\nu}$	$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda}$
T: période (seconde)	C :vitesse de la lumière ($3.10^8 m.s^{-1}$)	

L'énergie du rayonnement est reliée aux grandeurs précédentes par la relation fondamentale de Planck : $E = h\nu$; h est la constante de Planck ($h = 6,624.10^{-34} J.s$).

L'ensemble des radiations constitue le spectre électromagnétique.

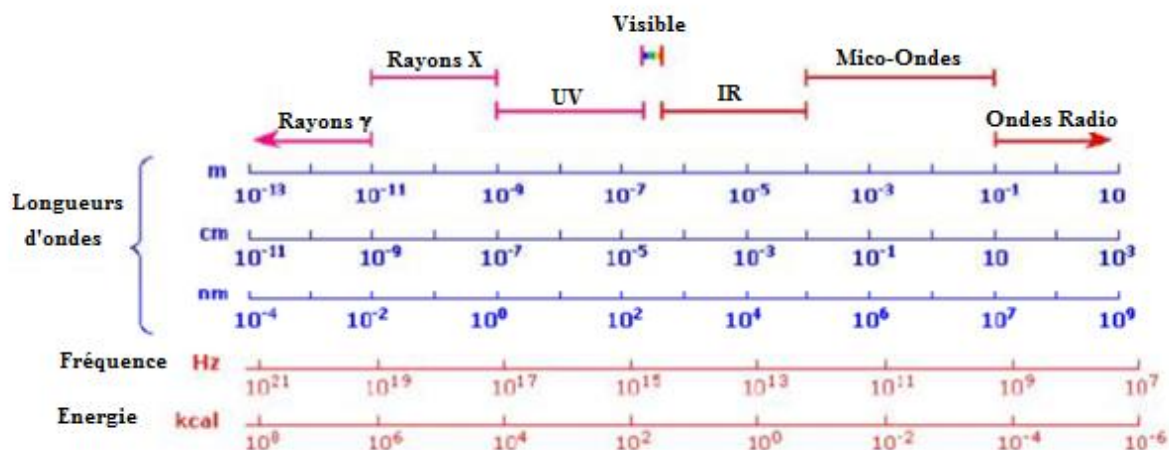


Fig.3 : Ensemble des radiations constituant le spectre électromagnétique.

La figure 3 présente le spectre électromagnétique limité à ses parties utiles en spectroscopie moléculaire. En partant des courtes longueurs d'onde, dans le domaine proche UV-visible les quanta $h\nu$ correspondent aux variations d'énergie électronique de la molécule. L'unité usuelle de cette région est le nm. Le spectre visible s'étend de 400 nm (violet) à 800 nm (rouge) environ. On trouve ensuite le « proche IR », peu utilisé en pratique, puis la région de 3 μm environ à 30 μm , dans laquelle les quanta correspondent aux variations d'énergie de vibration. L'unité usuelle dans ce domaine est le μm ou plus souvent le nombre d'onde en cm^{-1} . Le domaine des micro-ondes, de longueurs allant du cm au mm correspond aux échanges d'énergie de rotation. Enfin, les ondes de radiofréquence (englobant le domaine utilisé par la radio en modulation de fréquence) habituellement caractérisée par leur fréquence en MHz correspondent aux échanges d'énergie magnétique d'interaction des noyaux placés dans un champ magnétique intense (de l'ordre du Tesla). C'est donc le domaine de la RMN. Signalons que les rayons X (50 nm à $5 \cdot 10^{-2}$ nm) sont utilisés par les chimistes du solide pour la détermination des structures par diffraction. Leur énergie correspond à celle des orbitales atomiques internes (1s par exemple). A plus grande énergie, on rencontre enfin les rayons γ correspondant aux niveaux d'énergie des noyaux.

III.1.2 Nature corpusculaire du rayonnement électromagnétique

La nature ondulatoire de la lumière ne permet pas à elle seule d'interpréter les phénomènes d'interaction entre lumière et matière. Planck puis Einstein proposent la théorie des quanta :

La lumière est composée de grains d'énergie : les photons.

Le photon est une particule qui se propage à la vitesse de la lumière et possède un quantum d'énergie : $E = h\nu$; h est la constante de Planck.

III.2. Niveaux d'énergie moléculaire

Une particule élémentaire (atome, ion ou molécule) ne peut exister que dans certains états d'énergie quantifiés. Dans le cas d'une molécule, on considère que l'énergie totale est la somme des termes:

$$E = E_{\text{électronique}} + E_{\text{vibration}} + E_{\text{rotation}} + E_{\text{spin}}$$

Les ordres de grandeurs sont très différents : $E_e \gg E_v \gg E_r \gg E_s$.

Les niveaux d'énergie électronique, de vibration et de rotation sont représentés par un diagramme (Fig.4) dans lequel chaque niveau est schématisé par un trait horizontal et caractérisé par un ensemble de nombres quantiques n , v et J reliés respectivement aux mouvements électroniques, de vibration et de rotation de la molécule.

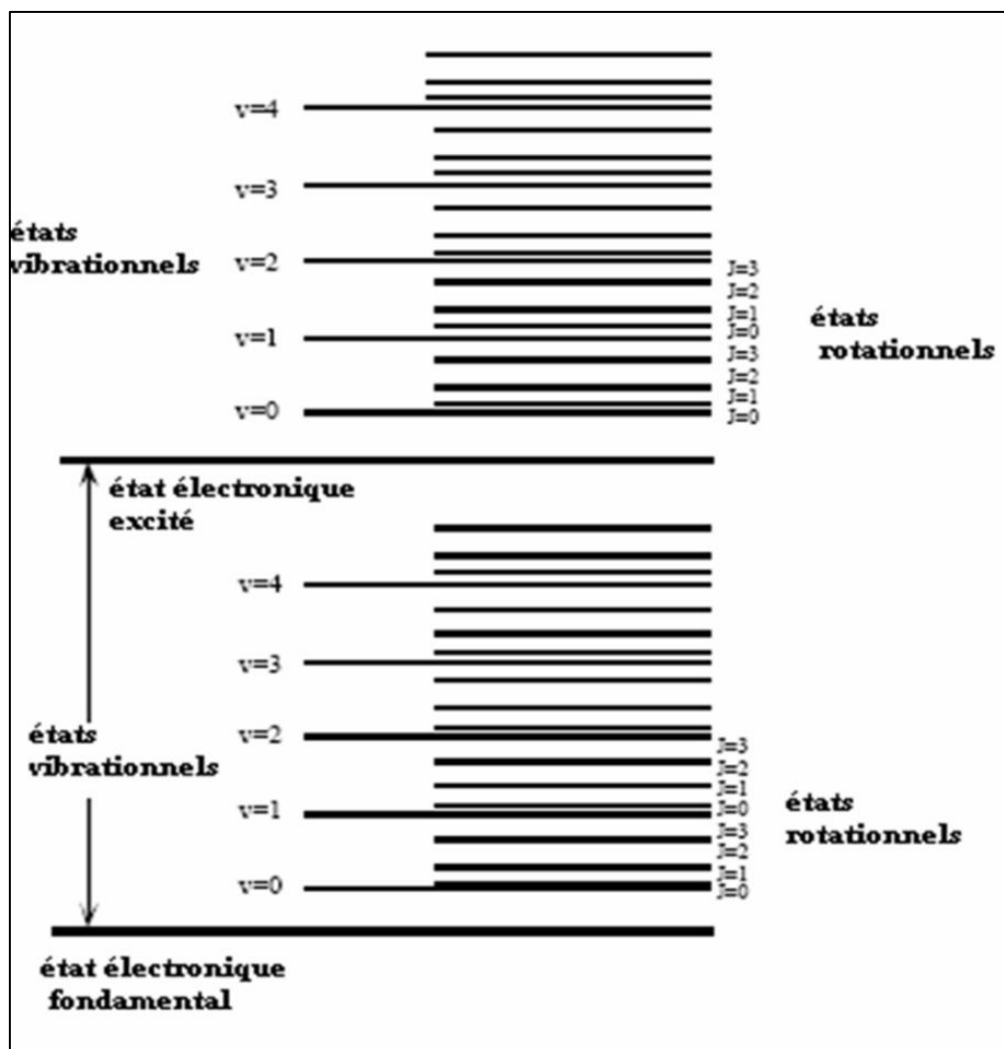


Fig.4 : Diagramme énergétique (niveaux d'énergie moléculaire).

Chaque particule élémentaire (atome, ion ou molécule) possède un ensemble unique d'états énergétiques. La particule peut se retrouver dans l'un ou l'autre de ces états.

Le nombre de particules sur un niveau énergétique donné s'appelle la population.

La population sur un niveau i par rapport à la population du niveau fondamental obéit à la loi de distribution de Maxwell-Boltzmann:

$$\frac{N_i}{N_0} = \left(\frac{g_i}{g_0} \right) e^{-\left(\frac{E_i - E_0}{kT} \right)}$$

N_i : nombre de particules dans l'état excité (i)

N_0 : nombre de particules dans l'état fondamental 0

g_i et g_0 : dégénérescence des états i et 0 respectivement

E_i et E_0 : énergie des états i et 0 respectivement

k : constante de Boltzmann ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$)

T : température en Kelvin.

En utilisant cette relation (Fig.5), on montre qu'à la température ordinaire; plusieurs niveaux de rotation sont peuplés;

- ❖ le niveau vibrationnel fondamental est peuplé par plus de 90 % des molécules, quelques % se plaçant sur le premier niveau excité;
- ❖ toutes les molécules sont dans l'état électronique fondamental.

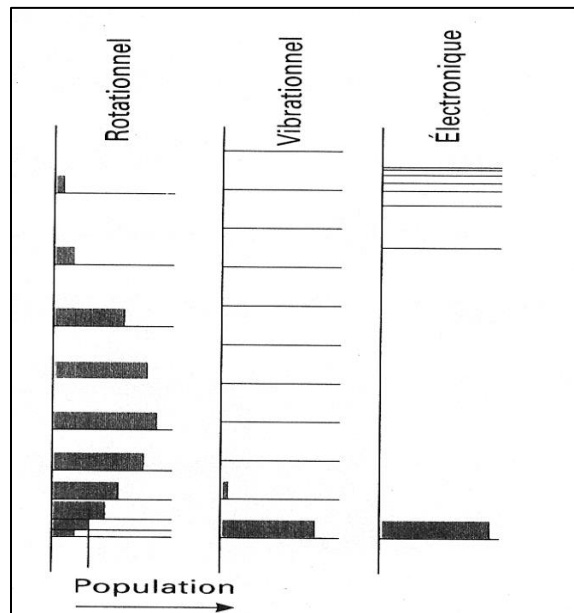


Fig.5 : population des niveaux moléculaires selon la loi de distribution de Maxwell-Boltzmann.

III.3. Interaction entre l'onde et la matière

Les échanges d'énergie entre matière et rayonnement ne peuvent s'effectuer que par quanta :

$\Delta E = h\nu$. Quatre processus sont à la base des phénomènes spectroscopiques : l'absorption, l'émission spontanée, l'émission stimulée (cas des lasers) et la diffusion.

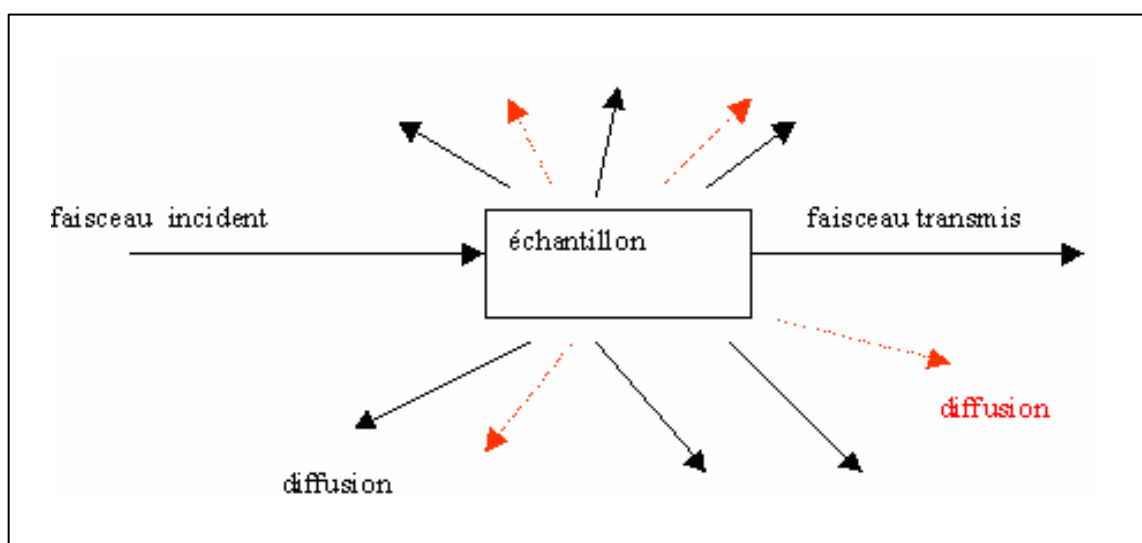
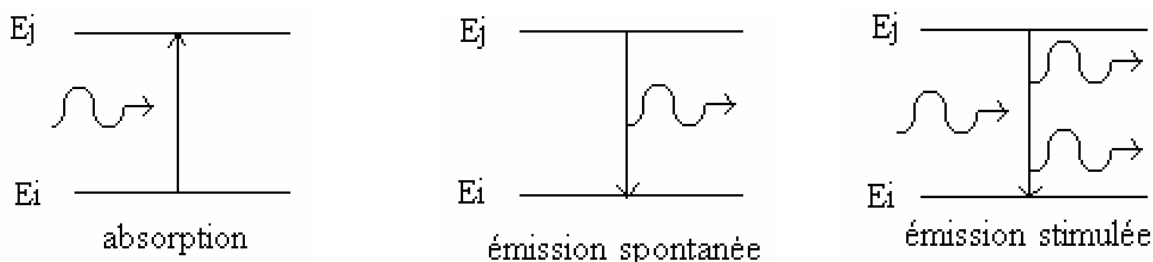


Fig.6 : Processus à la base des phénomènes spectroscopiques.

Suite à l'échange d'énergie, le rayonnement électromagnétique entraîne une perturbation du mouvement interne moléculaire. Il se produit une transition d'un niveau d'énergie vers un autre niveau d'énergie dépendant du mouvement provoqué (Tableau.1).

Tableau.1 : effets de différentes radiations sur les molécules.

Radiation absorbée	Effet sur la matière
Ondes radio	Transition spins nucléaires (résonance magnétique nucléaire RMN).
Micro-onde	Rotation moléculaire. Transition de spin électronique (résonance paramagnétique électronique RPE).
Infrarouge	Rotation et vibration moléculaire.
Visible et ultraviolet	Saut des électrons de valence.
Rayon X	Extraction des électrons des couches internes de l'atome.

IV. REGLES DE SELECTION

L'interaction onde-matière étant un phénomène quantique, il s'accompagne de règles de sélection. Les règles de sélection déterminent si une transition est autorisée ou interdite.

L'interaction onde-molécule ne peut se faire que si:

- ✓ la fréquence de la lumière correspond à l'écart énergétique (ΔE) niveaux concernés entre les entre les niveaux concernés.
- ✓ le mouvement provoque, à la même fréquence, la variation du moment dipolaire μ du système.

Si μ est le moment dipolaire électrique, alors les transitions sont de type dipolaire électrique (responsables des phénomènes observés dans l'UV, le visible et l'IR).

Si μ est le moment dipolaire magnétique, les transitions sont de type dipolaire magnétique (responsables des phénomènes de résonance magnétique nucléaire et de résonance paramagnétique électronique).

V. ETUDE EXPERIMENTALE : DONNEES CARACTERISTIQUES DES SPECTRES D'ABSORPTION

Un spectre d'absorption se présente généralement comme un graphe où sont portés (Fig.7) :

en abscisse le paramètre caractérisant les photons incidents : longueur d'onde λ ;

en ordonnée, un paramètre caractéristique de l'absorption ; si I_0 et I_t sont l'intensité incidente et transmise respectivement, on définit l'absorption a (en %), la transmission T (en %) et l'absorbance A , selon :

$$a = \frac{I - I_0}{I_0} 100$$

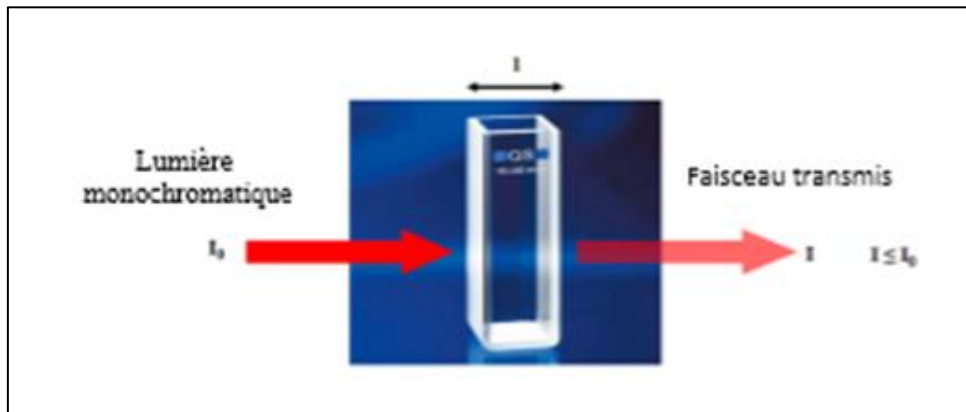
$$T = \frac{I_t}{I_0} 100$$

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I_t}$$

❖ Loi d'absorption de la lumière "loi de Beer-Lambert"

Lorsque la lumière arrive sur un milieu homogène de longueur l (trajet optique), une partie de cette lumière incidente notée I_0 est absorbée par le milieu et le reste, noté I , est transmis. La fraction de la lumière incidente absorbée par une substance de concentration c contenue dans une cuve de longueur l est donnée par la loi de Beer-Lambert :

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I_t} = \epsilon lc$$



ϵ : est coefficient d'extinction. C'est une grandeur caractéristique du composé. Si la concentration est en gramme par litre, ϵ est appelé coefficient d'extinction spécifique. Si la concentration est en mole par litre, ϵ est appelé coefficient d'extinction molaire.

❖ Condition d'utilisation de la loi de Beer-Lambert

- ✓ Lumière monochromatique ;
- ✓ Faibles concentrations ;
- ✓ La solution ne doit être ni fluorescente, ni hétérogène (bulles, précipité...) ;
- ✓ La solution n'est pas le siège d'une réaction photochimique ;
- ✓ La solution employée ne doit pas être colloïdales ;
- ✓ La nature de la substance ne doit pas varier avec la concentration (dissociation, polymérisation etc...).

La valeur de ϵ à une longueur d'onde donnée est une caractéristique de la molécule, le coefficient d'extinction molaire, qui s'exprime donc généralement en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$.

Lorsque le signal enregistré présente une certaine largeur, on parle de bande d'absorption (spectre de bandes) ; dans certains cas, ces bandes étant très étroites, on parle de spectres de raies.

Les spectres d'absorption dans le domaine UV-visible sont en général présentés sous la forme $A = f(\lambda)$ ou $\epsilon = f(\lambda)$. Les bandes d'absorptions peuvent être alors être caractérisées par la longueur d'onde λ_{max} au maximum d'absorptions et ϵ_{max} , valeur correspondante de ϵ (Fig. 6).

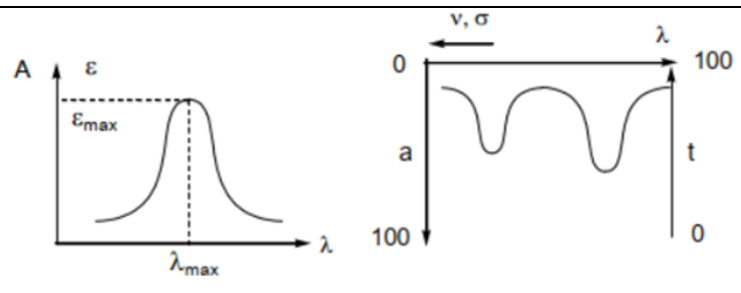


Fig. 6 : exemples de présentations de spectre d'absorption.

EXERCICES CORRIGES

Données: $h=6,624.10^{-34}\text{J.s}$

$c=3.10^8\text{m.s}^{-1}$

$1\text{eV}=1,602.10^{-19}\text{J}$

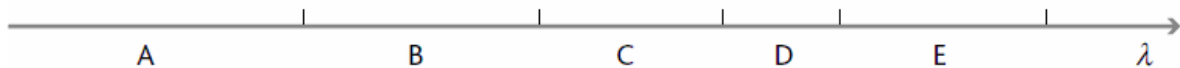
$N=6,02.10^{23}$

$k=1,38.10^{-23}\text{J.K}^{-1}$

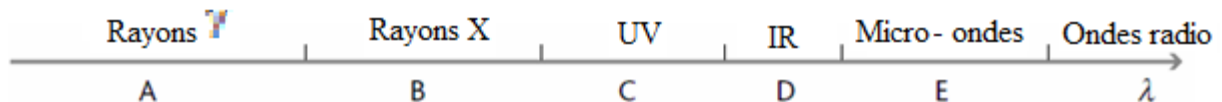
Exercice 1 :

Le spectre électromagnétique est formé de plusieurs domaines :Ultraviolet/Rayons X / Visible/Rayons gamma/Infrarouge.

Classer ces différents rayonnements par ordre de longueur d'onde λ croissante sur l'axe suivant:



Solution :



Exercice 2 :

Donner la relation qui lie l'énergie d'un photon et sa longueur d'onde. Préciser les unités de chaque terme.

1. Parmi les domaines indiqués dans la question 1, quel est celui auquel appartiennent les rayonnements les plus énergétiques? Justifier.
2. On dispose d'un laser de longueur d'onde 633 nm. A quel domaine du spectre électromagnétique peut-on associer cette lumière ? Quelle est l'énergie en joule et en eV du photon associé à cette onde ?

Solution :

1. Rayons γ

$$E = h\nu = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

E augmente avec la diminution de λ .

2. cette onde appartient au domaine du rayonnement visible.

$$E = h\nu = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$
$$E = \frac{6,624 \cdot 10^{-34} \cdot 3 \cdot 10^8}{6,33 \cdot 10^{-9}}$$

$$E = 3,14 \cdot 10^{-17} \text{ J} = 196 \text{ eV.}$$

Exercice 3 :

L'écart d'énergie entre un premier niveau vibrationnel excité ($v=1$) et le niveau vibrationnel fondamental ($v=0$) de la molécule $^{129}\text{I}^{35}\text{Cl}$ est de $4,597 \text{ kJ.mole}^{-1}$.

Déterminer le nombre d'onde en cm^{-1} de la transition entre ces deux niveaux en absorption et en émission.

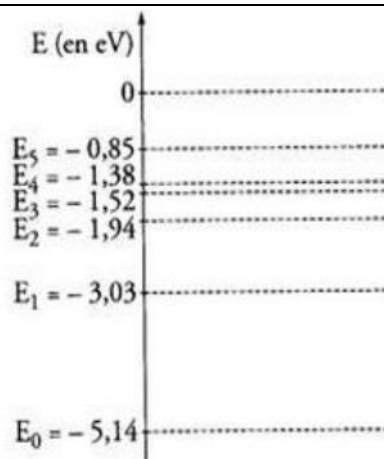
Solution :

$$E = h\nu = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$
$$\frac{1}{\lambda} = \frac{E}{h \cdot c}$$
$$\frac{1}{\lambda} = \frac{4,597 \cdot 10^3 \cdot 10^{-2}}{6,624 \cdot 10^{-34} \cdot 3 \cdot 10^8}$$
$$\frac{1}{\lambda} = 0,231 \cdot 10^{-31} \text{ cm}^{-1}$$

Exercice 4 :

Le spectre d'émission d'une lampe à vapeurs de sodium est un spectre de raies. Dans le visible, la raie la plus intense est la raie jaune, de longueur d'onde dans le vide

1. Calculer, en eV, l'énergie des photons associés à cette radiation
2. On donne le diagramme simplifié des niveaux d'énergie de l'atome de sodium.
 - a. Quel est le niveau d'énergie de l'état fondamental de l'atome ?
 - b. Vérifier que la raie jaune correspond à la désexcitation d'un atome de sodium du premier état excité vers l'état fondamental



Spectre de sodium

Solution :

1. L'énergie d'un photon de longueur d'onde est :

$$\Delta E = \frac{h \cdot \nu}{\lambda}$$

$$\text{D'où } \Delta E = \frac{(6,63 \cdot 10^{-34} \cdot 3,00 \cdot 10^8)}{589 \cdot 10^{-9}}$$

$$\Delta E = 3,38 \cdot 10^{-19} \text{ J} = 2,11 \text{ eV}$$

2. a. L'énergie du niveau fondamental est la plus faible énergie d'un atome, soit

$$E_0 = -5,14 \text{ eV}$$

b. La différence d'énergie entre le premier état excité et l'état fondamental d'un atome de sodium est :

$$E_1 - E_0 = -3,03 - (-5,14) = 2,11 \text{ eV}$$

C'est bien l'énergie d'un photon de la raie jaune de son spectre d'émission.

Exercice 5 :

On éclaire la vapeur de sodium avec une lumière blanche.

Le diagramme simplifié des niveaux d'énergie de l'atome de sodium est donné dans l'exercice 4.

Un atome de sodium, initialement à l'état fondamental, peut-il absorber un photon :

- dont l'énergie est de 3,0 eV ?
- de fréquence 8,75 Hz ?
- de longueur d'onde 679,5 nm ?

Solution :

a. on a : $\Delta E = 3,0 \text{ eV}$

Pour qu'un atome de sodium, initialement à l'état fondamental, puisse absorber un photon d'énergie 3,0 eV, il faut que la différence entre $E_{sup} - E_{inf}$ soit égale à 3,0 eV.

D'après le spectre du sodium :

$$E_4 - E_1 = -1,51 - (-5,14) = 3,63 \text{ eV}$$

$$E_3 - E_1 = -1,94 - (-5,14) = 3,2 \text{ eV}$$

$$E_2 - E_1 = -3,03 - (-5,14) = 2,11 \text{ eV}$$

Aucune des différences n'est égale à 3,00 eV donc un atome de sodium, initialement à l'état fondamental, ne peut pas absorber un photon d'énergie 3,0 eV.

Autre méthode :

Si l'atome de sodium pouvait absorber un photon d'énergie 3,0 eV, il existerait un niveau d'énergie E_n tel que : $\Delta E = E_n - E_1$

$$- 3,0 = E_n - (-5,14)$$

$$- 3,0 = E_n - (-5,14)$$

$$- 3,0 = E_n - (-5,14)$$

$$- E_n = -5,14 + 3,0$$

$$- E_n = -2,14$$

Or, ce niveau d'énergie n'existe pas, donc l'atome de sodium ne peut pas absorber un photon d'énergie 3,0 eV.

CHAPITRE II : SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION DANS L'UV-VISIBLE



I. INTRODUCTION

La spectroscopie d'absorption dans l'UV et le visible est une méthode très commune dans les laboratoires. Elle est basée sur la propriété des molécules d'absorber des radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée. La spectroscopie UV-visible est la plus ancienne et la plus utilisée des méthodes d'analyse dans les laboratoires. Elle permet notamment des applications quantitatives par application de la loi de Beer-Lambert. Cependant, elle ne fournit que peu d'informations structurales (Analyse qualitative) comparées aux autres méthodes spectroscopiques (IR, RMN et SM). De plus, la chromatographie liquide et l'électrophorèse capillaire ont favorisé le développement de détecteurs UV-visible perfectionnés, à l'origine d'un mode très courant d'obtention des chromatogrammes, accompagné de possibilités d'identification et de quantification des composés.

II. DOMAINE SPECTRAL DANS L'UV-VIS

La Spectroscopie ultraviolet-visible est une technique de spectroscopie mettant en jeu les photons dont les longueurs d'onde sont dans le domaine de l'UV-lointain (10-200 nm), du proche-UV (200-400 nm), du visible (400-800 nm) ou du proche infrarouge (750-1400 nm). Soumis à un rayonnement dans cette gamme de longueurs d'onde (Fig.1), les molécules, les ions ou les complexes sont susceptibles de subir une ou plusieurs transitions électroniques. Cette spectroscopie fait partie des méthodes de spectroscopie électronique.

La plupart des spectromètres vont de 185 à 900 nm. La limite inférieure des appareils dépend à la fois de la nature des matériaux optiques utilisés et de la présence ou non sur le trajet optique de l'air ambiant, sachant que le dioxygène et la vapeur d'eau absorbent de manière intense en dessous de 190 nm. Quelques instruments, à condition d'opérer sous vide, peuvent atteindre 150 nm avec des échantillons pris à l'état gazeux. C'est le domaine de l'ultraviolet du vide.

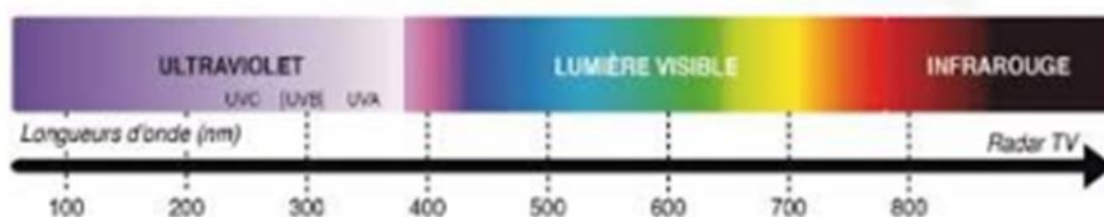


Fig.1 : domaine spectral des applications dans l'UV-visible.

III. PRINCIPE ET REGLES DE SELECTION

Une transition UV-visible (souvent 180 à 750 nm) correspond à un saut d'un électron d'une orbitale moléculaire fondamentale occupée à une orbitale moléculaire excitée vacante. La matière absorbe alors un photon dont l'énergie correspond à la différence d'énergie entre ces niveaux fondamental et excité. Les transitions électroniques sont permises sauf si $\Delta l = \pm 1$ et $\Delta S = 0$, c'est-à-dire qu'il y a transition entre orbitales de même spin et de symétrie différente. Les électrons qui participent à la formation d'une liaison entre atomes sont les électrons σ et π . Et les électrons des doublets non liants sont les électrons n .

Toutes les transitions énergétiquement possibles ne sont pas permises. Les transitions permises sont celles qui provoquent une variation du moment dipolaire électrique.

IV. SPECTRE D'ABSORPTION

Un spectre UV-visible est le tracé de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde (en nm). La bande d'absorption est caractérisée par sa position en longueur d'onde (λ_{\max}) et par son intensité reliée au coefficient d'extinction molaire ϵ_{\max} ($A = \epsilon lc$) ; la valeur de ϵ peut indiquer si la transition est permise ou interdite.

V LES DIFFERENTS TYPES DE TRANSITIONS ELECTRONIQUES

Les transitions électroniques correspondent au passage des électrons des orbitales moléculaires liantes ou non liantes remplies, vers des orbitales moléculaires antiliantes non remplies (Fig.2).

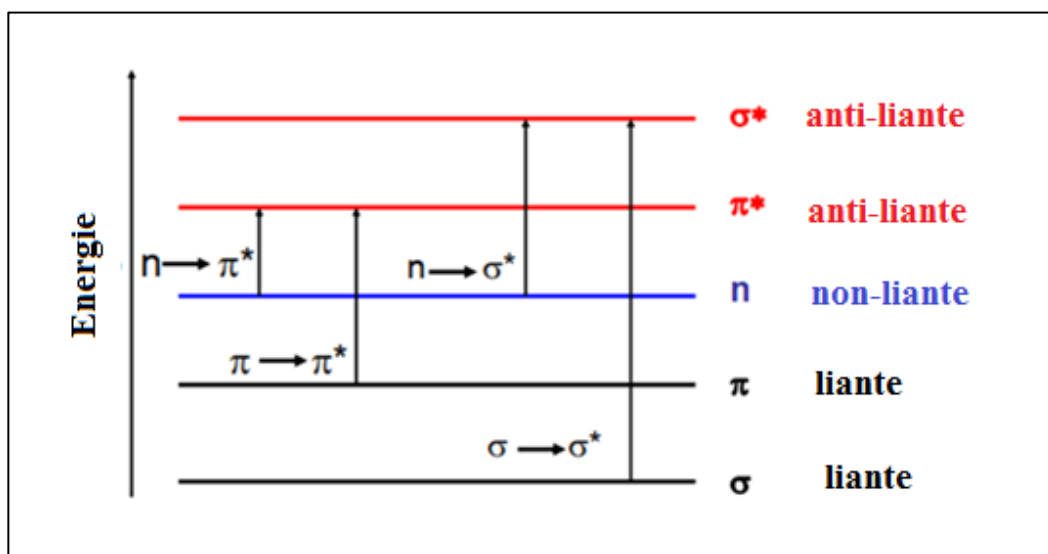


Fig.2 :différent types de transitions possibles.

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

Exemples :

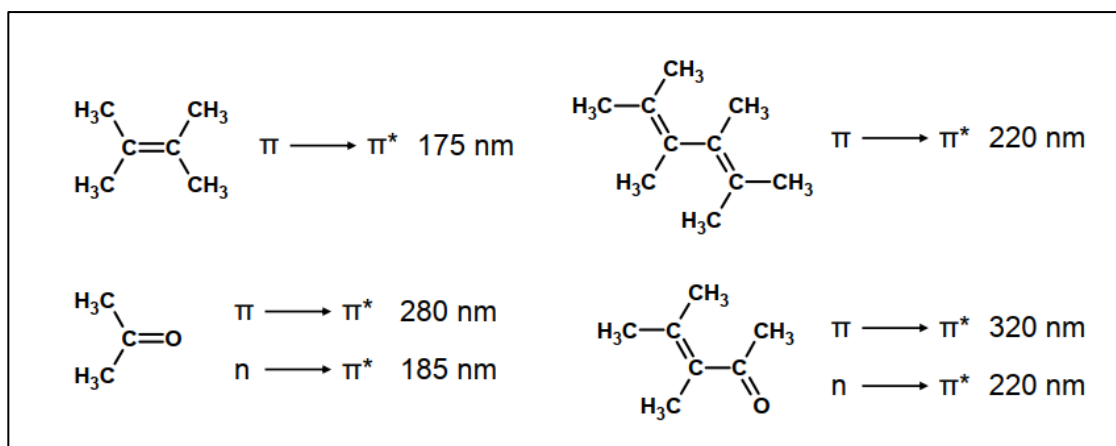


Fig.3 : exemples de quelques transitions électroniques des molécules organiques.

V.1. Transition $\sigma \rightarrow \sigma^*$

La grande stabilité des liaisons σ des composés organiques fait que la transition d'un électron d'une OM liante σ vers une OM antiliante σ^* demande beaucoup d'énergie. La bande correspondante est intense et située dans l'UV-lointain, vers 130 nm. Le coefficient d'absorption varie de 100 à 5000 L.mol⁻¹.cm⁻¹.

V.2 Transition $n \rightarrow \pi^*$

Cette transition résulte du passage d'un électron d'une OM non-liante n à une OM antiliante π^* . Ce type de transition a lieu dans le cas des molécules comportant un hétéroatome porteur de doublets électroniques libres appartenant à un système insaturé. La plus connue est celle qui correspond à la bande carbonyle, facilement observable, située entre 270 et 295 nm. Le coefficient d'absorption molaire est faible. La bande correspondante est faible car la transition est interdite. Le coefficient d'absorption est compris entre 10 et 100 $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Exemple : éthanal : $\lambda = 293 \text{ nm}$ ($\epsilon = 12$, dans l'éthanol comme solvant).

V.3. Transition $n \rightarrow \sigma^*$

Le transfert d'un électron du doublet n d'un hétéroatome (O, N, S, Cl..) à un niveau σ^* est observé pour les alcools, les éthers, les amines ainsi que pour les dérivés halogénés. Cette transition donne une bande d'intensité moyenne qui se situe conduit à qui se situe vers 180 nm pour les alcools, vers 190 nm pour les éthers ou les dérivés halogénés et vers 220 nm pour les amines.

Exemples :

méthanol : $\lambda_{\text{max}} = 183 \text{ nm}$ ($\epsilon = 50$) ; éther : $\lambda_{\text{max}} = 190 \text{ nm}$ ($\epsilon = 2\ 000$)

éthylamine : $\lambda_{\text{max}} = 210 \text{ nm}$ ($\epsilon = 800$) ; chloro-1-butane : $\lambda_{\text{max}} = 179 \text{ nm}$.

V.4. Transition $\pi \rightarrow \pi^*$

La transition électronique dans les composés possédant une double liaison isolée conduit à une forte bande d'absorption vers 165-200 nm. Les transitions sont fortes avec un coefficient d'absorption allant de 1000 à 10000 $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Exemple :

éthylène : $\lambda_{\text{max}} = 165 \text{ nm}$ ($\epsilon = 16\ 000$).

V.5 Transition $d \rightarrow d^*$

De nombreux sels inorganiques, comportant des électrons engagés dans des orbitales moléculaires d , conduisent à des transitions de faible absorptivité situées dans le domaine visible, responsables de colorations. Ainsi les solutions des sels métalliques de titane $[\text{Ti}(\text{H}_2\text{O})_6]^{+++}$ ou de cuivre $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{++}$ sont bleues, le permanganate de potassium donne des solutions violettes, etc..

Les coefficients d'absorption sont en général très faibles de 1 à 100 $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Exemples :

Molécule	Transition	$\lambda_{\max}(\text{nm})$	E
Ethylène (C=C)	$\pi \rightarrow \pi^*$	165	15000
1-hexyne (C≡C)	$\pi \rightarrow \pi^*$	180	10000
Ethanal (C=O)	$n \rightarrow \pi^*$	293	12
	$\pi \rightarrow \pi^*$	180	10000
Nitrométhane (NO ₂)	$n \rightarrow \pi^*$	275	17
	$\pi \rightarrow \pi^*$	200	5000
Bromure de méthyle (H ₃ C-Br)	$n \rightarrow \sigma^*$	205	200

La figure.4 permet de Comparer les transitions les plus souvent rencontrées dans les composés organiques simples.

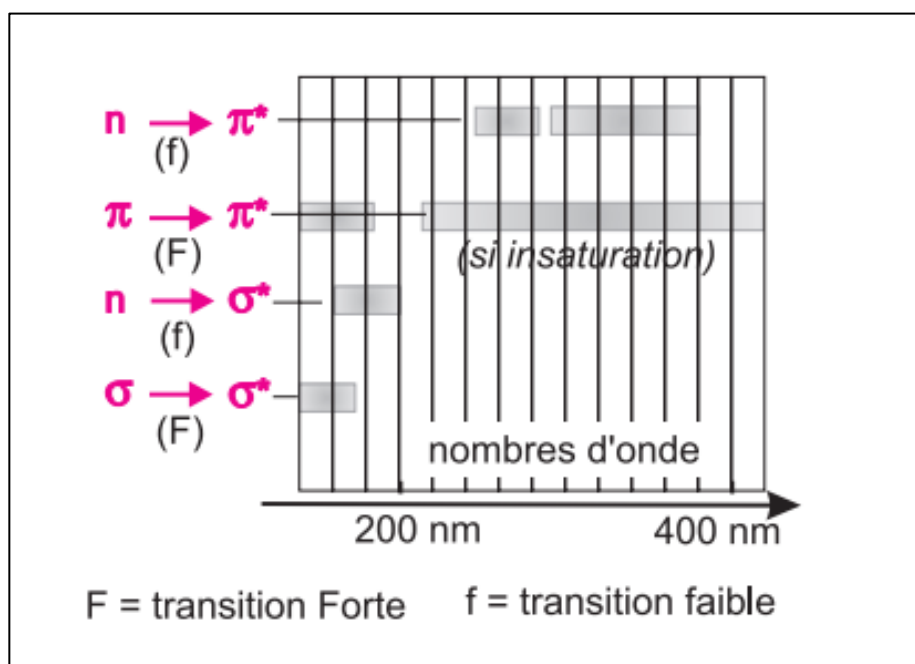


Fig.4 : Comparaison des transitions les plus souvent rencontrées dans les composés organiques simples.

VI. FACTEURS INFLUENÇANT LES TRANSITIONS ELECTRONIQUES

VI.1. Terminologie

- ✓ **Groupements chromophores :** Les groupes fonctionnels des composés organiques (cétones, amines, dérivés nitrés, etc.) responsables de l'absorption en UV-visible sont appelés groupements chromophores. Une espèce formée d'un squelette carboné transparent dans le proche UV et porteur d'un ou de plusieurs chromophores constitue un chromogène.

Nom	Chromophore	λ_{\max} (nm)	ϵ_{\max} (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
amine	-NH ₂	195	3 000
oxime	= NOH	190	5 000
nitro	- NO ₂	210	3 000
nitrite	- ONO	230	1 500
nitrate	- ONO ₂	270	12
nitroso	-N = O	300	100

Pour une série de molécules possédant le même chromophore la position et l'intensité des bandes d'absorption restent sensiblement constantes. Si une molécule possède plusieurs chromophores isolés, c'est-à-dire n'interagissant pas l'un sur l'autre parce que séparés par au moins deux liaisons simples, on observe la superposition des effets de chacun des chromophores individuels.

- ✓ **Groupement auxochrome:** groupement saturé lié à un chromophore et qui modifie la longueur d'onde et l'intensité de l'absorption. Ex. : OH, NH₂, Cl...
- ✓ **Effet bathochrome :** déplacement des bandes vers les grandes longueurs d'onde.
- ✓ **Effet hypsochrome:** déplacement des bandes vers les courtes longueurs d'onde.
- ✓ **Effet hyperchrome :** augmentation de l'intensité d'absorption.
- ✓ **Effet hypochrome :** diminution de l'intensité d'absorption.

Ces effets sont illustrés sur la figure 5:

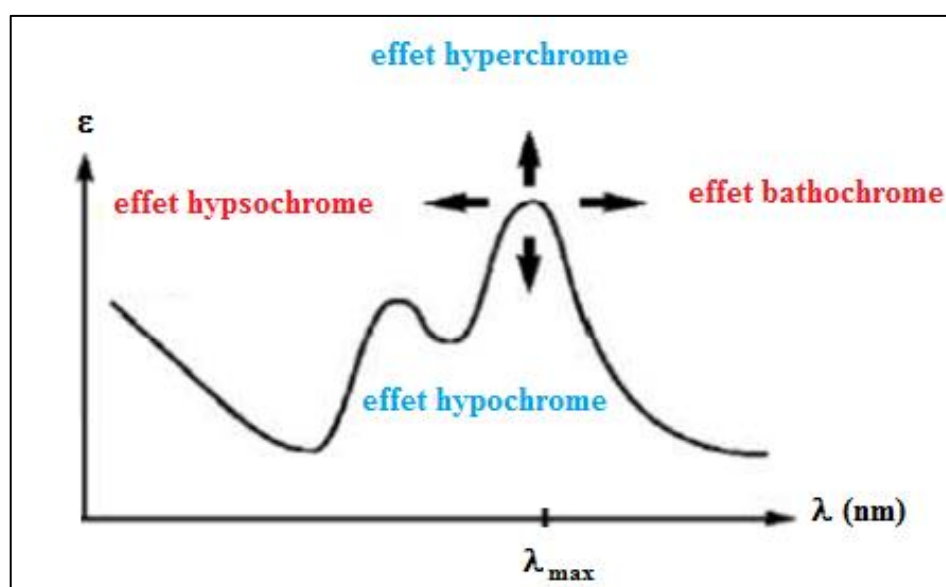





Fig.5 : variations de l'absorbance.

VI.2. Effet de la substitution

La position de la bande d'absorption dépend de la présence ou non de substituants sur le groupement chromophore. Par exemple, plus le groupe éthylénique est substitué plus la bande d'absorption due à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ est déplacée vers le visible : effet bathochrome.

Exemples :

Molécules	λ_{\max} (nm)	ϵ_{\max} (l.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
	165	1500
	170	20000
	174	24000

Les substituants à effet mésomère (auxochromes -OH, -OR, -X, -NH₂, ...) portés par un chromophore C=C ou C=O donnent des effets bathochrome et hyperchrome.

VI.3. Effet de la conjugaison

VI.3.1. Composés éthyléniques

L'enchaînement d'insaturations entraîne la délocalisation des électrons π . Cette délocalisation qui traduit la facilité des électrons à se mouvoir le long de la molécule est accompagnée d'un rapprochement des niveaux d'énergies. Il est à noter que la conjugaison en plus qu'elle déplace la bande d'absorption vers le visible, elle augmente aussi le coefficient d'extinction molaire avec un effet bathochrome et un effet hyperchrome (Fig.6).

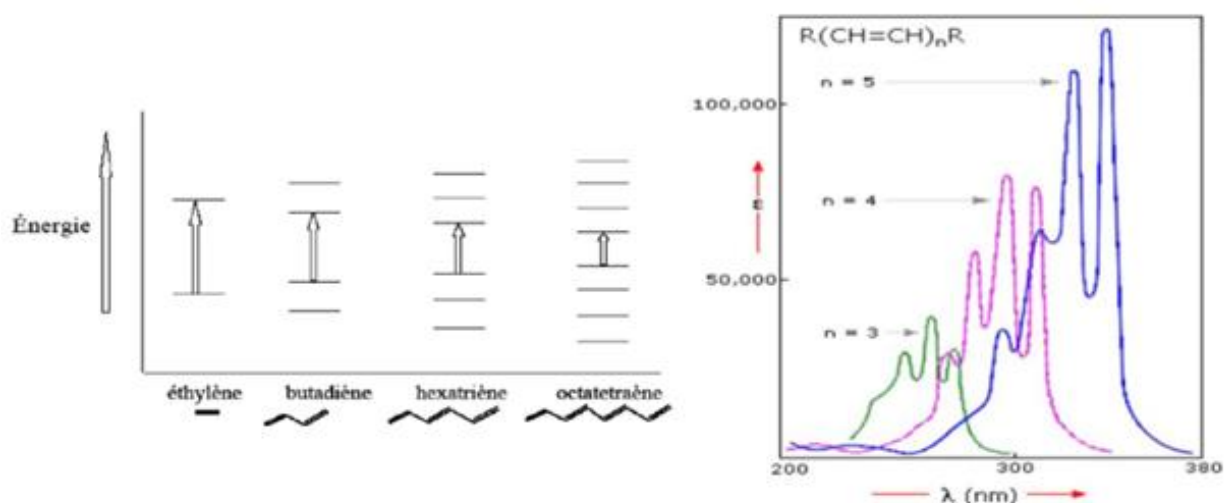



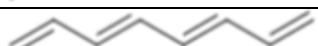







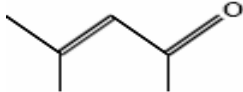
Fig.6 : effet de la conjugaison des composés éthyléniques leurs spectres d'absorption UV-visible.

Le tableau 14 illustre l'évolution du maximum d'absorption des polyènes en fonction du nombre n des liaisons conjuguées.

Tableau 1 : Evolution du maximum d'absorption des polyènes en fonction du nombre n des liaisons conjuguées.

Composés éthyléniques	n	λ_{\max} (nm)
	1	165
	2	217
	3	268
	4	304
	5	334
	6	364
	7	405
	8	440
	11	485

Il en découle un effet bathochrome et un effet hyperchrome sur la bande d'absorption correspondant à la transition $n \rightarrow \pi^*$ (même effet est observé sur la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ sur les exemples qui précèdent.).

Composés	transition $\pi \rightarrow \pi^*$	transition $n \rightarrow \pi^*$
Propanone $\text{CH}_3\text{-CO-CH}_3$	188 nm	279 nm
Méthyl isobutylcétone ou oxyde de mésityle 	236 nm	315 nm

Remarque : Le déplacement bathochrome est à l'origine de la couleur de nombreux composés naturels qui présentent des chromophores conjugués étendus.

Exemple : La couleur orangée du β -carotène provient de la réunion de onze doubles liaisons conjuguées : $\lambda_{\text{max}} = 497$ et 466 nm (dans le chloroforme) avec $\epsilon_{\text{max}} = 133000 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ Fig.7.

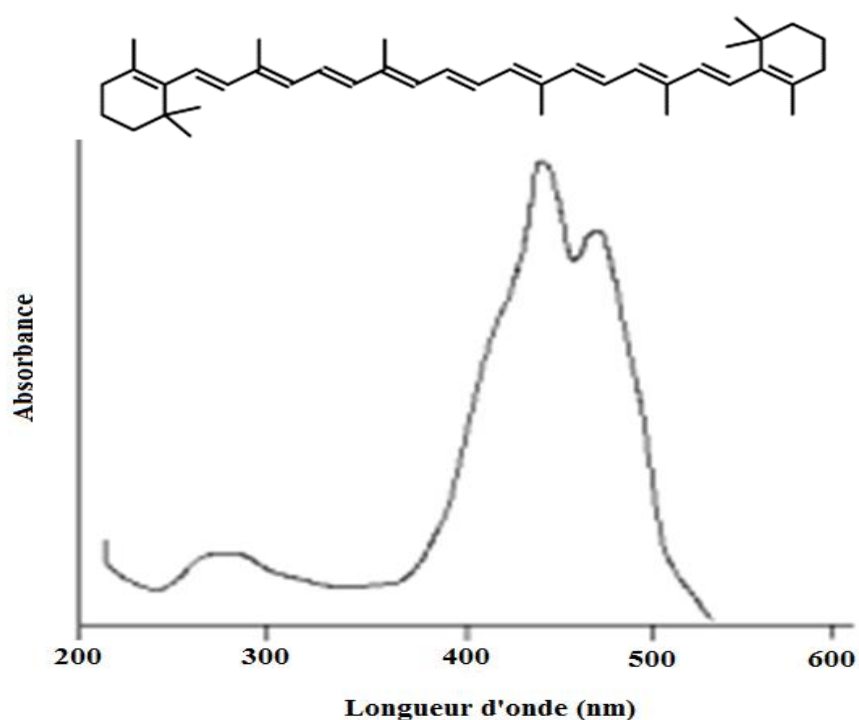


Fig.7: spectre UV-visible du β -carotène.

VI.3.2. Composés benzéniques

L'absorption des composés aromatiques est beaucoup plus complexe que celle des éthyléniques. Plusieurs transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ sont observées. Le spectre UV du benzène présente 3 bandes dues à des transitions $\pi \rightarrow \pi^*$.

- ✓ $\lambda_{\text{max}} = 184 \text{ nm}$, $\epsilon = 60000 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.
- ✓ $\lambda_{\text{max}} = 203 \text{ nm}$, $\epsilon = 7900 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.
- ✓ $\lambda_{\text{max}} = 256 \text{ nm}$, $\epsilon = 200 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

Pour les aromatiques polynucléaires, plus le nombre de cycles condensés augmente, plus l'absorption se déplace vers de plus grandes longueurs d'onde jusqu'à atteindre la région du visible (Fig.8).

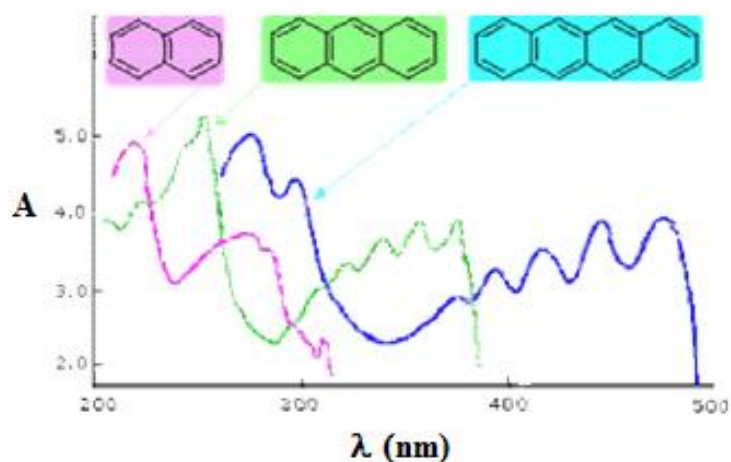


Fig.8 : variation du spectre UV-visible des aromatiques polynucléaires avec le nombre de cycles condensés.

Pour les espèces inorganiques ; les transitions électroniques sont entre les orbitales d et λ_{\max} et dépend des paramètres suivants :

- ✓ Nature du métal ;
- ✓ Degré d'oxydation du métal
- ✓ Environnement (géométrie, champs de ligand)

La figure 9 montre les spectres UV-visible de quelques ions métalliques.

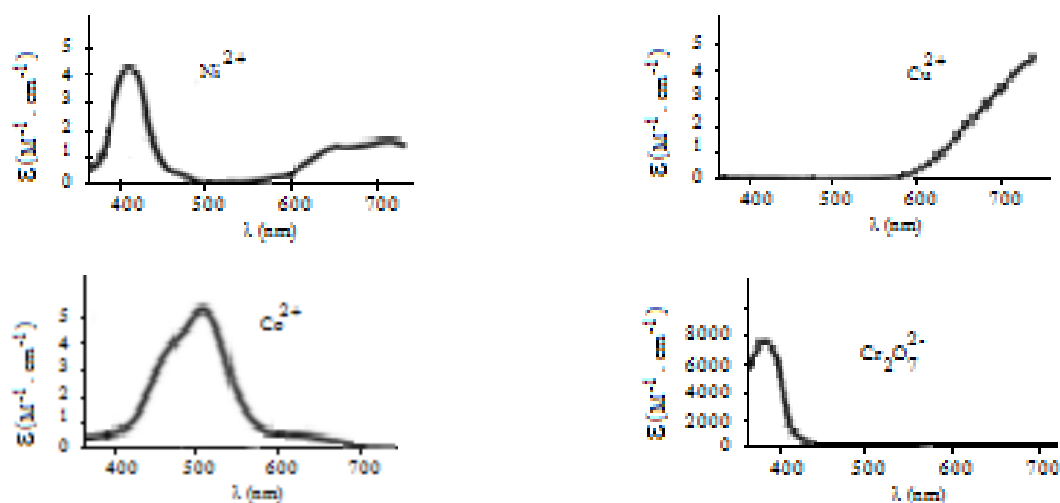


Fig.9 : Montre les spectres UV-visible de quelques métaux.

VI.4. Effet du solvant

La position, l'intensité et la forme des bandes des composés en solution dépendent du solvant. Ces changements traduisent les interactions physiques soluté-solvant qui modifient la différence d'énergie entre état fondamental et état excité.

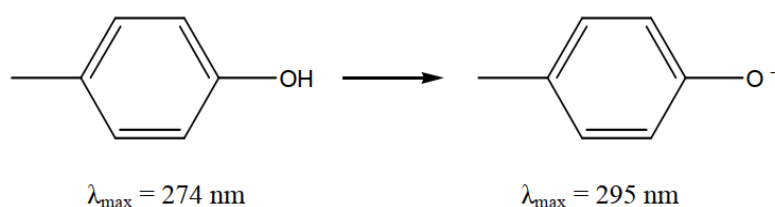
Par augmentation de la polarité du solvant : Transition $n \rightarrow \pi^*$: effet hypsochrome

Transition $\pi \rightarrow \pi^*$: effet bathochrome

VI.5. Effet du pH

Dans l'eau, les spectres sont très souvent sensibles au pH qui modifie l'ionisation de certaines fonctions chimiques.

Exemple :



Parmi les composés qui manifestent cet effet de manière spectaculaire, on trouve les indicateurs colorés dont le changement de couleur est mis à profit au cours de dosages acidimétriques (Fig.10). C'est ainsi qu'on peut repérer les points d'équivalence.

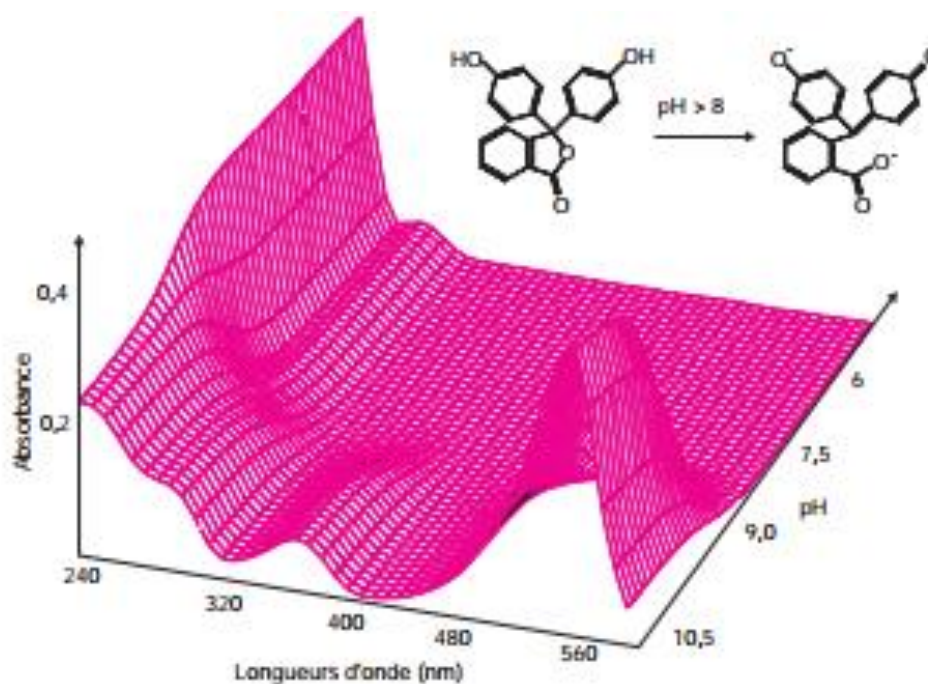


Fig.10 : Effet du pH sur une solution de phénolphtaléine.

Une solution de phénolphthaléine est incolore pour des pH inférieurs à 8 et rose vif pour des pH supérieurs à 9,5. Le graphe présenté ici en perspective montre bien que pour des pH acides il n'y a pas d'absorption dans la partie visible du spectre. En revanche, c'est l'absorption vers 500 nm qui apparaît quand le pH devient alcalin, qui est responsable de la couleur bien connue de ce composé. On notera pour cet exemple, la modification des liaisons chimiques selon le pH.

VII. APPLICATION DE LA SPECTROMETRIE UV-VISIBLE

VII.1. Analyse qualitative

La spectrométrie UV-visible n'est pas utile pour caractériser les composés organiques, les spectres présentent peu de bandes qui ne sont pas caractéristiques. En effet, des groupements chromophores différents peuvent absorber à la même longueur d'onde en raison des déplacements dus à leur environnement.

VII.2. Analyse quantitative

Lorsque le spectre d'une molécule ou d'un ion est connu, la spectrométrie UV-visible est très utile pour faire de l'analyse quantitative (loi de **Beer-Lambert**).

❖ Exemple : **Détermination de la concentration d'une solution par étalonnage (Fig.11)**

: A partir de la loi de Beer Lambert, il est possible de déterminer la concentration d'une espèce par mesure de son absorbance. Pour cela, on peut suivre le protocole expérimental suivant :

- ✓ On détermine la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption λ_{\max} .
- ✓ On prépare une série de solution à différentes concentrations C_i , et on mesure l'absorbance A_i de chacune de ces solutions à λ_{\max} .
- ✓ On trace la courbe d'étalonnage $A_i=f(C_i)$.

On mesure l'absorbance A de notre solution de concentration inconnue à λ_{\max} . A partir de la courbe on peut lire la concentration C de notre solution d'absorbance A .

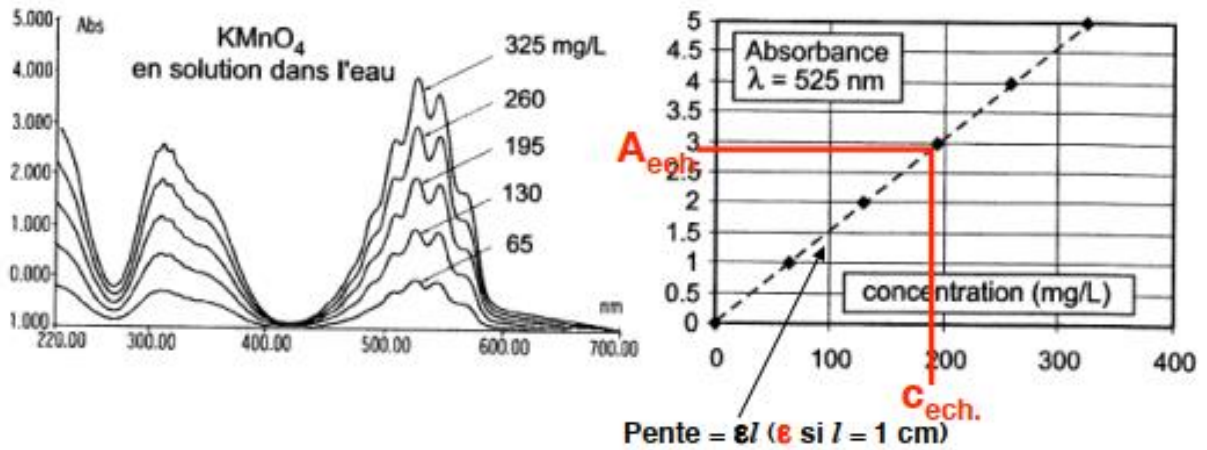


Fig.11 : (a) Spectre UV-visible des solutions des différentes concentrations de KMnO₄ en solutions aqueuses ; (b) Courbe d'étalonnage à partir des solutions dans (b).

Les solutions étalons doivent avoir une composition voisine de celle des échantillons afin de minimiser les effets des divers constituants (effet de matrice).

VII.3. Additivité de l'absorbance

A une longueur d'onde λ , l'absorbance A d'un mélange de n espèces absorbantes est la somme des absorbances des espèces.

$$A = \sum_{i=0}^n A_i(\epsilon_i \cdot l \cdot C_i)$$

Ce principe est illustré par l'étude des points isobestiques : considérons un composé A qui se transforme par une réaction du premier ordre en un composé B. Supposons que les spectres d'absorption de A et de B, enregistrés séparément dans un même solvant et à la même concentration, se coupent en un point. Lorsqu'on les superpose (fig. 12). Pour la longueur d'onde du point I, les absorbances des deux solutions sont les mêmes, et par conséquent les coefficients ϵ_A et ϵ_B sont égaux ($\epsilon_A = \epsilon_B = \epsilon$). Or dans ce type de transformation on a initialement A pur et pour finir B pur. Pour tout mélange intermédiaire, la concentration totale des mélanges de A et de B ne varie pas ($C_A + C_B = C_{ste}$),

$$A_I = \epsilon_A \cdot l \cdot C_A + \epsilon_B \cdot l \cdot C_B = \epsilon \cdot l \cdot (C_A + C_B)$$

Tous les spectres des mélanges A + B formés au cours du temps passeront donc par le point I, appelé point isobestique, où l'absorbance A conservera la même valeur. Ces réseaux de courbes concourantes se rencontrent quand on étudie le virage d'un indicateur coloré en fonction du pH, ou au cours de l'étude des cinétiques de réaction.

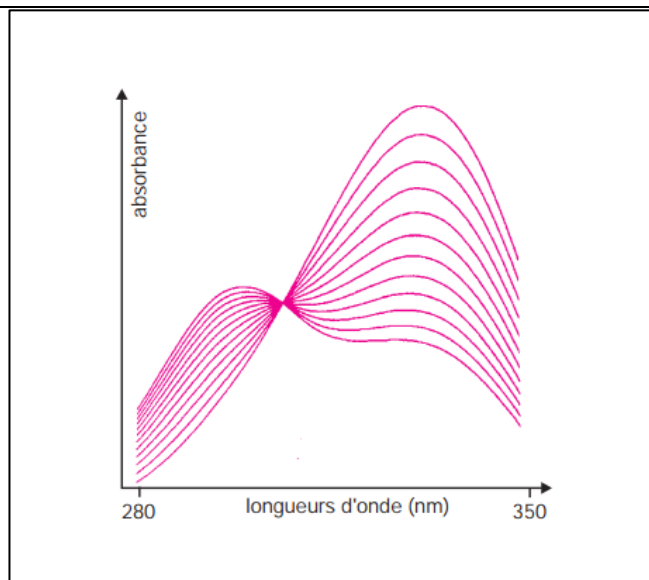


Fig.12 : Pointisobestique ; Hydrolyse alcaline à 25 °C du salicylate de méthyle, Superposition des spectres successifs enregistrés entre 280 et 350 nm à des intervalles de 10 min.

VII.4. Limites de validité de la loi de Beer-Lambert

- ✓ solutions diluées ($c < 0,01 \text{ M}$).
- ✓ absence d'interactions soluté-solvant.
- ✓ lumière monochromatique (impossible dans l'absolu).
- ✓ influence de la lumière parasite, éviter de travailler à $A > 1,5$.

VIII. INSTRUMENTATION DANS L'UV-VISIBLE

L'étude des absorptions nécessite l'utilisation d'un appareil appelé spectromètre. Le mot spectrophotomètre est dérivé du latin *spectrum*, qui signifie image, et du grec *phos* ou *photos*, qui signifie lumière.

La figure suivante représente le schéma de principe d'un spectromètre d'absorption UV- visible double faisceau (c'est le genre d'appareil le plus utilisé).

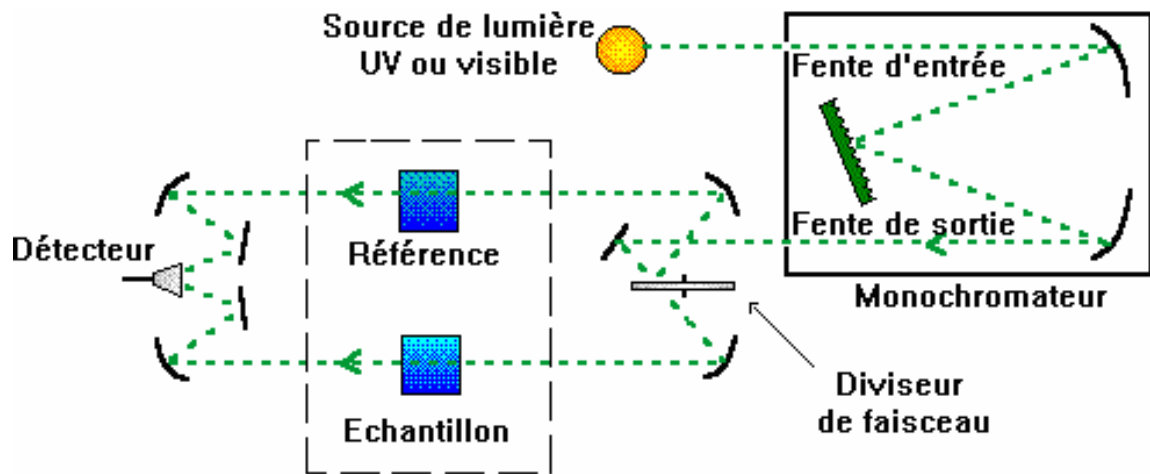
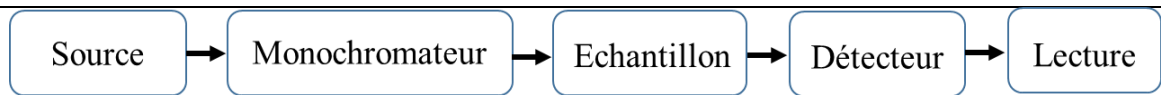


Fig.13 : Schéma de principe d'un spectromètre d'absorption UV- visible doublefaisceau.

Il est constitué des éléments suivants :

VIII.1. Sources lumineuses

Le rôle de la source est de fournir la radiation lumineuse continue pouvant couvrir efficacement la totalité de la gamme spectrale concernée. C'est la raison pour laquelle beaucoup de spectromètres comportent deux lampes à usage de sources, l'une pour la partie du proche UV et l'autre pour la partie s'étendant vers le visible. On les trouve généralement réunies : Les plus importantes sources lumineuses sont les suivantes :

- ✓ Lampe à décharge au deutérium utilisée dans le domaine de 190 à 400 nm.



- ✓ Lampe à filament de tungstène pour la région allant de 350 à 800 nm.



- ✓ Lampe à décharge au xénon utilisée dans le domaine UV et visible (Lampe très énergétique qui fonctionne sous forme de flash, juste au moment de faire une mesure).



VIII.2. Monochromateur

Appareils séquentiels. Les radiations émises par la source sont dispersées par un réseau plan ou concave qui fait partie d'un montage appelé monochromateur. Ce dispositif permet d'extraire de la lumière émise par la source, un domaine étroit de son spectre d'émission. La longueur d'onde, ou plus exactement la largeur de la bande spectrale qui est fonction de la largeur de fente, varie graduellement au cours du temps par pivotement du réseau. Les meilleures résolutions sont obtenues avec des montages comportant des monochromateurs de grandes distances focales.

L'échantillon et le détecteur, placés juste derrière le monochromateur, ne seront donc traversés que par un domaine étroit de longueurs d'onde.

VIII.3. Diviseur de faisceau ou photomètre

La lumière monochromatique qui émerge du monochromateur est séparée en deux faisceaux qui traversent les compartiments de l'échantillon et de la référence.

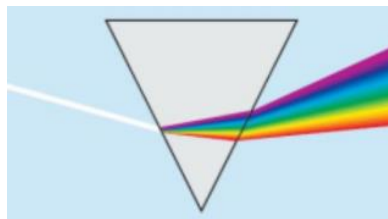
VIII.4. Appareils de dispersion

Les appareils de dispersion dispersent les longueurs d'onde de lumière à des angles différents. S'ils sont combinés avec une fente de sortie appropriée, ces appareils peuvent être utilisés pour sélectionner une longueur d'onde particulière (ou plus précisément, une bande d'onde étroite) de lumière d'une source continue.

Il existe deux types d'appareils :

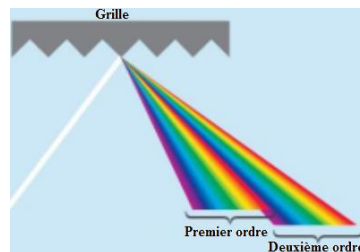
✓ **Prismes**

Ils génèrent un arc-en-ciel de lumière ; l'inconvénient est que l'angle de dispersion est sensible à la température.



✓ **Réseaux holographiques**

Ils ne sont pas sensibles à la température ; la lumière arrivant sur le réseau est réfléchiée à différents angles, selon la longueur d'onde.



VIII.5. Détecteurs

Un détecteur convertit un signal lumineux en signal électrique. Idéalement, il devrait donner une réponse linéaire sur une large gamme avec un excellent rapport signal/bruit et une haute sensibilité.

✓ **Détecteur de type photomultiplicateur**

Combine la conversion du signal avec différentes étapes d'amplification dans le tube ; la gamme de longueurs d'onde entière est scannée.

✓ **Détecteur à photodiode**

La lumière arrivant sur le matériau semiconducteur permet aux électrons de le traverser, réduisant ainsi la charge dans un condensateur connecté à travers le matériau. La quantité de

charge nécessaire pour recharger le condensateur est proportionnelle à l'intensité de la lumière ; toute la gamme de longueurs d'onde est mesurée en une fois.

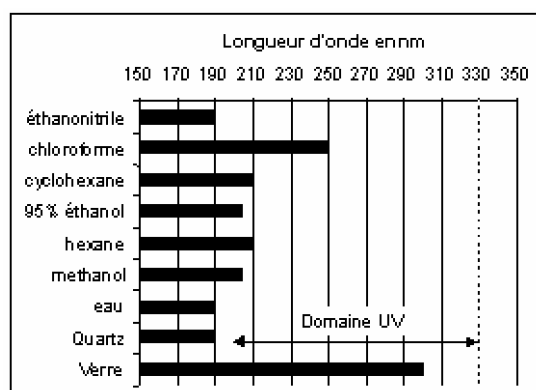
- ✓ Le logiciel dédié à l'appareil permet de commander l'analyse voulue (longueur d'onde, nombre de mesures) et restitue le résultat (spectre, valeurs d'absorbance...) en quelques secondes.
- ✓ L'absorbance de l'échantillon est alors reportée sur le graphique et l'on détermine la concentration correspondante.

❖ Echantillonnage

Les composés peuvent être étudiés dans divers états physiques (gazeux, liquide, solide ...). Généralement, les spectres sont enregistrés à partir de solutions diluées.

❖ Solvants

Pour l'étude en solution, le solvant doit être convenablement choisi : il doit dissoudre le produit et être transparent (n'absorbe pas) dans la région examinée. Le tableau suivant donne la zone d'absorption de certains solvants



d'absorption de certains matériaux.

Exemple : L'hexane peut être utilisé comme solvant pour des échantillons qui absorbent à des longueurs d'onde supérieures à 210 nm.

2

❖ Cellules

La solution à étudier doit être placée dans une cellule ou cuve. Les cuves ont différentes épaisseurs et sont en quartz pour le domaine UV-visible. Le verre est réservé aux mesures dans le domaine visible uniquement. Particulièrement les faces polies doivent être placées sur le trajet lumineux. Les faces de la cuve placée dans le faisceau UV-visible doivent être parfaitement propres et exemptes de rayures. Elle peut être nettoyée au moyen de papier joseph (papier très fin n'entraînant pas de micro-rayures). En versant le mélange dans la cuve, il faut également s'assurer qu'aucune bulle ou impureté pouvant impacter le rayonnement incident ne soit présentes.



IX. APPLICATIONS DE LA SPECTROSCOPIE UV-VISIBLE

IX.1. Analyse qualitative

Le spectre UV ou visible ne permet pas l'identification d'un produit mais celle du groupement chromophore qu'il contient.

IX.2. Analyse quantitative

L'analyse quantitative par la spectrométrie UV-visible est très employée grâce à l'utilisation de la loi de Beer-Lambert. Ces mesures ont des applications dans divers domaines :

- ❖ En laboratoire:
 - ✓ Suivi de la cinétique d'une réaction ;
 - ✓ Mesure des constantes de dissociation d'acides et de bases ou des constantes de complexation...;
 - ✓ Détermination de la composition d'un mélange (benzène dans le cyclohexane) ;
 - ✓ Étude d'isomérisation cis-trans ou de tautomérisation ;
 - ✓ Policescientifique ;
 - ✓ Expertisejudiciaire.
- ❖ Environnement:
 - ✓ Ozone dans l'air des villes ;
 - ✓ Métaux lourds dans l'eau ;
 - ✓ Mesure du phénol dans l'eau (à la bande 200-300nm) ;
 - ✓ Matière organique, matières en suspension, nitrates contenus dans l'eau ;
- ❖ Lutte antidopage ;
- ❖ Agroalimentaire ;
- ❖ Mesure des couleurs ;
- ❖ Pharmacie:
 - ✓ Dosage du fer dans un médicament ;
 - ✓ Dosage des molécules actives dans une préparation pharmaceutique ;

-
- ❖ Parfums et cosmétiques : les crèmes solaires contiennent des filtres UV ou « écrans solaire».

Le spectre UV du 4-méthoxycinnamate de [2-éthyl-1-hexyl], Filtre typique UVB (Figure 14)

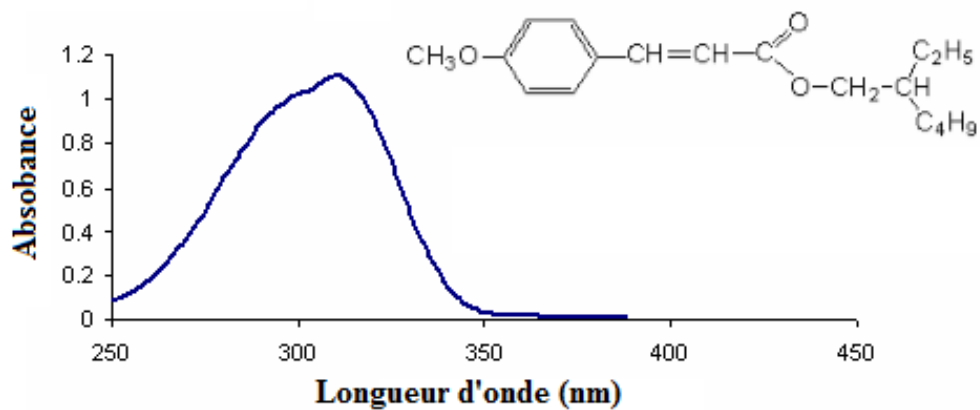
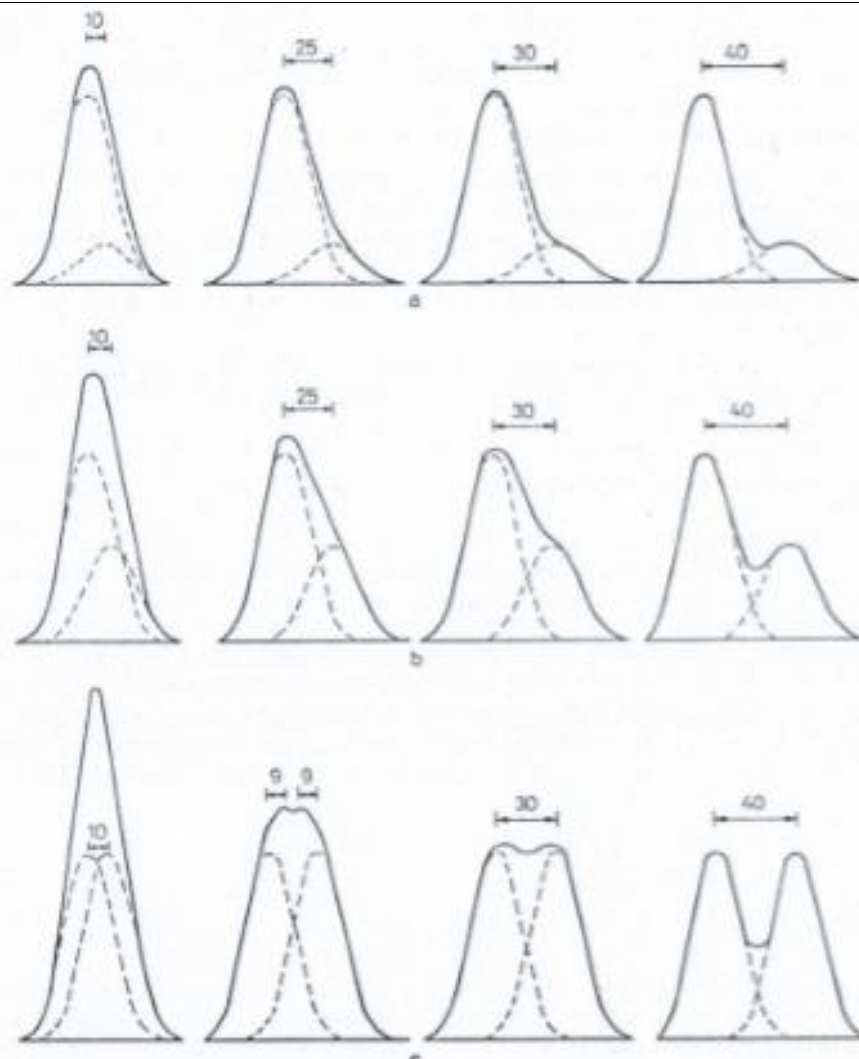


Fig.14 : Spectre UV du 4-méthoxycinnamate de [2-éthyl-1-hexyl],
($\epsilon = 30\,000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ à $\lambda_{\text{max}} = 310 \text{ nm}$).

Remarque :

- ✓ Si deux bandes ont des maximums à des longueurs d'ondes très voisines et intensités très différentes, la bande la plus intense masquera totalement la bande la plus faible. Inversement si les deux bandes ont des intensités voisines et des maximums à des longueurs d'ondes suffisamment différentes les 2 maximums seront visibles.



- ✓ En pratique, on obtient un spectre composé de bandes larges : chaque bande est caractérisée par la longueur d'onde pour laquelle l'absorbance est maximale. Si λ_{max} appartient au domaine du visible, le composé est coloré : sa couleur est la couleur complémentaire de la radiation qu'il absorbe (couleur diamétralement opposée sur le cercle chromatique). Attention, ce raisonnement n'est pas valable pour les espèces absorbant plusieurs couleurs.

EXERCICES CORRIGES

Exercice 1 :

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 molaire du composé est de 100 g/mol.
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 $I = 20,3$.

Solution :

- 1) On applique la loi de Beer Lambert, $\epsilon = 1578,94 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$.
- 2) $\epsilon = 3119,8 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Exercice 2: Quelle est la concentration de l'acide aminé tyrosine sachant qu'il a une absorbance de 0,70 obtenue à une longueur d'onde précise en utilisant une cuve de spectrophotomètre de 1 cm d'épaisseur. Le coefficient d'extinction molaire pour tyrosine est $1420 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Quelle sera l'absorbance d'une solution de 0,35 mM de tyrosine?

Solution :

$$A = \epsilon lc$$

$$0,70 = 1420 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot c \cdot 1 \text{ cm}$$

$$\text{Donc : } c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

- L'absorbance d'une concentration en Lys égale à 0,35 mM:

$$A = \epsilon lc$$

$$\text{Ainsi : } A = 1420 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times (0,35 \cdot 10^{-3} \text{ M}) \cdot 1 \text{ cm}$$

$$A = 0,50.$$

Exercice 3 :

On veut déterminer la concentration de deux sels A et B dans un échantillon inconnu en solution aqueuse. On enregistre un spectre dans le visible de chacun de ces deux composés pris séparément en solution aqueuse, ainsi que la solution échantillon à analyser. Le trajet optique des cuves utilisées est de 1 cm. Les valeurs des absorbances mesurées à 510 et 575 nm sur les trois spectres sont les suivantes :

	Absorbance à 510 nm	Absorbance à 575 nm
Composé A (C = 0,15M)	0,714	0,0097
Composé B (C = 0,06M)	0,298	0,757
Solution échantillon	0,4	0,577

1. Calculer les 4 coefficients d'absorption molaires $\epsilon_A(510)$, $\epsilon_A(575)$, $\epsilon_B(510)$, $\epsilon_B(575)$.
2. Calculer les concentrations molaires de A et de B dans la solution échantillon.

Solution :

1. On applique la loi de Beer Lambert :

Sel	ϵ ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$) à 510 nm	ϵ ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$) à 575 nm
A	4,76	0,064
B	4,96	12,61

2. On appliqué la d'additivité des absorbances :

$$C_A = 1,2 \cdot 10^{-1} \text{M.}$$

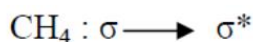
$$C_B = 2 \cdot 10^{-2} \text{M.}$$

Exercice 4 :

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

Solution :

Les transitions sont :



Exercice 5 :

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

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

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

Solution :

1. $\lambda = 280 \text{ nm} : n-\pi^*$

$\lambda = 190 \text{ nm} : \pi-\pi^*$

2. La transition la plus intense est $\pi-\pi^*$.

Exercice 6 :

1. A partir des valeurs de λ_{max} (en nm) de ces molécules, quelles sont les conclusions que l'on peut tirer concernant la relation entre λ_{max} et la structure de la molécule qui absorbe ?

Éthylène (170) ; Buta-1,3-diène (217) ; 2,3-Diméthylbuta-1,3-diène (226) ; Cyclohexa-1,3-diène (256) et Hexa-1,3,5-triène (274).

2. Expliquez les variations suivantes dans le λ_{max} (en nm) des composés suivants :

$\text{CH}_3\text{-X}$, quand $\text{X}=\text{Cl}$ ($\lambda_{\text{max}} = 173$), $\text{X}=\text{Br}$ ($\lambda_{\text{max}} = 204$) et $\text{X}=\text{I}$ ($\lambda_{\text{max}} = 258$).

Solution :

1. On peut conclure que λ augmente avec l'augmentation de la chaîne carbonée et avec l'augmentation de la conjugaison.

Un composé cyclique absorbe à λ supérieur à celui de son homologue aliphatique.

2. Il s'agit de la transition $n-\pi^*$. Plus l'électronégativité diminue, plus la transition est facile et λ augmente.

Exercice 7 :

1. Calculez le ϵ_{max} d'un composé dont l'absorption maximale (A) est de 1,2. La longueur de la cellule l 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.

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 $I = 20,3$.

Solution :

1. On applique la loi de Beer Lambert, $\epsilon = 1578,94 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2. $\epsilon = 3119,8 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Exercice 8 :

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

1. Calculer le coefficient d'absorption molaire du permanganate pour cette longueur d'onde.

2. Si on double la concentration, calculer l'absorbance et la transmittance de la nouvelle solution.

Solution :

1. $\varepsilon = 2351,7 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2. $A = 0,601$ et $T = 0,25$.

Exercice 9 :

On dispose d'une solution mère de sulfate de cuivre à $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. On en réalise diverses dilutions dont on mesure l'absorbance pour la longueur d'onde 655 nm qui correspond au maximum de la courbe $A = f(\lambda)$ pour une solution de sulfate de cuivre. La largeur de la cuve est de 1 cm .

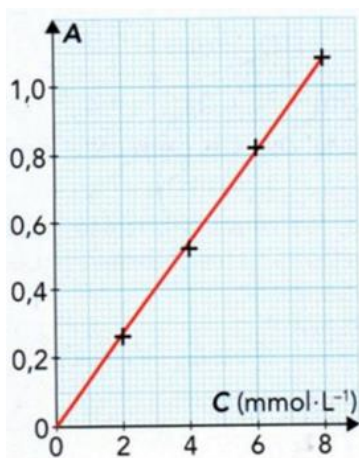
On obtient le tableau suivant :

1. Faire un schéma de principe d'un spectrophotomètre UV-visible.
2. Pourquoi a-t-on choisi de travailler à cette longueur d'onde ?
3. La loi de Beer-Lambert est-elle vérifiée ?
4. Déterminer le coefficient d'absorbance molaire dans ces conditions.
5. Quelle est la concentration d'une solution de sulfate de cuivre dont l'absorbance est $A = 0,200$.

Solution :

1. Voir cours.
2. On choisit la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption.
3. On trace la courbe $A = f(C)$, on obtient une droite qui passe par l'origine, donc la loi de Beer Lambert est vérifiée.
3. A partir de la courbe, on trouve $\varepsilon = 3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$.
4. A partir de la courbe, on trouve pour $A = 0,2$, $C = 0,067 \text{ M}$.

Exercice 10



Utiliser la loi de Beer-Lambert. On dispose d'une échelle de teinte en diiode dont les concentrations C sont connues. Un spectrophotomètre, réglé sur la longueur d'onde $\lambda = 450 \text{ nm}$, permet de mesurer l'absorbance A des solutions de l'échelle de teinte. On peut alors tracer le graphe $A = f(C)$.

1. Comment appelle-t-on le graphe $A = f(C)$?
2. La loi de Beer-Lambert est-elle vérifiée ?
3. Sans modifier les réglages du spectrophotomètre, on mesure l'absorbance $A_S = 0,64$ d'une solution S d'eau iodée. En déduire la concentration C_S en diiode de la solution S .

Solution :

1. Le graphe $A = f(C)$ est une courbe (droite) d'étalonnage.
2. La loi de Beer-Lambert est vérifiée, car le graphe $A = f(C)$ est une droite passant par l'origine.

Ainsi, ces deux grandeurs : absorbance A et concentration de l'espèce absorbante sont proportionnelles entre elles : $A = k \cdot C$.

3. En reportant la valeur de $A_S = 0,64$, on détermine graphiquement la valeur de l'abscisse correspondante : $C_S = 5,0 \text{ mmol.L}^{-1}$.

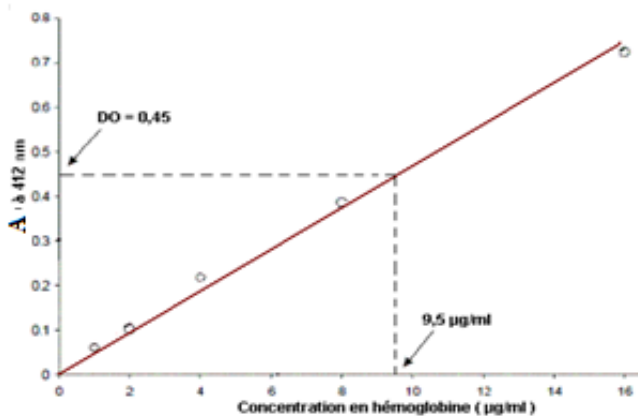
Exercice 11 :

Pour déterminer la concentration d'hémoglobine dans un échantillon de sang par spectrophotométrie, on prépare une courbe standard d'absorbance à 412 nm de plusieurs solutions d'hémoglobine de concentrations connues. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous. Quelle est la concentration (en $\mu\text{g/ml}$) en hémoglobine dans un échantillon d'hémoglobine présentant une Absorbance à 412 nm égale à 0,45?

Concentrations en hémoglobine standard ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbance à 412 nm
1	0,070
2	0,114
4	0,202
8	0,378
16	0,731

Solution :

En exploitant la gamme-étalon, on trace la courbe (droite passant par l'origine) standard liant l'absorbance à la concentration connue en hémoglobine. On obtient la droite suivante :



Comme la concentration inconnue a une absorbance de 0,45. La projection de cette valeur de A sur la droite a pour valeur de concentration en hémoglobine (axe des abscisses) 9,5 μg/ml.

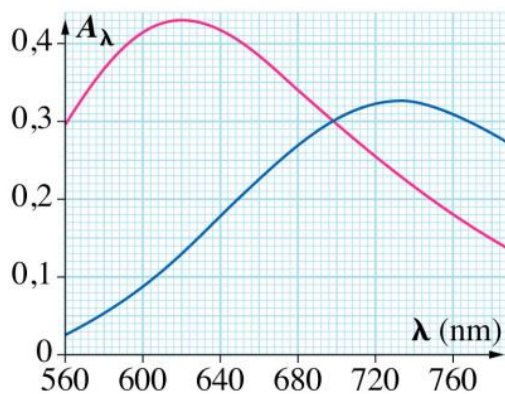
Exercice 12 :

On s'intéresse à la réaction des ions cuivrique Cu^{2+} en solution aqueuse basique (de pH contrôlé) avec une espèce anionique appelée EDTA et symbolisée par la formule Y^{4-} .

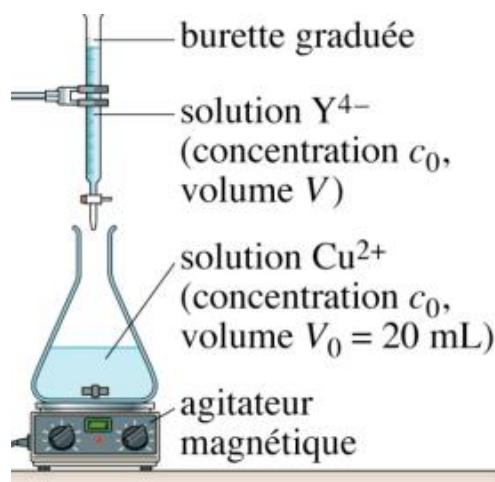
L'équation de la réaction est la suivante : $\text{Cu}^{2+} + \text{Y}^{4-} \rightarrow \text{CuY}^{2-}$.

On a représenté ci-dessous les spectres d'absorption d'une solution ($\text{Cu}^{2+}_{(\text{aq})}$; $\text{SO}_4^{2-}_{(\text{aq})}$) (courbe rose) et d'une solution ($\text{CuY}^{2-}_{(\text{aq})}$; $\text{SO}_4^{2-}_{(\text{aq})}$) (courbe bleue).

Les spectres ont été réalisés sur des solutions de concentration $c_0 = 5,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol/L}$, placées dans des cuves de largeur $l = 1,0 \text{ cm}$. Seules les espèces Cu^{2+} et CuY^{2-} sont colorées.



1. Déterminer la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption λ_{\max} . Quelle est la couleur correspondante ?
2. De quelle couleur apparaît la solution ?
3. Déterminer la valeur de l'absorbance maximale A_{\max} . En déduire le coefficient d'absorption molaire de Cu^{2+} , noté ϵ_{Cu} , à la longueur d'onde λ_{\max} .
4. Quelle est la valeur de l'absorbance de la solution de CuY^{2-} à la longueur d'onde λ_{\max} déterminée précédemment ?
5. En déduire la valeur du coefficient d'absorption molaire de CuY^{2-} , noté ϵ_Y , à la longueur d'onde λ_{\max} .
6. On envisage d'ajouter progressivement une solution d'ions Y^{4-} à une solution d'ions Cu^{2+} . Le dispositif expérimental est :



Dans l'erenmeyer, comment évoluent les concentrations en ions Cu^{2+} et en ions CuY^{2-} , respectivement notées c_{Cu} et c_Y , lorsque l'on ajoute les ions Y^{4-} ?

7. Montrer que le volume V de la solution de Y^{4-} versé est égal à V_0 , et que la concentration c_Y est égale à $\frac{c_0}{2}$.

8. Que vaut alors la concentration C_{Cu} ?

9. On prélève un échantillon de la solution de l'erenmeyer et on la verse dans la cuve d'un spectrophotomètre de longueur λ pour en mesurer l'absorbance à la longueur d'onde λ_{\max} .

Donner l'expression de l'absorbance en fonction de c_{Cu} et c_Y .

Calculer cette absorbance pour un volume V de solution de Y^{4-} versés $V=0$, puis pour $V=V_0$.

Solution :

1. On repère le maximum d'absorption sur le spectre de Cu^{2+} (courbe rose). L'abscisse de ce point est $\lambda_{\text{max}} = 620 \text{ nm}$. La couleur correspondant à cette longueur d'onde est le rouge orangé.
2. La couleur de la solution est la couleur complémentaire de celle qui est absorbée, c'est-à-dire celle qui correspond à λ_{m} . D'après le cercle chromatique, ils'agit du bleu-vert.
3. Sur le spectre, on lit l'ordonnée du maximum d'absorption: $A_{\text{max}} = 0,43$.

D'après la loi de Beer-Lambert :

$$A_{\text{max}} = \varepsilon_{\text{Cu}} \ell c_0, \text{ d'où : } \varepsilon_{\text{Cu}} = \frac{A_{\text{max}}}{\ell c_0}.$$

$$\varepsilon_{\text{Cu}} = \frac{A_{\text{max}}}{\ell c_0} = \frac{0,43}{1 \times 0,05} = 8,6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$$

4. Sur le spectre de CuY^{2-} , on lit, pour la longueur d'onde $\lambda_{\text{max}} = 620 \text{ nm}$, une absorbance $A_{620} = 0,13$.

5. On en déduit, comme précédemment :

$$\varepsilon_{\text{Y}} = \frac{A_{620}}{\ell c_0}.$$

$$\varepsilon_{\text{Y}} = \frac{A_{620}}{\ell c_0} = \frac{0,13}{1 \times 0,05} = 2,6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$$

6. Lorsqu'on verse la solution de Y^{4-} dans la solution de Cu^{2+} , la réaction étudiée se produit. Elle consomme des ions Cu^{2+} (réactif) dont la concentration c_{Cu} diminue, et forme des ions CuY^{2-} (produit) dont la concentration c_{Y} augmente.

7. Lorsqu'on a versé un volume V_0 de solution de Y^{4-} , on a ajouté une quantité de matière $n_Y = c_0 V_0$ d'ions Y^{4-} égale à la quantité de matière initiale d'ions Cu^{2+} (même concentration, même volume). La réaction consomme ces deux réactifs entièrement et produit une quantité de matière d'ion CuY^{2-} égale à $c_0 V_0$. Le volume de la solution dans l'erlenmeyer est alors de $2 V_0$ et la concentration en ions CuY^{2-} est donc :

$$c_Y = \frac{c_0 V_0}{2V_0} = \frac{c_0}{2}.$$

8. Tous les ions Cu^{2+} ont été consommés par la réaction, donc $c_{Cu} \approx 0$.

9. La solution contient deux espèces colorées. La loi de Beer-Lambert pour les mélanges s'écrit :

$$A_{\lambda_m} = \varepsilon_{Cu} l c_{Cu} + \varepsilon_Y l c_Y.$$

Pour $V=0$, il n'y a que des ions Cu^{2+} en solution, à la concentration c_0 . La relation précédente devient :

$$A_{\lambda_m} = \varepsilon_{Cu} l c_0.$$

$$A_{\lambda_m} = 8,6 \times 1 \times 0,05 = 0,43$$

Pour $V = V_0$, d'après la question 7., il n'y a plus d'ions Cu^{2+}

en solution et la concentration en ions CuY^{4-} est $c_Y = \frac{c_0}{2}$.

L'absorbance s'écrit alors :

$$A_{\lambda_m} = \varepsilon_Y l \frac{c_0}{2}$$

$$A_{\lambda_m} = 2,6 \times 1 \times \frac{0,05}{2} = 0,065$$

Exercice 13 :

Une eau polluée contient du chrome ($M = 52 \text{ g.mol}^{-1}$) à la concentration massique d'environ 0,1 ppm. On choisit, pour son dosage, le complexe CrVI avec le diphénylcarbazide ($\lambda_{\text{max}} = 540 \text{ nm}$, $\epsilon_{\text{max}} = 41\,700 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

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

Solution :

La concentration d'une solution à 0,1 ppm est de $0,1 \cdot 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$ soit $1,92 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

À partir de $A = \epsilon.l.c$, on trouve $l = 4,98 \text{ cm}$. Une cuve de 5 cm d'épaisseur est donc bien adaptée

Exercice 14 :

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

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

Solution :

1. Si $T = 0,5$, $A = \log 1/0,5 = 0,3$; $\epsilon = 2\,344 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.
2. Si on double la concentration, $A = 0,6$. Donc $\log 1/T = 0,6$ soit $T = 0,25$.

Exercice 15 :

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

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

Données : $M = 500 \text{ g.mol}^{-1}$; $\epsilon_{\text{max}} = 15\,000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ pour $\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$.

Solution :

Si 90 % du rayonnement est absorbé, $T = 0,1$. Donc $A = 1$ et $c = 2,22 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

Pour $M = 500 \text{ g.mol}^{-1}$, on trouve $c = 1,11 \text{ g.L}^{-1}$.

Exercice 16 :

On veut déterminer la concentration (mol/L) en KMnO_4 et $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ dans une solution aqueuse inconnue.

On prépare deux solutions de référence, l'une KMnO_4 ($1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$) et l'autre en $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ($1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$).

10^{-4} mol/L). Les spectres de la solution inconnue et des deux solutions de référence sont enregistrés entre 250 et 400 nm. Le trajet optique des cuves utilisées est 1 cm.

À partir des résultats, au nombre de 5, rassemblés dans le tableau ci-dessous :

1. Trouver l'équation de la droite de régression

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

2. Calculer les concentrations molaires (mol.L^{-1}) en KMnO_4 et $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ dans la solution échantillon.

λ (nm)	Abs. MnO_4^- (réf.)	Abs. $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ (réf.)	Echantillon
266	0,042	0,410	0,766
288	0,082	0,283	0,571
320	0,168	0,158	0,422
350	0,125	0,318	0,672
360	0,056	0,181	0,366

Solution :

- $y = 1,784x + 0,815$ en posant $y = A_{\text{échantillon}}/A_{\text{permanganate}}$ et $x = A_{\text{bichromate}}/A_{\text{permanganate}}$.
- $c_{\text{permanganate}} = 8,15 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ et $c_{\text{bichromate}} = 1,78 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

Exercice 17 :

Un indicateur coloré acido-basique se comporte comme un acide faible HA de constante d'acidité K_a .

On prépare diverses solutions de même concentration C_0 de cet indicateur dont on fait varier le pH sans dilution. On mesure, dans les mêmes conditions ($l = 1$ cm et $\lambda = 595$ nm)

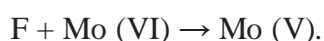
l'absorbance des différentes solutions préparées. On admettra que seule la forme basique absorbe à 595 nm et que la relation de Beer Lambert est utilisable pour les quatre mesures.

On obtient les valeurs suivantes :

pH	8,31	8,71	9,09	12
A	0,326	0,642	1,000	1,640

Calculer la valeur de la constante d'acidité de l'indicateur.

Le fructose F réduit le molybdène VI en molybdène V (bleu de molybdène) suivant le schéma :



Afin de déterminer l'ordre partiel « a » de la réaction par rapport au fructose, on ajoute à une solution de fructose un grand excès de molybdate d'ammonium. On suit la cinétique de cette réaction en mesurant, à différents instants, l'absorbance du mélange à 720 nm, longueur d'onde

où seul Mo (V) absorbe.

On obtient les résultats suivants :

t (min)	0	10	20	30	50	Infini
A	0	0,175	0,302	0,384	0,494	0,600

Vérifier que la réaction est d'ordre 1 par rapport au fructose et calculer la constante de vitesse apparente k .

Solution :

Le molybdate étant en grand excès, on peut considérer sa concentration constante, la loi de vitesse

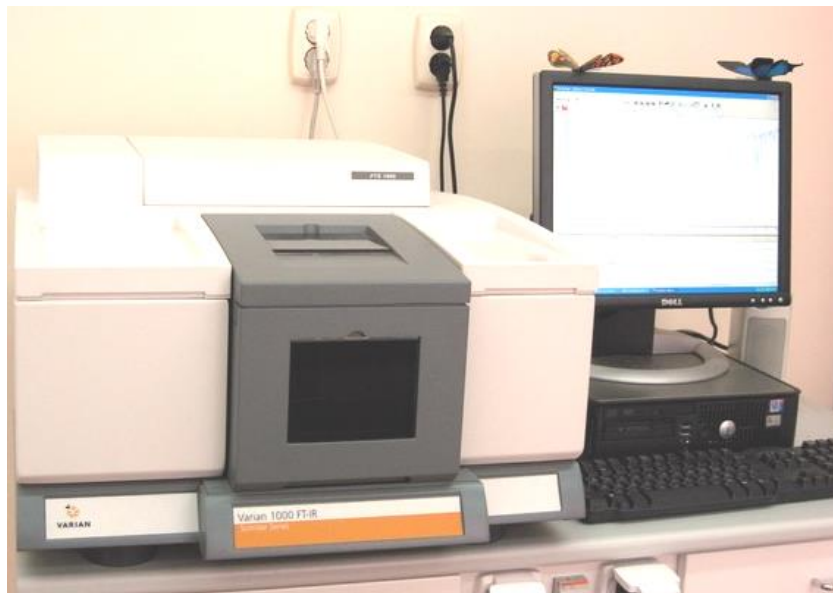
devient : $-d[F]$

$dt = k[F]$ dans l'hypothèse d'une cinétique du premier ordre par rapport au fructose soit $\ln [F]$

$[F]_t = -k \cdot t + C$ qui ramené en absorbance donne : $\ln A_t = -k \cdot t + \ln A_\infty$

Les valeurs de k sont pratiquement égales, ce qui confirme l'ordre 1 et la valeur moyenne de k est $0,0348 \text{ min}^{-1}$.

CHAPITRE III : SPECTROSCOPIE DE VIBRATION DANS L'INFRAROUGE



I. INTRODUCTION

Le domaine de l'infrarouge utilisé sur les spectres habituels se situe entre 400 et 4000 cm^{-1} , ce qui correspond à des énergies situées autour de $30\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Une telle énergie reste insuffisante pour provoquer des transitions électroniques comme en UV-Visible. Cette énergie provoque des mouvements des atomes d'une molécule qui peuvent être classés en trois catégories : les translations ; les rotations et les vibrations.

La spectroscopie infrarouge (IR) étudie les vibrations des molécules lorsqu'elles sont irradiées par une onde électromagnétique comprise dans le domaine de l'infrarouge : environ $0,8$ et $1000\text{ }\mu\text{m}$. Cette zone spectrale est divisée en :

- ✓ Proche IR $0,8$ - $2,5\text{ }\mu\text{m}$ 13300 - 4000 cm^{-1} ;
- ✓ IR moyen $2,5$ - $25\text{ }\mu\text{m}$ 4000 - 400 cm^{-1} ;
- ✓ IR lointain 25 - $1000\text{ }\mu\text{m}$ 400 - 10 cm^{-1} ;

La gamme de nombres d'onde généralement utilisée est 4000 cm^{-1} à 400 cm^{-1} (soit des longueurs d'onde de $2,5\text{ }\mu\text{m}$ à $25\text{ }\mu\text{m}$).

La spectroscopie infrarouge est l'un des outils spectroscopiques les plus utilisés pour la caractérisation des molécules.

II. PRINCIPE DE LA SPECTROSCOPIE IR

La spectroscopie IR est basée sur l'interaction de la lumière IR avec le nuage électronique des liaisons chimiques. Généralement dans la majorité des spectroscopies optiques comme la spectroscopie de fluorescence, l'absorption d'énergie permet à un électron d'une liaison chimique de passer d'un état fondamental à un état excité. Dans le cas de la spectroscopie d'absorption IR, le rayonnement émis par la source polychromatique n'est généralement pas assez énergétique pour provoquer des transitions électroniques, mais il induit des transitions entre les niveaux d'énergie vibrationnelle.

III. VIBRATIONS MOLECULAIRES

III.1. Molécule diatomique

Les molécules diatomiques (H-H, H-Cl, C=O,...), ne vibrent que d'une seule façon, ils se déplacent, comme s'ils étaient attachés par un ressort, en se rapprochant et s'éloignant l'un de l'autre : c'est la vibration de valence.

On peut donc représenter une molécule diatomique comme étant constituée de deux masses (m_A et m_B) reliées par un ressort de raideur k (Fig.1).

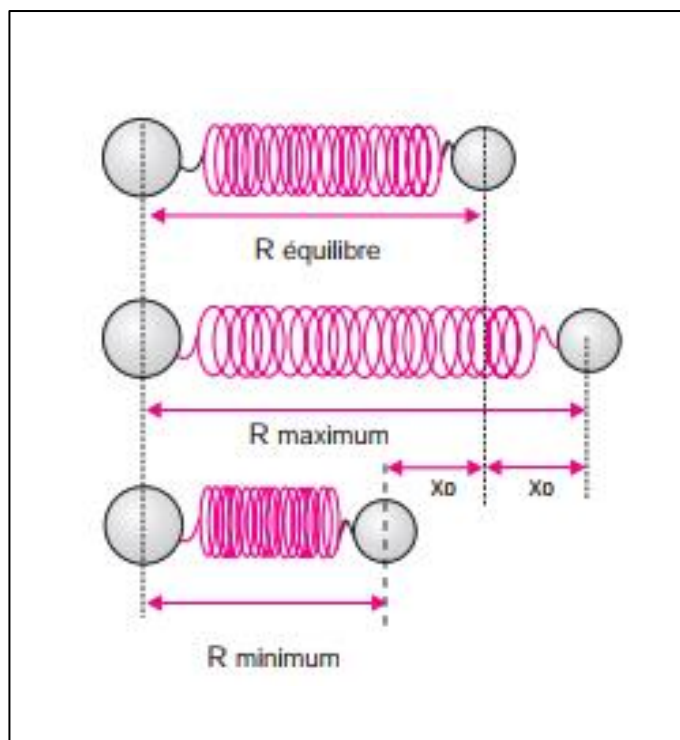


Fig.1 : Une molécule diatomique représentée sous la forme d'un oscillateur harmonique.

Dans l'approximation de l'oscillateur harmonique, la fréquence fondamentale de vibration ν est donnée par la relation (loi de Hooke) :

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} = \frac{m_A \cdot m_B}{m_A + m_B}$$

ν : fréquence de la vibration

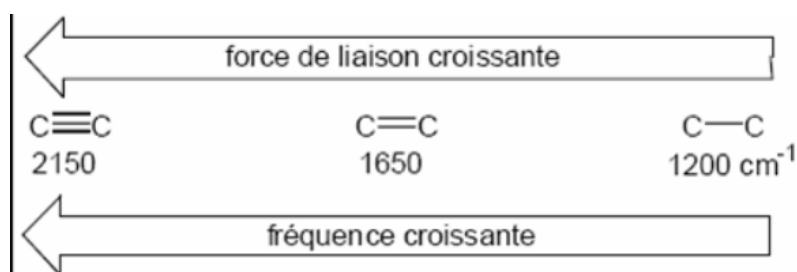
μ : masse réduite

k : constante de force de la liaison

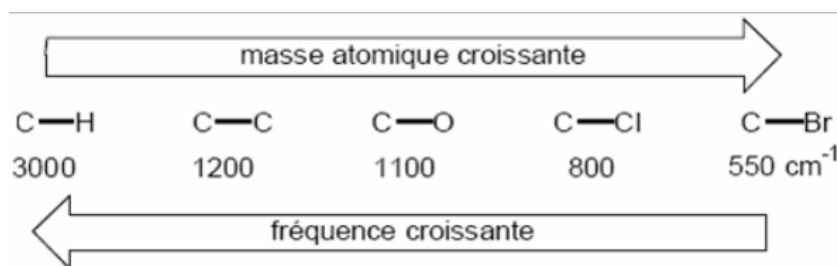
m_A et m_B : masses des atomes A et B respectivement Cette fréquence dépend de k et de μ .

La fréquence de vibration dépend de deux paramètres :

- ❖ La fréquence de vibration est proportionnelle à la constante de force k .

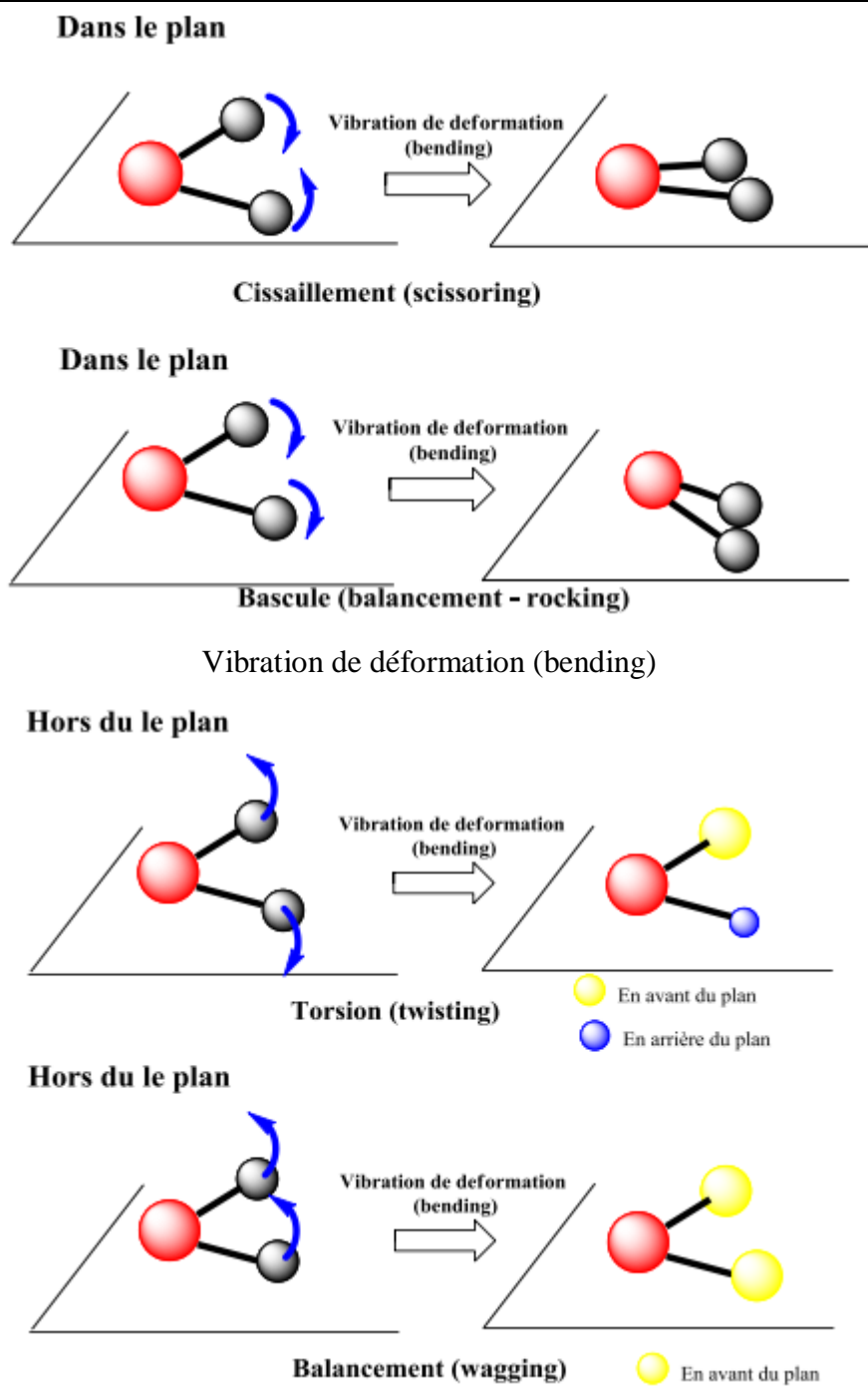


- ❖ La fréquence de vibration est inversement proportionnelle à la masse réduite μ .



III.2. Types de vibration

Les mouvements moléculaires les plus connus sont les vibrations d'élongation (symétrique et asymétrique) et les vibrations de déformation angulaires (Fig. 2). En revanche, dans la partie du spectre en dessous de 1 500 cm⁻¹, les bandes d'absorption sont nombreuses et diffèrent avec chaque composé. Ce sont les vibrations de déformation des liaisons et de squelette qu'il est rare de pouvoir toutes interpréter.



Vibration de déformation (bending)

Fig.2 :Vibrations moléculaires du CH₂.

Vibrations caractéristiques d'élongation et de déformation, dans le plan et hors du plan.

Dans l'infrarouge, la position et l'intensité des bandes sont modifiées par les associations entre molécules, la polarité des solvants, etc.

IV. SPECTRES IR ET ABSORPTIONS CARACTERISTIQUES DES LIAISONS

Un spectre IR est constitué de deux grandes régions :

- ❖ La région 4000-1300 cm^{-1} : appelée région des groupes fonctionnels, les bandes d'élongations caractéristiques des groupes fonctionnels se situent dans ce domaine : O-H (3500 cm^{-1}), C=O(1700 cm^{-1}).....
- ❖ La région 900-650 cm^{-1} : cette région caractérise le squelette de la molécule, les composés aromatiques montrent des bandes intenses dans cette région.

La région intermédiaire 1300-900 cm^{-1} est appelée région de l'empreinte digitale : l'absorption dans cette zone est très complexe avec des bandes issues d'interactions vibratoires. Cette zone est unique pour chaque espèce moléculaire.

IV.1. Les alcanes

Les spectres IR des alcanes présentent les bandes des vibrations d'élongation ν et de déformations δ des liaisons C-H et C-C.

δ (C-C) apparaissent dans le domaine $\bar{\nu} < 500 \text{ cm}^{-1}$, elles ne sont pas toujours observées.

δ (C-H) apparaissent dans le domaine 1200-800 cm^{-1} . Etant faibles, ces bandes n'aident pas à l'identification.

δ (C-H) apparaissent dans le domaine 1475-1340 cm^{-1} elles sont de forte intensité.

$\bar{\nu}$ (C-H) apparaissent dans le domaine 3000 -2840 cm^{-1} elles sont de forte intensité.

	CH ₃	CH ₂
ν_{as}	2962 cm^{-1}	2926 cm^{-1}
ν_{s}	2872 cm^{-1}	2853 cm^{-1}
δ_{as}	1450 cm^{-1}	1465 cm^{-1}
δ_{s}	1375 cm^{-1}	

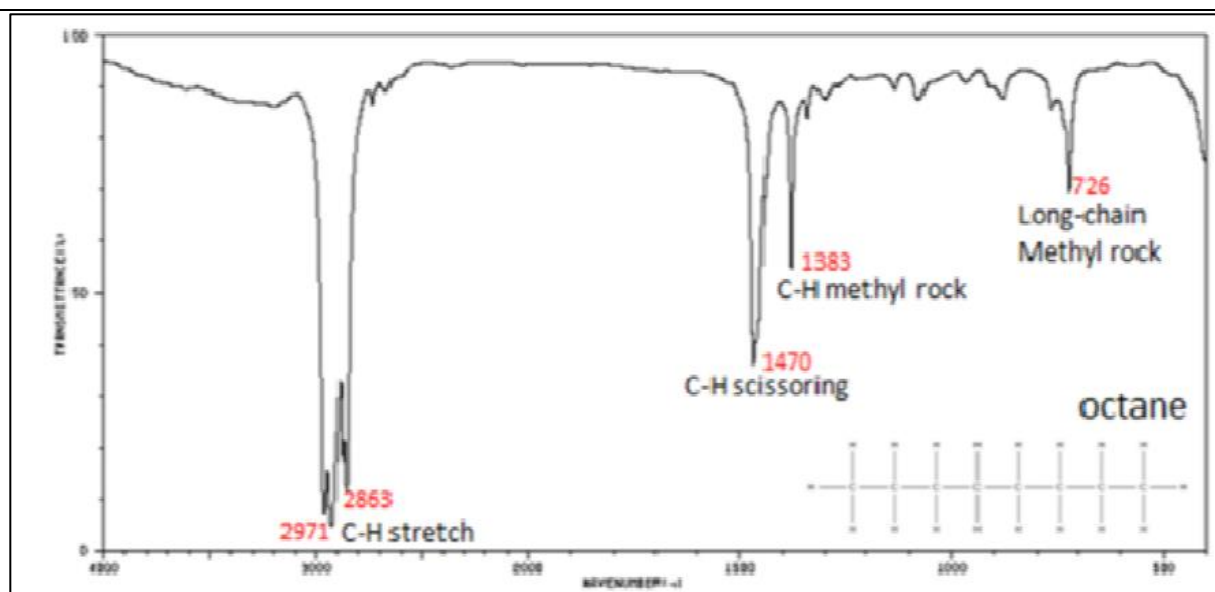


Fig. 3 : Spectre IR de l'octane.

IV.2 Alcanes cycliques

La bande de vibration d'élongation de la liaison C-H, ν (C-H) apparaît dans la zone : 3100- 2990 cm^{-1} . L'augmentation de la tension dans le cycle augmente la fréquence de vibration.

S'il n'y a pas de tension, la bande de vibration d'élongation ν (C-H) apparaît à la même fréquence pour un cycle et un aliphatique.

Dans le cas de δ (C-H), la cyclisation diminue la fréquence de vibration : Exemple :

Cyclohexane hexane

δ (C-H) 1452 cm^{-1} 1468 cm^{-1}

IV.3. Les alcènes

Trois bandes de vibration sont possibles ν (C=C), ν (C-H) et δ (C-H). Les fréquences de vibration dépendent du mode de substitution de l'alcène, et de la conformation (cis et trans).

ν (C=C) : 1680-1610 cm^{-1}

ν (C-H) : 3095-3010 cm^{-1}

δ (C-H) : 1000-650 cm^{-1}

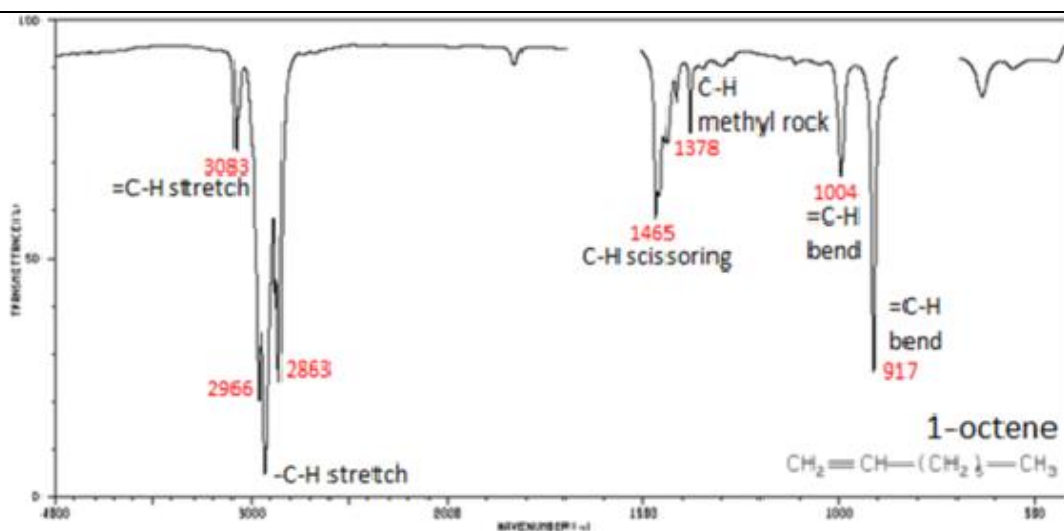


Figure 4 : Spectre IR du 1-octène.

IV.4. Les alcynes

Les bandes caractéristiques des alcynes sont :

ν (HC≡CH) : 2100-2260 cm^{-1}

ν (C-H) : 3330-3267 cm^{-1}

δ (C-H) : 700-610 cm^{-1}

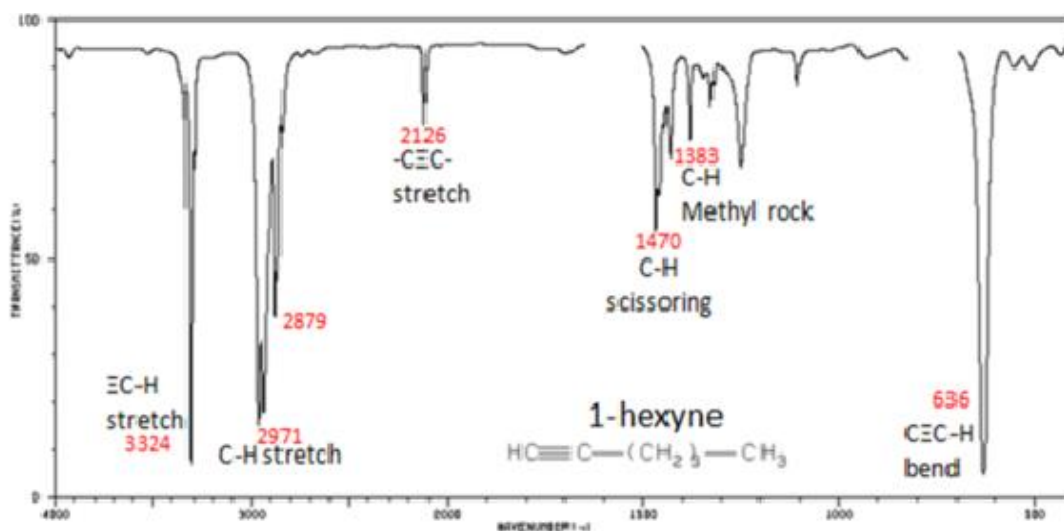


Fig. 5 : Spectre IR du 1-hexyne.

IV.5. Les aromatiques

Les aromatiques présentent des bandes de vibration avec lesquelles ils peuvent être identifiés facilement :

ν (C=C) : 1600-1500 cm^{-1}

ν (C-H) : 3100-3010 cm^{-1}

δ (C-H) : 900-690 cm^{-1}

La position de ces bandes dépend de la substitution du cycle, donc du nombre de H voisins.

Groupement	Bande δ (C-H)	Degré de substitution
5H voisins	710-685 cm^{-1}	monosubstitution
4H voisins	760-740 cm^{-1}	1,2di substitution
3H voisins	800-770 cm^{-1}	1,2,3trisubstitution 1,3di substitution
2H voisins	840-800 cm^{-1}	tétra substitution 1,3,4trisub stitution 1,4di substitution
1H	900-800 cm^{-1}	

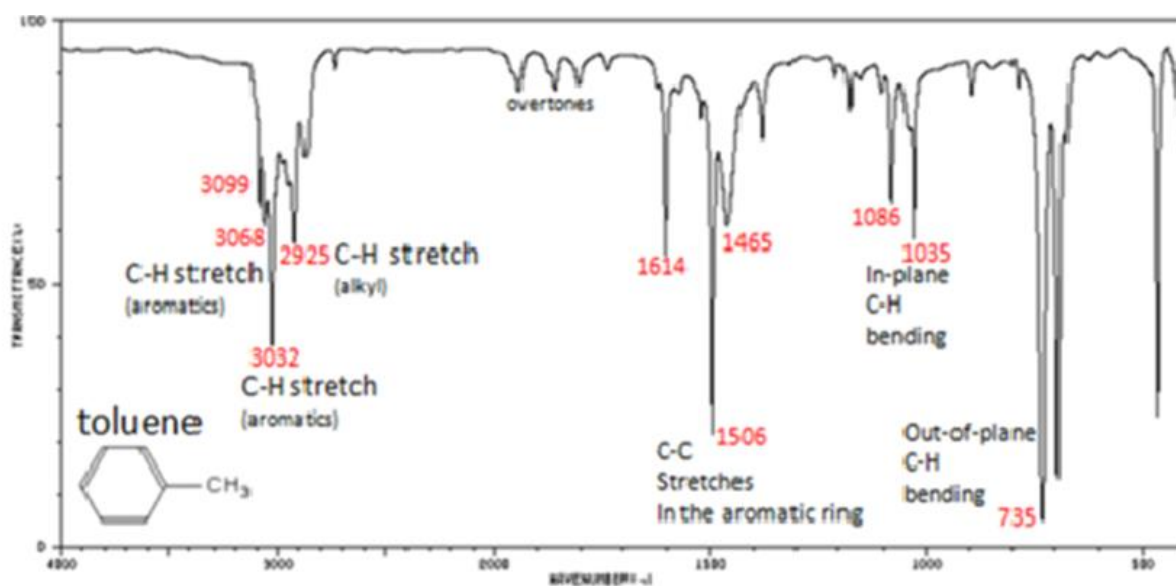


Fig.6 : Spectre IR du toluène.

On peut récapituler pour la liaison C-H par le tableau suivant :

Liaison	Type de composé	Mode de vibration	$\bar{\nu}$	Intensité
C-H	Alcanes	ν	2970-2850 cm^{-1}	Forte
		δ	1470-1340 cm^{-1}	Forte
C-H	Alcènes	ν	3095-3010 cm^{-1}	Moyenne
		δ	995-675 cm^{-1}	Forte
C-H	Alcynes	ν	3330-3267 cm^{-1}	Forte
		δ	700-610 cm^{-1}	Forte
C-H	aromatiques	ν	3100-3010 cm^{-1}	Moyenne
		δ	900-690 cm^{-1}	Forte

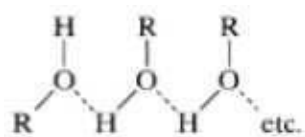
IV.6. Les alcools et phénols

Les bandes caractéristiques proviennent des élongations ν (O-H) et ν (C-O) et de la déformation δ (O-H).

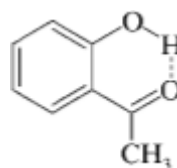
Vibration d'élongation ν (O-H) : ces bandes de vibration sont très larges et caractéristiques de la fonction alcool.

Les OH libres absorbent intensément entre 3700-3584 cm^{-1} .

Les OH sont souvent impliqués dans les liaisons à pont hydrogène, ce qui affecte la fréquence de vibration de ν (O-H).



Liaison H intermoléculaire



Liaison H intramoléculaire

Vibration d'élongation ν (C-O): 1260-1000 cm^{-1} .

Vibration de déformation δ (O-H): dans le plan : 1420-1330 cm^{-1} et hors du plan : 769-650 cm^{-1} .

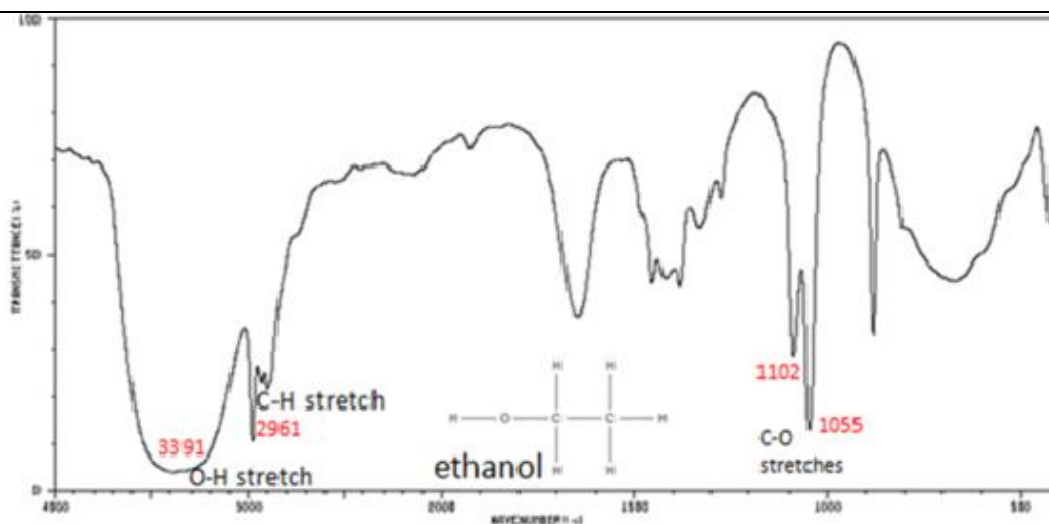


Fig.7 : Spectre IR de l'éthanol.

IV.7. Aldéhydes et cétones

La fonction carbonyle est l'une des fonctions qu'on caractérise très facilement par infrarouge, par la vibration d'élongation $C=O$ qui présente une bande très intense et fine entre $1870-1540\text{cm}^{-1}$.

Ils se caractérisent également par la vibration d'élongation et de déformation de $C-CO-C$ dans le domaine $1300-1100\text{cm}^{-1}$.

Dans le cas des aldéhydes, on a aussi la vibration d'élongation $\nu(C-H)$: $2830-2695\text{cm}^{-1}$.

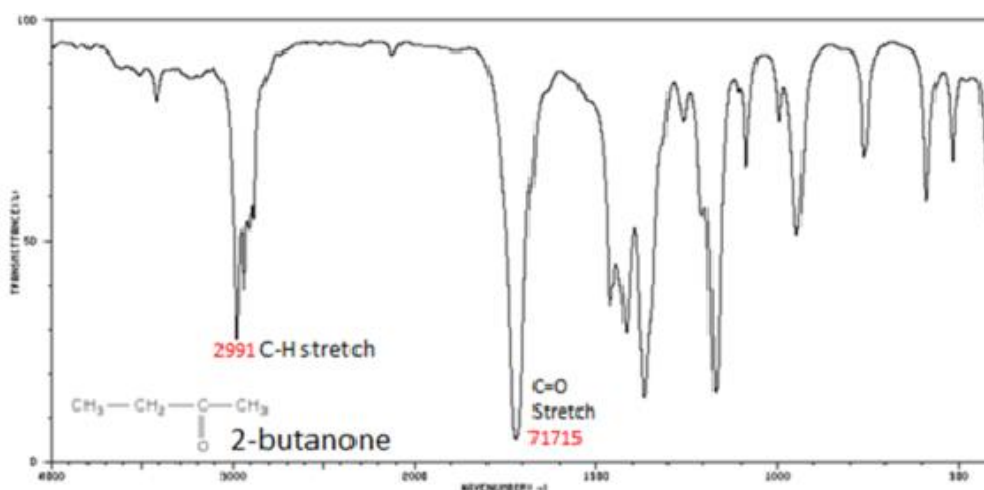


Fig.8 : Spectre IR de la butanone.

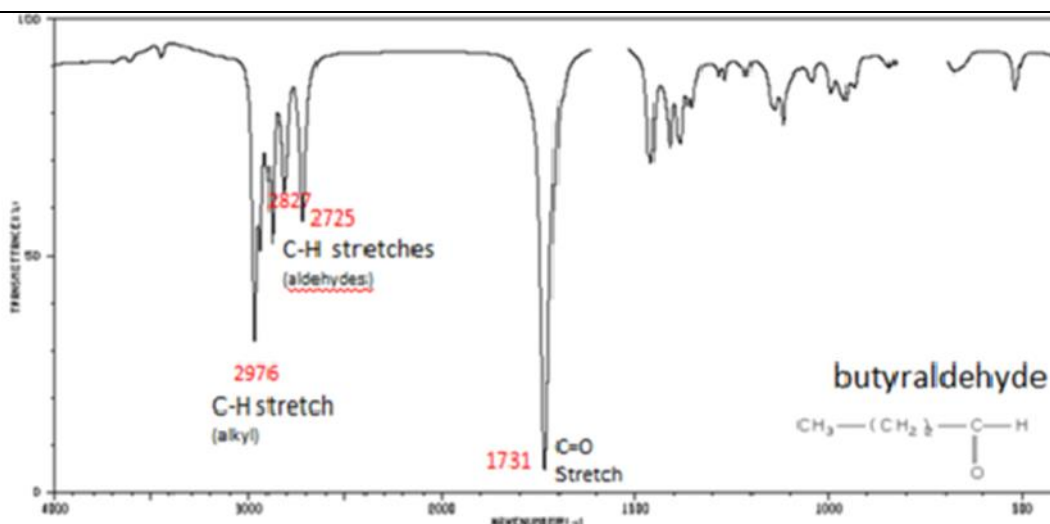
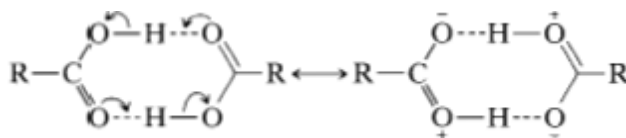


Fig.9 : Spectre IR du butylaldehyde.

IV.8 Acides carboxyliques COOH

En solution ou à l'état solide, les acides carboxyliques existent sous forme de dimère à cause des fortes liaisons hydrogène.



La bande de vibration d'élongation de la liaison O-H libre apparaît uniquement pour les solutions très diluées vers 3520 cm^{-1} .

Dans le cas des dimères, cette bande apparaît dans le domaine $3300\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$ à cause des fortes liaisons hydrogène.

La bande de vibration ν (C=O) apparaît dans le domaine $1760\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$, elle est plus intense que celles des aldéhydes et cétones, sa position dépend de la présence de liaison H.

Deux autres bandes sont caractéristiques des acides carboxyliques, celle de la vibration d'élongation ν (C-O) qui apparaît dans le domaine $1320\text{-}1210\text{ cm}^{-1}$, et celle de la déformation δ (O-H) dans la zone $1440\text{-}1395\text{ cm}^{-1}$.

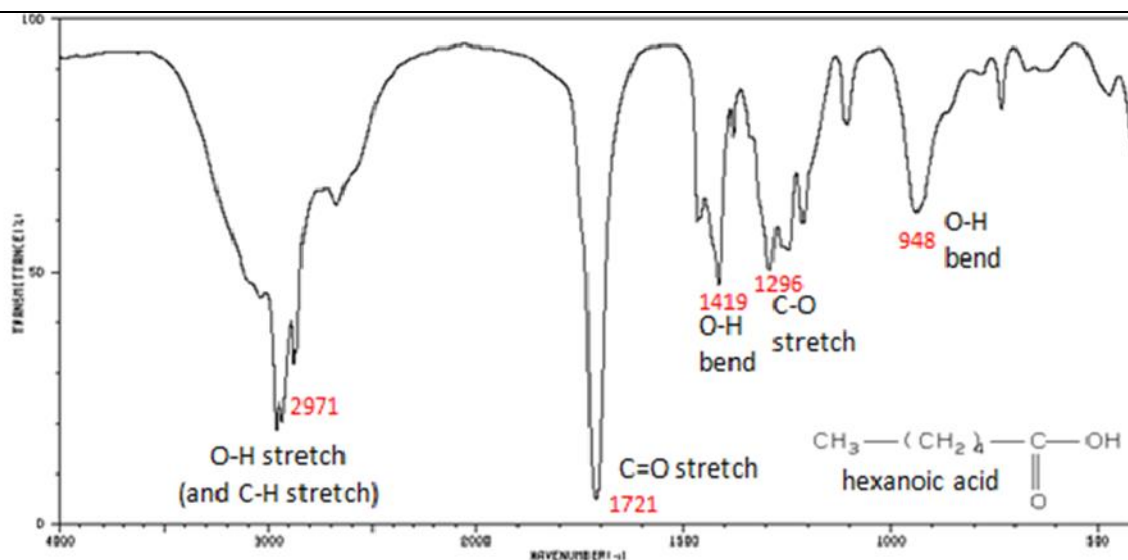


Fig.10 : Spectre IR de l'acide hexanoïque.

IV.9. Amines

Les amines primaires -NH_2 présentent deux bandes de vibration ν (N-H), l'une dans le domaine $3400\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$ et l'autre dans le domaine $3330\text{-}3250\text{ cm}^{-1}$.

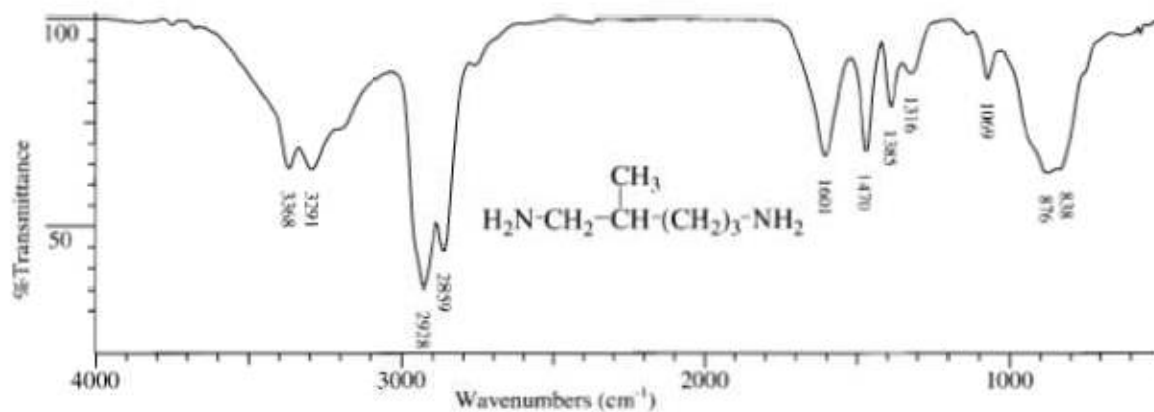


Fig.11 : Spectre IR du 2-phenylpropanenitrile.

IV.10. Les nitriles

Les nitriles présentent une bande caractéristique de la liaison $\text{C}\equiv\text{N}$ dans le domaine $2280\text{-}2210\text{ cm}^{-1}$.

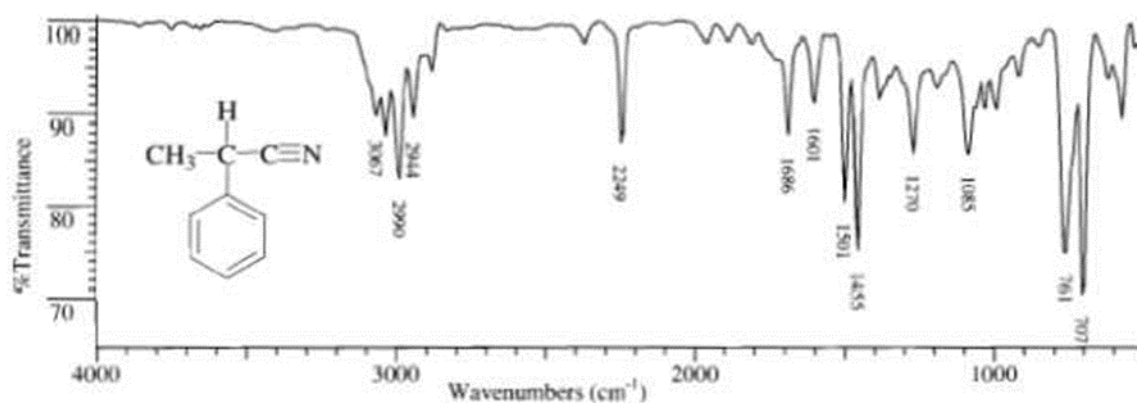


Fig.12 Spectre IR du 2-phenylpropanenitrile.

IV. APPAREILLAGE

Un mélange homogène de KBr (KBr n'absorbe pas dans l'infrarouge) contenant environ 1% de l'échantillon à analyser est broyé, ensuite placé dans un moule et soumis à une très forte pression. Il est ensuite extrait du moule sous forme d'une pastille très fine.

L'analyse s'effectue à l'aide d'un spectromètre à transformée de Fourier qui envoie sur l'échantillon un rayonnement infrarouge et qui mesure les longueurs d'onde absorbées et les intensités de l'absorption.

Le faisceau infrarouge provenant de la source est dirigé vers l'interféromètre de Michelson qui va moduler chaque longueur d'onde du faisceau à une fréquence différente. Dans l'interféromètre le faisceau lumineux arrive sur la séparatrice. La moitié du faisceau est alors dirigée sur le miroir fixe, le reste passe à travers la séparatrice et est dirigé sur le miroir mobile. Quand les deux faisceaux se recombinaient, des interférences destructives ou constructives apparaissent en fonction de la position du miroir mobile. Le faisceau modulé est alors réfléchi des deux miroirs vers l'échantillon, où des absorptions interviennent. Le faisceau arrive ensuite sur le détecteur pour être transformé en signal électrique.

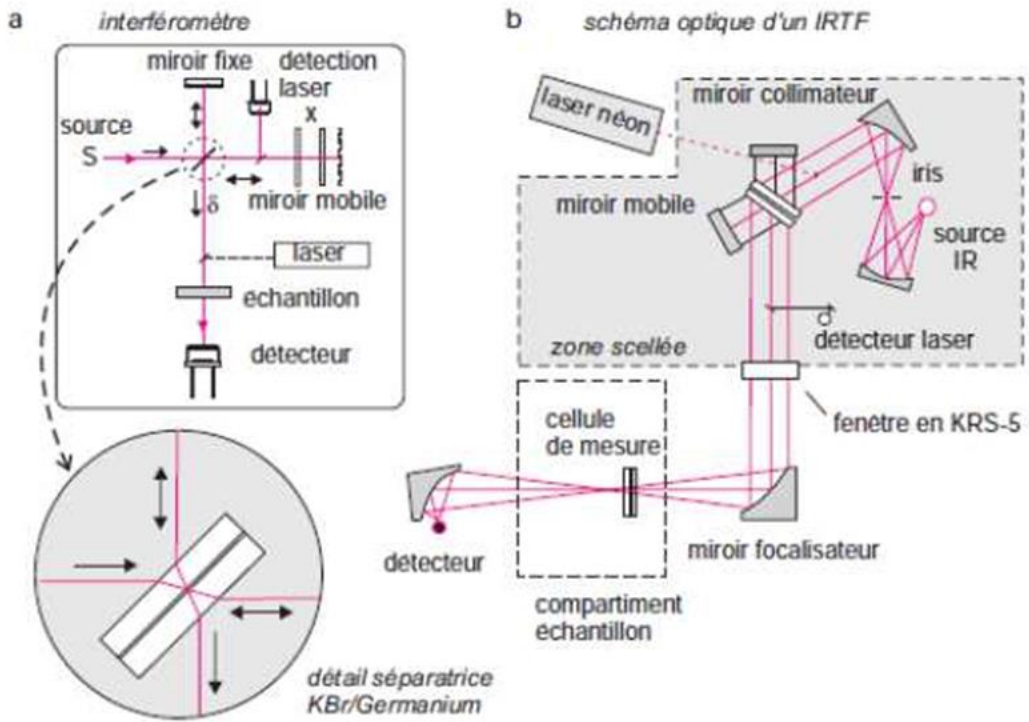


Figure.13: Montage optique d'un spectromètre à transformée de Fourier.

EXERCICES CORRIGES

Exercice 1 :

Le chlorure d'hydrogène gazeux présente un pic à 2890 cm^{-1} dû à la vibration d'élongation de la liaison H-Cl.

1. Calculer la constante de rappel de la liaison H-Cl.
2. Calculer le nombre d'onde du pic d'absorption de la liaison D-Cl en admettant que la constante de rappel est égale à celle de la liaison H-Cl. Conclure.

^2D : deutérium (isotope de l'hydrogène).

Solution :

1. On applique la loi de Hooke :

$$k = 478,8 \text{ N.m}^{-1}.$$

2. $\bar{\nu} = 2075,2 \text{ cm}^{-1}$.

Exercice 2 :

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

- a. 3372 (l,F), 3045 (f), 1595 (m), 1224 (F)
- b. 2962 (F), rien entre 2800-1600 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 toutes les bandes.

Solution :

En utilisant les tables, on peut facilement identifier les composés en se basant surtout sur les groupes fonctionnels, on doit trouver :

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

Spectre b : dodécane.

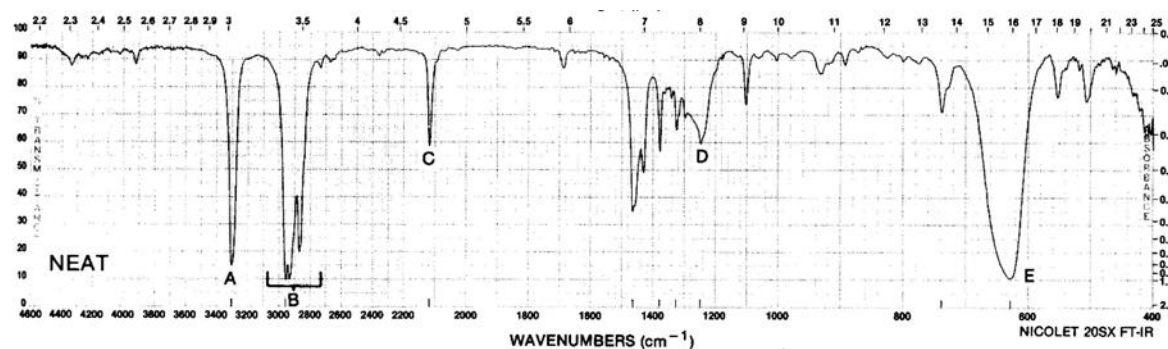
Spectre c : octylamine ($\bar{\nu}$ (N-H) = 3371cm^{-1} , $\bar{\nu}$ (C-N) = 1378cm^{-1}).

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

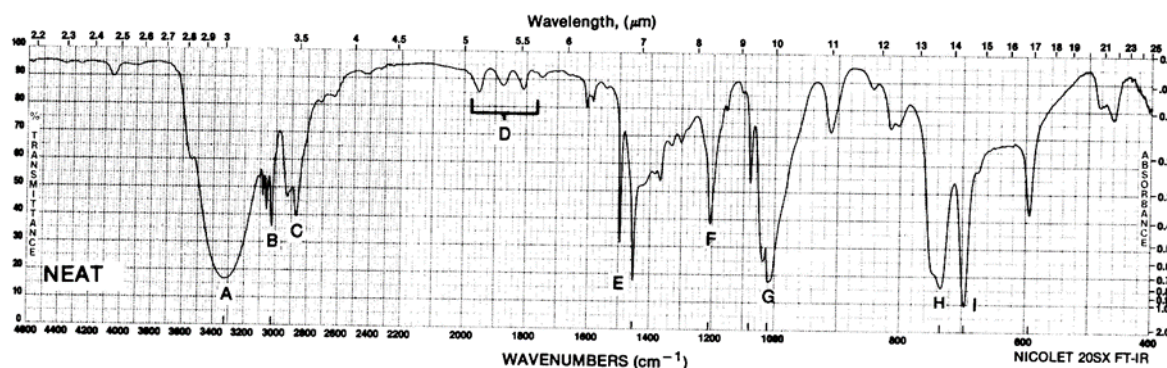
Exercice 3 :

Soient les spectres infrarouges 1-3 représentés ci-dessous. Ils correspondent chacun à un composé figurant dans la liste suivante : aminobenzène, pentan-2-one, phénylméthanol, méthylbenzène, hex-1-yne, phénol.

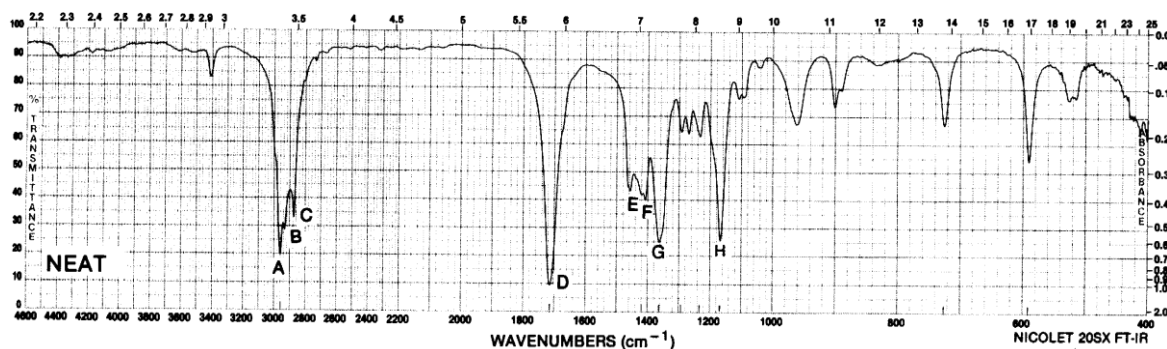
Attribuer à chaque spectre le composé correspondant, en indexant les bandes les plus importantes.



Spectre 1



Spectre 2



Spectre 3

Solution:

En utilisant les tables, on peut facilement identifier les composés en se basant surtout sur les groupes fonctionnels, on doit trouver:

Spectre 1 : hex-1-yne ($\bar{\nu}(\text{C-H}) = 3310 \text{ cm}^{-1}$, $\bar{\nu}(\text{C}\equiv\text{C}) = 2119 \text{ cm}^{-1}$)

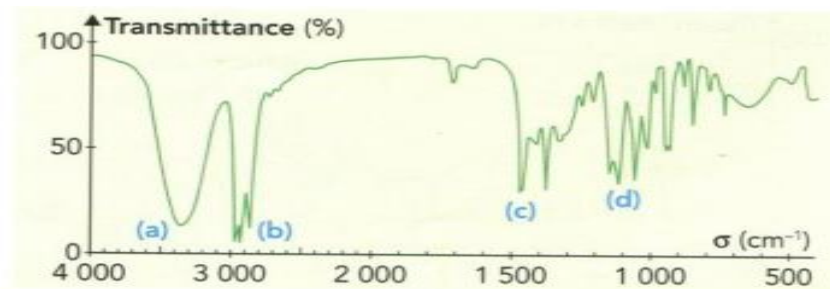
Spectre 2 : phénylméthanol ($\bar{\nu}(\text{OH}) = 3330 \text{ cm}^{-1}$)

Spectre 3 : pentan-2-one ($\bar{\nu}(\text{C=O}) = 1717 \text{ cm}^{-1}$)

Exercice 4 :

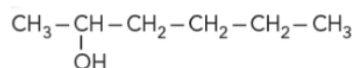
Un extrait du spectre infrarouge de l'héxan-2-ol (Spectre 1).

1. Ecrire la formule semi-développée de l'héxan-2-ol. En déduire le groupe caractéristique et la fonction chimique de ce composé.
2. Identifier alors les bandes d'absorption notées (a), (b), (c) et (d).

**Solution :**

Reconnaitre des bandes d'adsorption

1.



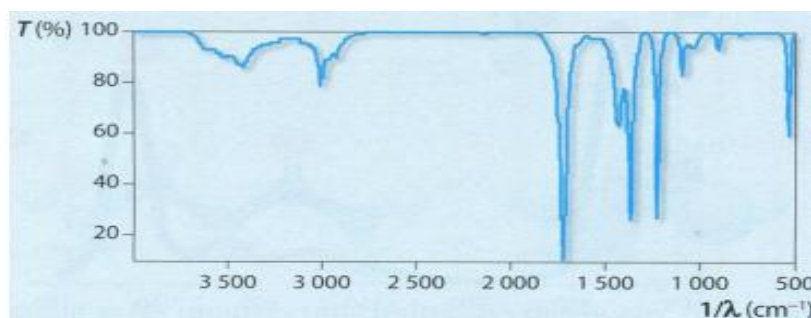
Groupe hydroxyle (alcool)

2. (a) liaison OH ; (b) liaison C-H ; (c) liaison C-H ; (d) liaison C-O.

Exercice 5 :

On donne le spectre d'absorption d'une molécule organique.

1. Quelle liaison peut-on facilement identifier ?
2. A quelle famille chimique appartient cette molécule ?



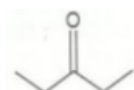
Solution

1. La bande vers 1750 cm^{-1} correspond à la liaison $\text{C}=\text{O}$ d'un aldéhyde ou d'une cétone.
2. L'absence de bande vers 2700 cm^{-1} , caractéristique de liaison $\text{C}-\text{H}$ d'un aldéhyde, indique qu'il s'agit d'une cétone.

Exercice 6 :

Le spectre infrarouge d'un composé organique A de formule brute $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}$ (spectre 1)

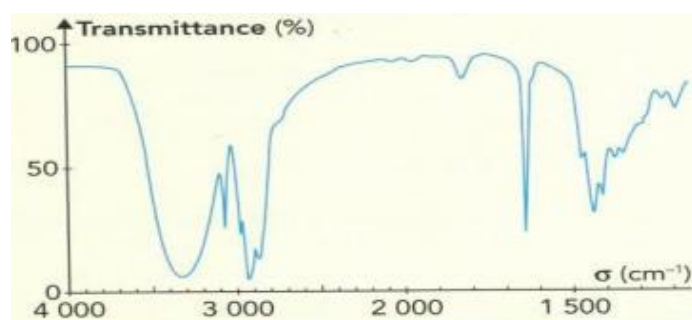
1. le composé A possède-t-il, a priori, des liaisons : $\text{C}-\text{H}$? $\text{O}-\text{H}$? $\text{C}=\text{O}$? $\text{C}=\text{C}$?
2. Lequel des deux composés suivants peut-être le composé A ?



a. Pentane-3-one



b. penta-4-ène-1-ol



Solution :

1. Domaine des nombre d'ondes :

$\text{C}-\text{H}_{\text{tét}}$: $2800-3000\text{ cm}^{-1}$ et $1415-1470\text{ cm}^{-1}$; $\text{C}-\text{H}_{\text{tri}}$: $3000-3100\text{ cm}^{-1}$;

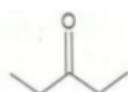
$\text{O}-\text{H}$: $3200-3250\text{ cm}^{-1}$; $\text{C}=\text{O}$: $1650-1750\text{ cm}^{-1}$; $\text{C}=\text{C}$: $1625-1685\text{ cm}^{-1}$

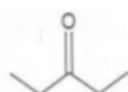
- Le spectre présente des bandes d'absorption vers 3300 cm^{-1} , 3080 cm^{-1} , 2950 cm^{-1} , (et 1430 cm^{-1}) et 1650 cm^{-1} .

- Le composé A peut donc à priori, présenter des liaisons : $\text{O}-\text{H}$, $\text{C}=\text{C}$,

$\text{C}-\text{H}_{\text{tét}}$, $\text{C}-\text{H}_{\text{tri}}$,

- Le composé A ne possède pas de liaison $\text{C}=\text{O}$



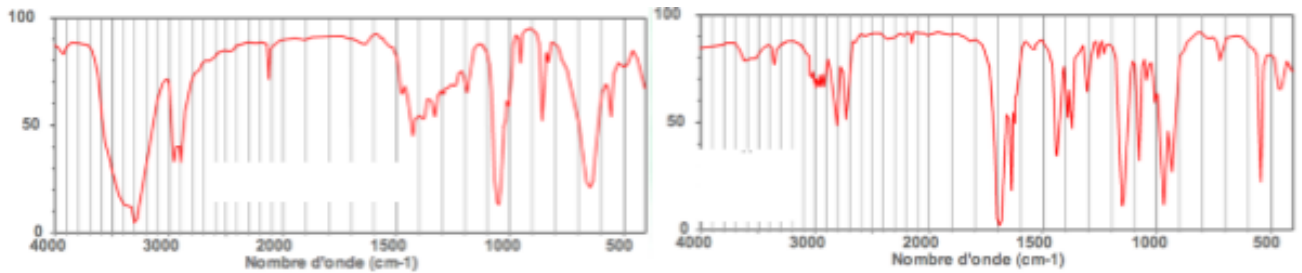
- 2.a. La formule de penta-3-one est : . Elle possède une liaison $\text{C}=\text{O}$ \Rightarrow ne peut être le composé A.

b. La formule du pent-4-én-1-ol est :  . Il a des liaisons O-H , C=C,

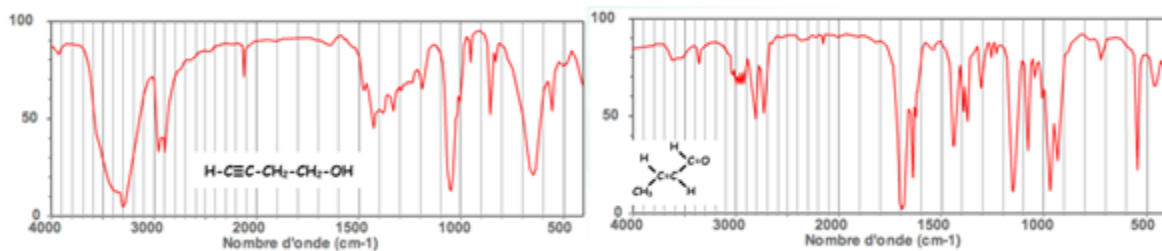
$\overset{\text{tét}}{\text{C}} - \text{H}$, $\overset{\text{tri}}{\text{C}} - \text{H}$. Le pent-4-én-1-ol peut être le composé A.

Exercice 7 :

Retrouver les bandes caractéristiques relatives aux fonctions des deux composés ci-dessous, de même formule brute $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}$.



Solution :

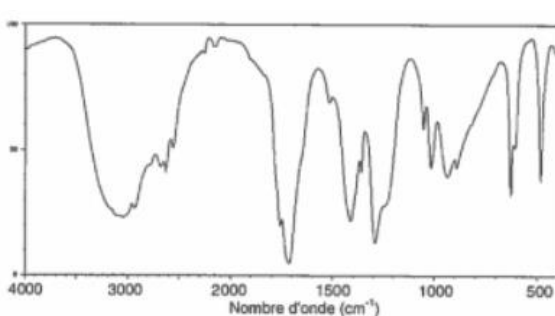


Exercice 8 :

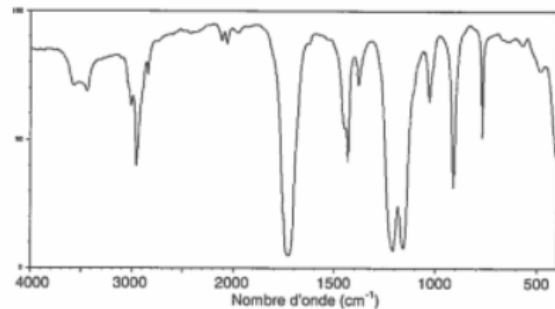
L'autre produit issu de la synthèse de l'aspirine est l'acide éthanoïque de formule brute $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$.

1. Donner la formule semi-développée de l'acide éthanoïque et du méthanoate de méthyle qui est un isomère de l'acide éthanoïque.
2. Les spectres infrarouges de ces deux espèces chimiques sont regroupés dans le **document 1** ci-dessous. Une table de données de spectroscopie infrarouge est également fournie (**document 2**). Identifier celui qui appartient à l'acide éthanoïque en justifiant.

Document 1 : spectre IR de l'acide éthanoïque et du méthanoate de méthyle



Spectre IR 1



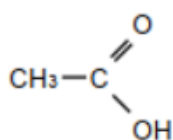
Spectre IR 2

Document 2 : données pour la spectroscopie IR

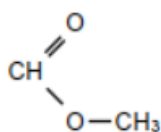
famille	liaison	nombre d'onde (cm ⁻¹)
cétone	C = O	1705 - 1725
aldéhyde	C _{sp} - H	2700 - 2900
	C = O	1720 - 1740
acide carboxylique	O - H	2500 - 3200
	C = O	1740 - 1800
ester	C = O	1730 - 1750
alcool	O - H _{lié}	3200 - 3450
	O - H _{libre}	3600 - 3700

Solution :

1.

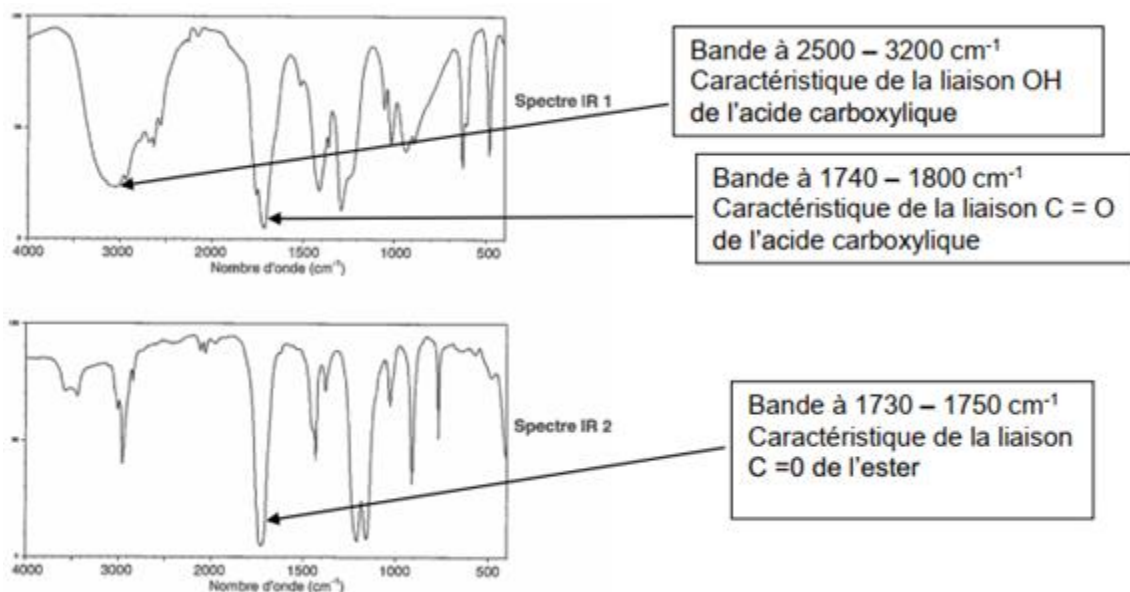


Acide éthanoïque



méthanoate de méthyle

Il s'agit d'un ester.

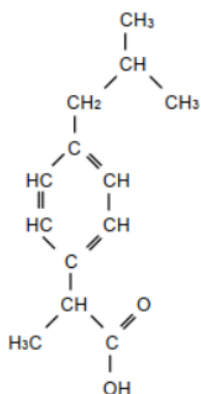


Le spectre IR1 correspond à celui de l'acide éthanoïque et le spectre IR2 à celui du méthanoate de méthyle.

Exercice 9 :

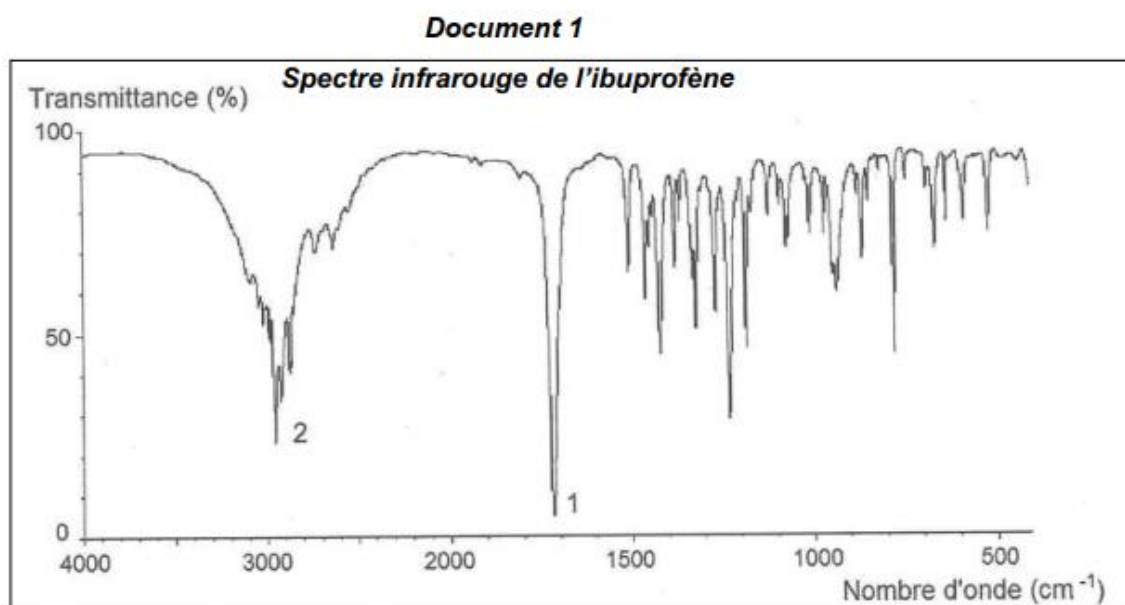
L'ibuprofène est une molécule de formule brute C₁₃H₁₈O₂. Son nom en nomenclature officielle est acide 2-(4-isobutylphényl)propanoïque. De par ses propriétés anti-inflammatoire, antalgique et antipyrétique, elle constitue le principe actif de divers médicaments.

Cet exercice comporte trois parties indépendantes conduisant à étudier la structure de la molécule d'ibuprofène, sa synthèse dans le cadre de la chimie verte et le dosage d'un médicament.



Formule semi-développée de l'ibuprofène

1. Donner l'origine des bandes d'absorption 1 et 2 du spectre infrarouge IR (document 1) en exploitant les données du document 2.



Document 2
Bandes d'absorption IR de quelques types de liaisons chimiques

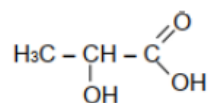
Type de liaison	Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Largeur de la bande	Intensité d'absorption
O-H sans liaison hydrogène	3580 - 3650	fine	forte
O-H avec liaison hydrogène	3200 - 3300	large	forte
O-H d'un acide carboxylique	2500 - 3200	large	variable
C-H des groupes CH ₂ , CH ₃ , CH dans les alcanes, les alcènes et les cycles aromatiques	2900 - 3100	variable (bandes multiples)	variable
C=C dans un cycle aromatique	1500 - 1600	fine	moyenne
C=O d'un acide carboxylique	1700 - 1725	fine	forte

Solution :

- La bande n°1 est fine, de forte intensité et correspond à un nombre d'onde σ d'environ 1700 cm⁻¹ caractéristique de la liaison C = O d'un acide carboxylique.
- La bande n°2 est large et centrée autour de $\sigma = 3000$ cm⁻¹, elle peut caractériser les liaisons C – H ou/et la liaison O-H de l'acide carboxylique.

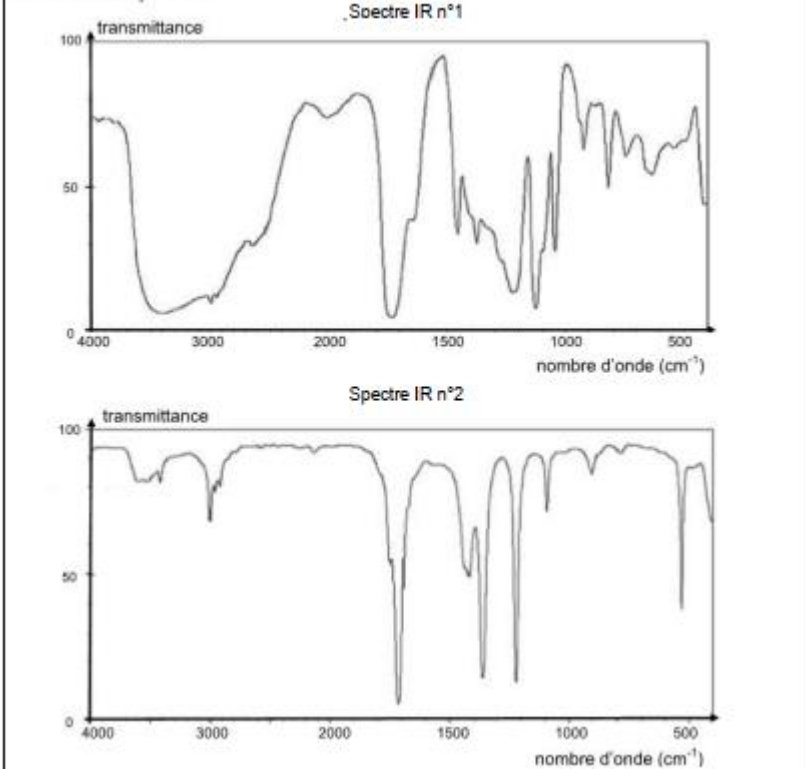
Exercice 10 :

La formule semi-développée de l'acide lactique est la suivante :



Parmi les spectres IR proposés dans le document 1 ci-après, choisir en justifiant celui correspondant à l'acide lactique.

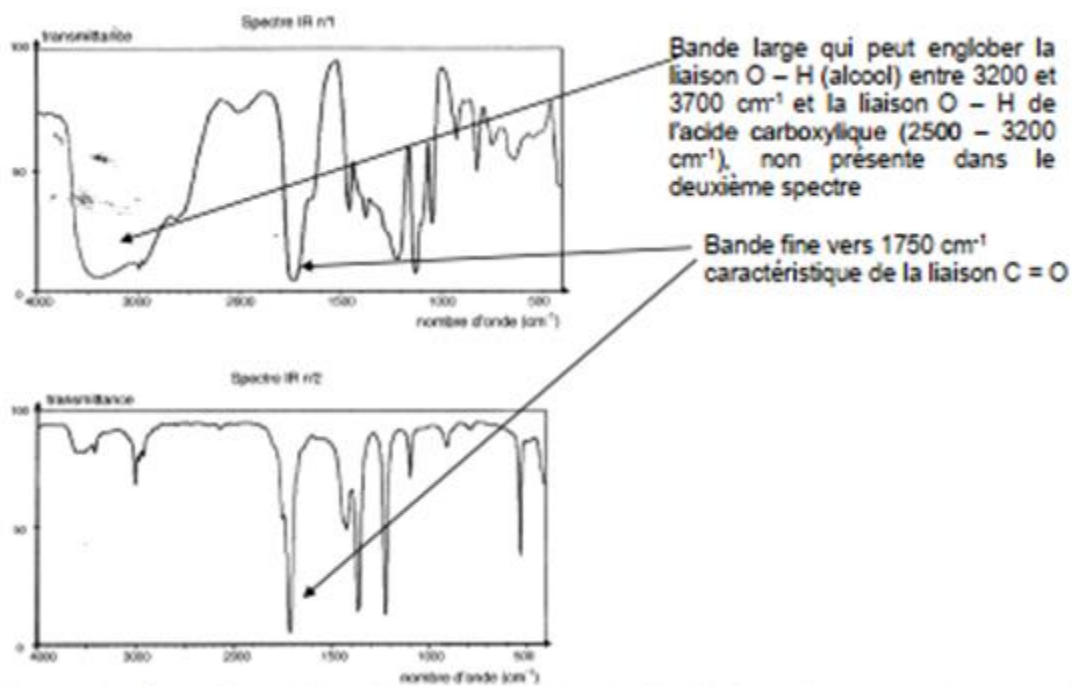
Document 1 : Spectres IR



Donnée : bandes d'absorption en spectroscopie IR

Liaison	C-C	C=O	O-H (acide carboxylique)	C-H	O-H (alcool)
Nombre d'onde (cm ⁻¹)	1000 - 1250	1700 - 1800	2500 - 3200	2800 - 3000	3200 - 3700

Solution :



Le spectre n°1 correspond à l'acide lactique car la bande O-H n'est présente que dans le spectre n°1.

Exercice 11 :

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

Solution :

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

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

$$\mu = \frac{m_A \cdot m_B}{m_A + m_B}$$

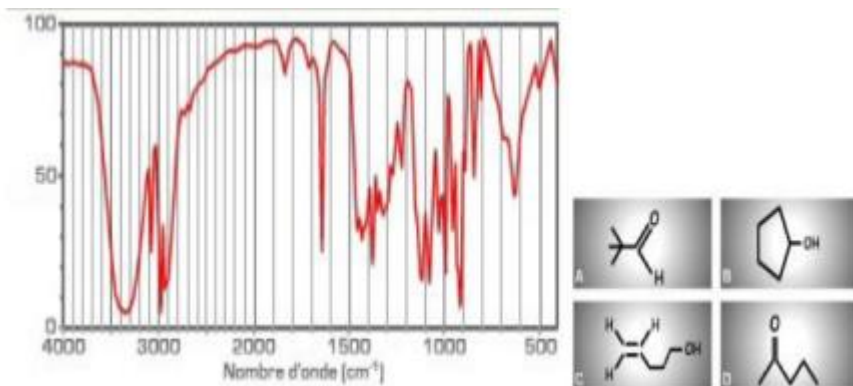
$$k = 1190 \text{ N.m}^{-1}$$

2. Calcul de la valeur de la constante de force pour la vibration d'élongation de la liaison C-

$$O k = 2\pi\nu\mu$$

$$k = 446 \text{ N.m}^{-1}$$

A qui appartient ce spectre ? Justifier.



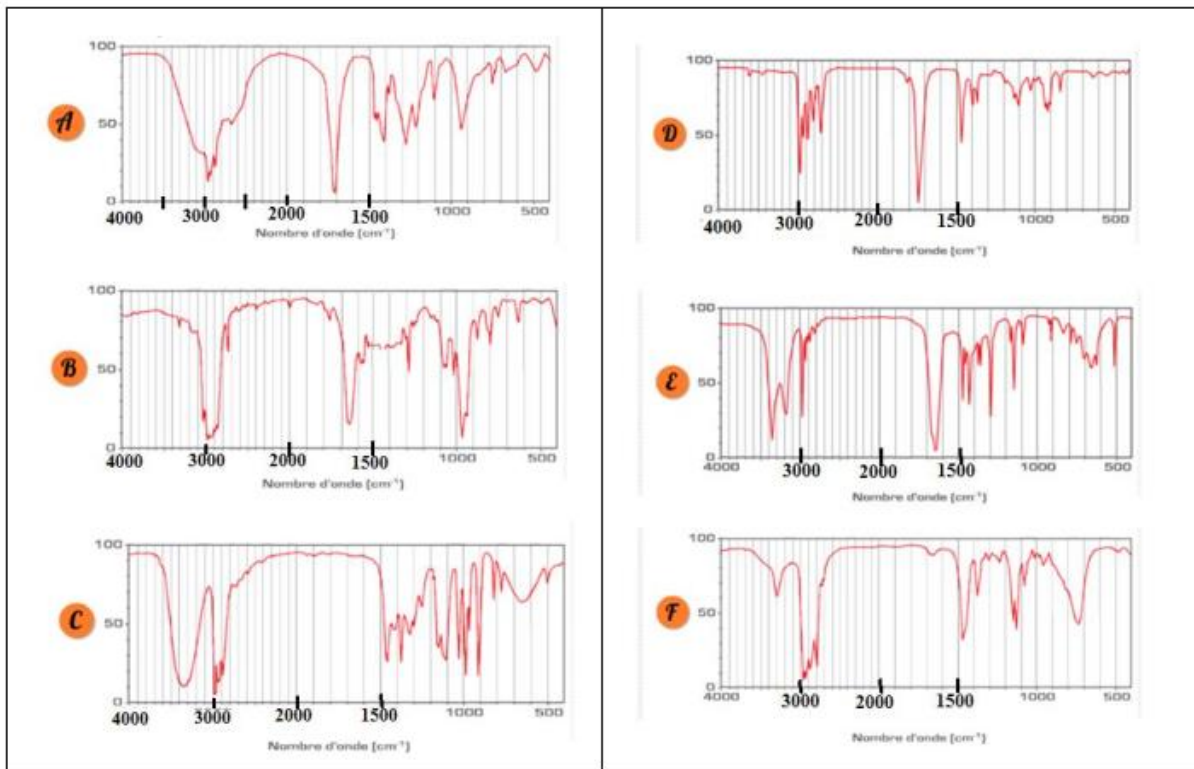
- La bande entre 3200 et 3600 cm^{-1} → alcool → soit le composé B ou C

- La bande vers 1650 cm^{-1} → liaison C=C → c'est le composé C

Exercice 12 :

Attribuer à chacun des spectres IR ci-dessous une molécule du tableau précédent :

1 <chem>CH3CH2CH2CH2COOH</chem>	2 <chem>CH3CH(CH3)CHO</chem>	3 <chem>CH3CH=CHCH2CH3</chem>
4 <chem>CH3CH2CH2CH2NHCH3</chem>	5 <chem>CH3CH(OH)CH2CH3</chem>	6 <chem>CH3CH(CH3)C(=O)NH2</chem>



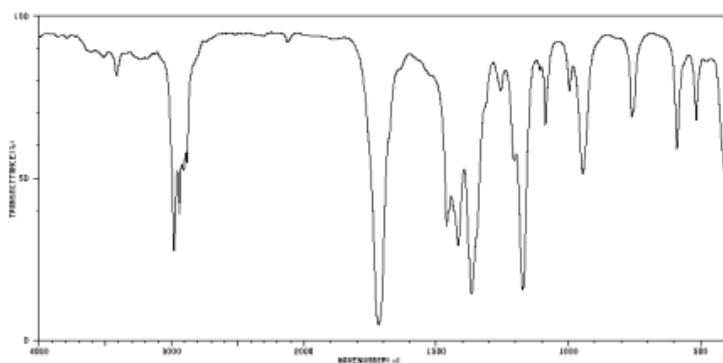
Solution :

- ✓ $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ doit avoir les liaisons : C-O, O-H, C=O → Spectre A : bande attribuable à une liaison O-H, pic fort attribuable à une liaison C=O, pic fort attribuable à une liaison C-O,
- ✓ $\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CHO}$ doit avoir les liaisons → Spectre D : pic fort attribuable à une liaison C=O.
- ✓ $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$ doit avoir les liaisons → Spectre B : pic fort attribuable à une liaison C_{tri}-H, pic fort attribuable à une liaison C=C.
- ✓ $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_3$ doit avoir les liaisons → Spectre F : pic moyen attribuable à une liaison N-H.
- ✓ $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}_3$ doit avoir les liaisons → Spectre C : bande attribuable à une liaison O-H, pic fort attribuable à une liaison C-O.
- ✓ $\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$ doit avoir les liaisons → Spectre E : pic fort attribuable à une liaison N-H, pic fort attribuable à une liaison C=O.

Exercice 13 :

Une molécule organique notée M a pour formule brute C_4H_8O . On sait qu'il ne s'agit pas d'une molécule cyclique.

1. Quels sont les groupes caractéristiques connus qui sont compatibles avec la présence d'un seul atome d'oxygène dans la molécule M?
2. Par comparaison avec la formule brute du butan-1-ol, confirmer la présence d'une liaison double au sein de la molécule, soit entre deux atomes de carbone, soit entre un atome de carbone et un atome d'oxygène.
3. Le spectre IR de l'espèce chimique en phase condensée est représenté ci-dessous.
 - a. Quel renseignement supplémentaire ce spectre fournit-il ?
 - b. Écrire les formules topologiques des trois molécules envisageables, puis les nommer.
4. La molécule a été obtenue par oxydation d'un alcool secondaire. Conclure

**Solution :**

Une molécule organique notée M a pour formule brute C_4H_8O . On sait qu'il ne s'agit pas d'une molécule cyclique.

1. D'après la formule brute, on voit qu'elle est composée de C, de H et de O. On peut donc déjà éliminer les amines et les amides.

De plus, il n'y a qu'un seul oxygène. On peut donc éliminer les esters et les acides carboxyliques.

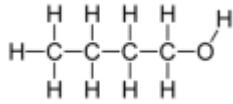
Ce n'est pas non plus un alcane (molécule uniquement constituée de C et de H).

⇒ Il ne reste plus que : alcool, aldéhyde ou cétone. Autrement dit, les groupes caractéristiques possibles sont :

hydroxyle ou carbonyle.

2. Écrivons la formule développée du butan-1-ol

Soit une formule brute : $C_4H_{10}O$

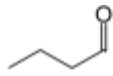


La molécule M comporte 2 atomes d'hydrogène en moins ce qui implique la présence d'une double liaison. Cette double liaison peut être soit entre deux atomes de carbone soit entre un atome de carbone et un atome d'oxygène.

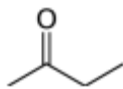
3. Phase condensée = liquide (voire solide)

a. On constate la présence de deux bandes : $\sigma_1 = 1710 \text{ cm}^{-1}$; fine \rightarrow liaison C=O aldéhyde cétone.
 $\sigma_2 = 3000 \text{ cm}^{-1}$; fine \rightarrow liaison C-H.

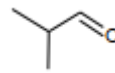
b. Écrire les formules topologiques :



butanal



butan-2-ol



2-méthylpropanal

4. Si on oxyde un alcool secondaire, on obtient une cétone. Si on oxyde un alcool primaire, on obtient un aldéhyde. Un alcool tertiaire ne peut pas être oxydé.

\Rightarrow On peut donc conclure que la molécule étudiée est la butan-2-one.

CHAPITRE IV : SPECTROMÉTRIE DE MASSE



I. INTRODUCTION

La spectrométrie de masse (SM) désigne une méthode de caractérisation de la matière qui repose sur la détermination des masses atomiques ou moléculaires des espèces individuelles présentes dans l'échantillon. Les instruments correspondants sont les spectromètres de masse. Ces instruments peuvent être placés en aval d'une technique séparative (chromatographie par exemple). Les perfectionnements de ces appareils, leur miniaturisation ainsi que l'apparition de nouvelles techniques d'ionisation, ont fait de cette méthode celle qui a le plus vaste champ d'application par sa polyvalence et par son extrême sensibilité. La spectrométrie de masse est une technique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules par mesure de leur masse. De plus, elle permet de caractériser la structure chimique des molécules en les fragmentant et de réaliser des analyses quantitatives. Des limites de détection inférieures au nanogramme (10^{-9} g) et même au picogramme (10^{-12} g) sont souvent atteintes.

II. APPLICATIONS

La spectrométrie de masse est présente dans des secteurs très divers :

- ✓ Chimie organique ;
- ✓ Chimie inorganique ;
- ✓ Astrophysique ;
- ✓ Biologie ;

-
- ✓ Géochimie ;
 - ✓ Environnement ;
 - ✓ Médecine...

Elle sert à toutes sortes d'analyses. Sa grande sensibilité de détection de la spectrométrie de masse en fait une technique de choix pour l'étude des œuvres d'art puisqu'elle ne requiert que des micro prélèvements. Elle joue aujourd'hui un rôle important dans les études de pollution de l'environnement et de dopage grâce à sa sensibilité, sa sélectivité et sa possibilité de faire des analyses quantitatives rapides.

III. PRINCIPE DE BASE

La spectrométrie de masse est basée sur la détermination des masses des molécules ou atomes présents dans l'échantillon étudié. Pour arriver à ce résultat, on commence par transformer une très petite quantité du composé à analyser en ions par un moyen adapté. Ces ions sont alors analysés. Les forces qui s'exercent sur ces ions permettent de déterminer leur rapport masse /charge, donc éventuellement leur nature.

IV. SPECTRE DE MASSE

Le spectre de masse est un diagramme qui représente (Fig.1) :

- ❖ selon l'axe des abscisses : les rapports m/z des ions détectés (en impact électronique, $z = 1$; m/z s'exprime alors en Dalton).
- ❖ selon l'axe de ordonnées : l'abondance relative de ces ions. Celle du pic le plus intense est fixé arbitrairement à 100.

Les différents types de pics observés dans un spectre de masse sont :

- ✓ Le pic de base : c'est le pic le plus intense du spectre. Il correspond à l'ion le plus abondant donc le plus stable.
- ✓ Le pic moléculaire ou pic parent : il correspond à l'ion de nombre de masse égal à la masse moléculaire de la substance.
- ✓ Les pics fragments : ils correspondent aux différents ions fragments.

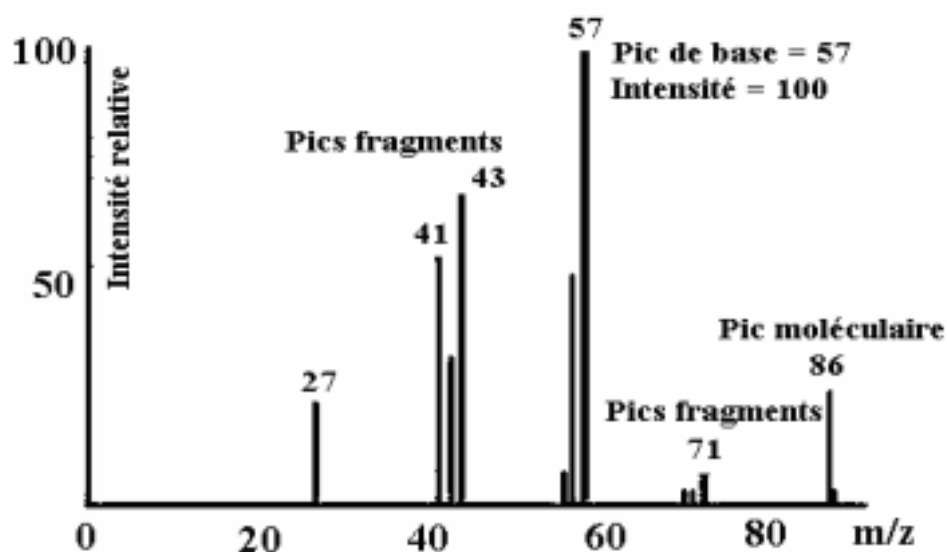
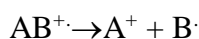


Fig. 1. Spectre de masse de l'hexane C_6H_{14} ($M=86$)

✓ Les pics métastables : Soit



AB^+ de masse m_1 ; A^+ de masse m_2

On observe parfois sur le spectre un pic métastable à une masse m^* :

$$m^* = \frac{m_2^2}{m_1}$$

Cette masse ne correspond pas à une masse réelle. La présence d'un pic métastable confirme une filiation (m_2 provient de m_1).

V. ANALYSE SPECTRALE

L'interprétation d'un spectre de masse peut se décomposer en deux étapes :

- ❖ Exploitation de l'ion moléculaire (la masse moléculaire, la parité, les isotopes, la formule brute...)
- ❖ Exploitation des ions fragments qui dépendent de la nature et de la structure de la molécule.

V.1. Masse de l'ion moléculaire

La spectrométrie de masse permet de connaître la masse moléculaire d'une substance inconnue à partir du pic moléculaire.

V.2. Parité de l'ion moléculaire

Un ion moléculaire donne un pic à une masse impaire s'il comporte un nombre impair d'éléments trivalents (N, P...).

Exemple : Ammoniac NH_3 : pic moléculaire à $m/z = 17$.

V.3. Amas isotopique

Sur le tableau ci-dessous sont données les abondances naturelles relatives des isotopes des éléments courants. Les abondances relatives sont calculées en donnant la valeur 100 à l'isotope majoritaire.

Tableau 1 : Abondances relatives dans la nature des isotopes.

Élément	Isotope le plus abondant	Abondance naturelle relative des autres isotopes				
Carbone	^{12}C	100%	^{13}C	1.1%		
Hydrogène	^1H	100%	^2H	0.016%		
Azote	^{14}N	100%	^{15}N	0.38%		
Oxygène	^{16}O	100%	^{17}O	0.04%	^{18}O	0.20%
Fluor	^{19}F	100%				
Silicium	^{28}Si	100%	^{29}Si	5.10%	^{30}Si	3.35%
Phosphore	^{31}P	100%				
Soufre	^{32}S	100%	^{33}S	0.78%	^{34}S	4.40%
Chlore	^{35}Cl	100%			^{37}Cl	32.5%
Brome	^{79}Br	100%			^{81}Br	98.0%
Iode	^{127}I	100%				

L'ensemble des pics dus à différents isotopes d'un élément constitue l'amas isotopique. D'une manière générale, le nombre et les intensités relatives des pics constituant l'amas isotopique sont déterminés à partir de la relation : $(a+b)^n$

a : abondance relative de l'isotope le plus léger

b : abondance relative de l'isotope le plus lourd prise égale à l'unité

n : nombre d'atomes de l'élément considéré

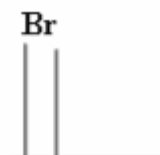
✓ **Cas des isotopes d'abondance considérable (chlore ; brome)**

Les atomes de chlore ou de brome ont un isotope lourd (+2) abondant. Dans le cas d'un ion contenant n halogènes, la relation $(a+b)^n$ donne :

Exemple 1 : CH_3Br

$$\begin{array}{rcc}
 {}^{79}\text{Br} : 100\% & {}^{81}\text{Br} : 98\% & \\
 a = 1 & b = 1 & (a+b)^1 = a + b \\
 & & \begin{array}{ccc} 1 & + & 1 \\ M & & M+2 \end{array}
 \end{array}$$

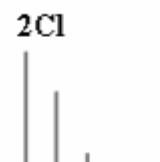
Dans l'amas isotopique, on a deux pics à M et M+2 d'intensité relative 1:1.



Exemple 2 : CH₂Cl₂

$$\begin{array}{rcc}
 {}^{35}\text{Cl} : 100\% & {}^{37}\text{Cl} : 32\% & \\
 a = 3 & b = 1 & (a+b)^2 = a^2 + 2ab + b^2 \\
 & & \begin{array}{ccc} 9 & 6 & 1 \\ M & M+2 & M+4 \end{array}
 \end{array}$$

Il y a 3 pics à M, M+2 et M+4 avec des intensités relatives 9:6:1.



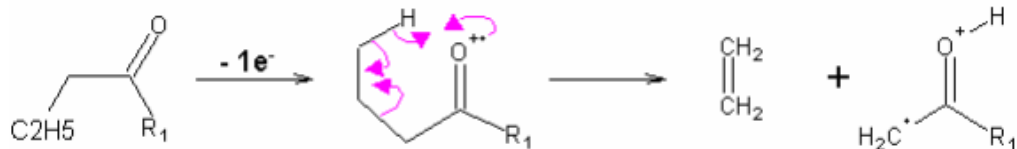
V.4. Exploitation des ions fragments

Les facteurs influençant le processus de fragmentation sont les suivants :

- ✓ Les liaisons faibles se coupent plus facilement.
- ✓ Les fragments stables ont tendance à se former plus facilement.
- ✓ Les fragmentations avec réarrangement sont favorisées si la molécule possède un état transitoire à 6 centres.

V.4.1. Réarrangement de McLafferty

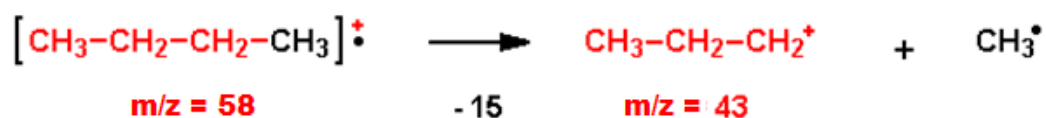
H en γ d'une insaturation.



V.4.2. Fragmentations caractéristiques de quelques classes chimiques

V.4.2.1. Les alcanes

Dans les alcanes linéaires, la fragmentation se manifeste par la perte d'un méthyle; ce qui donne des fragments de $m/z = \text{masse molaire} - 15$.



En général les fragments correspondent à $m/z = 29, 43, 57, 71\dots$ (Ou masse molaire $-15 - 14 \times n$).

Voir l'exemple du butane (fig). Il peut aussi y avoir formation d'une molécule neutre d'éthène.

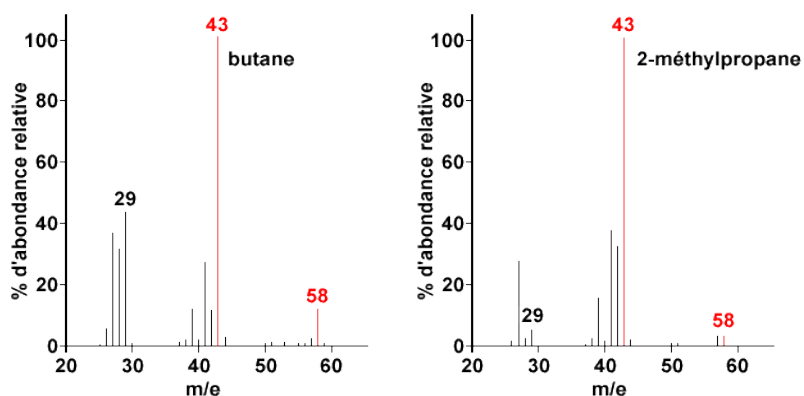
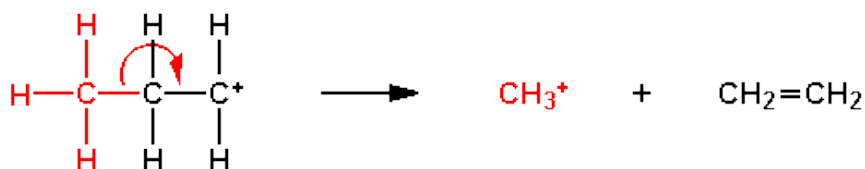
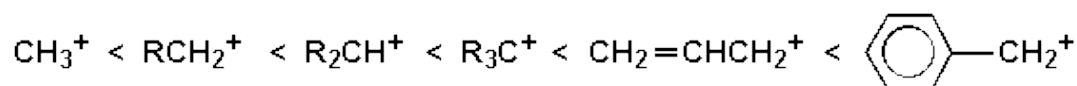


Fig.2 : Spectres de masse du butane $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ et du 2-méthylpropane $\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$, des isomères dont les masses molaires = 58 g/mol.

Pour tous les hydrocarbures linéaires, les ions 43 et 57 sont les pics les plus intenses du spectre car ils correspondent aux cations les plus stables.

Ion R ⁺	CH ₃ ⁺	CH ₃ -CH ₂ ⁺	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ ⁺	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ ⁺
m/z	15	29	43	57

Ordre croissant de stabilité :



V.4.2.2. Les alcènes

Les alcènes donnent très souvent par ionisation un fragment de m/z = 41 qui correspond au carbocation allylique.

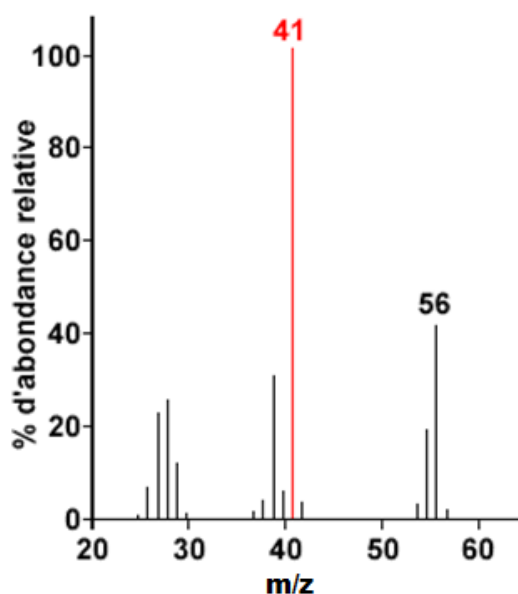
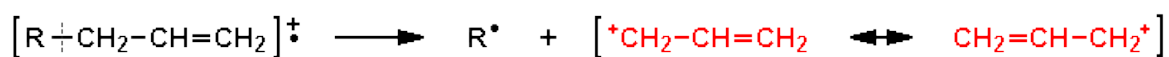


Fig.3 : Spectre de masse du 1-butène $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH=CH}_2$ dont la masse molaire = 56 g/mol.

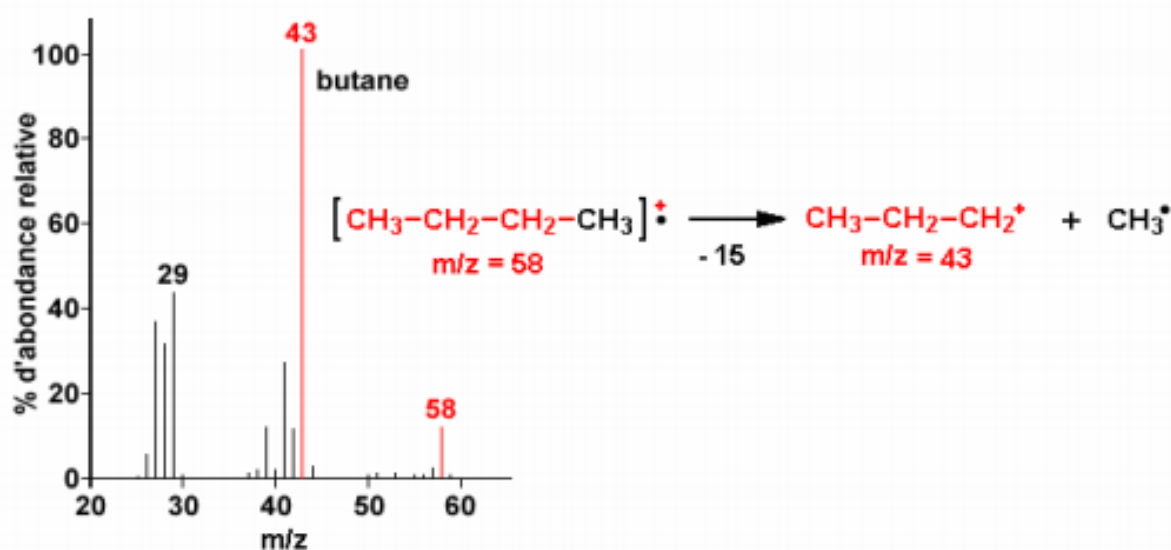
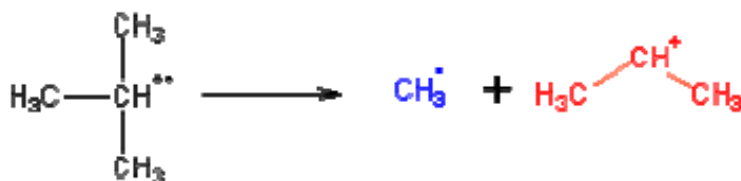


Fig.4 : Spectre de masse du butane $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$ dont la masse molaire = 58 g/mol.

Dans les hydrocarbures ramifiés, la fragmentation se fait dans le sens à donner le carbocation le plus stable.

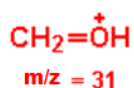


Le cation isopropyle est plus stable que le cation CH_3^+ .

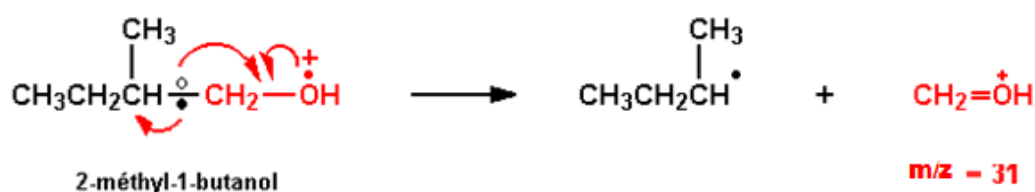
V.4.2.3. Les alcools

Le pic de l'ion moléculaire des alcools est presque inexistant car ils perdent une molécule d'eau très facilement. Cette perte peut même se produire sous l'effet de la chaleur avant la fragmentation. Dans ce cas particulier l'allure du spectre ressemblera plutôt à celui d'un alcène.

Le fragment le plus courant est :



Le cas des alcools ramifiés est plus difficile à analyser.



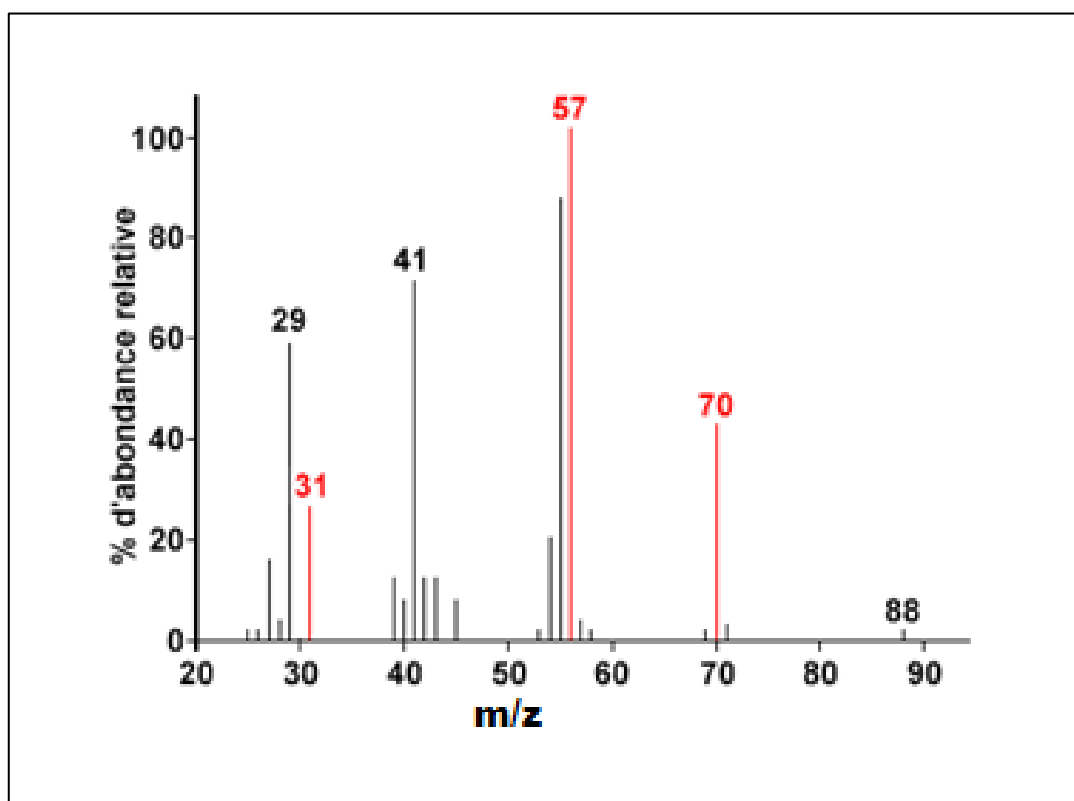
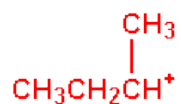


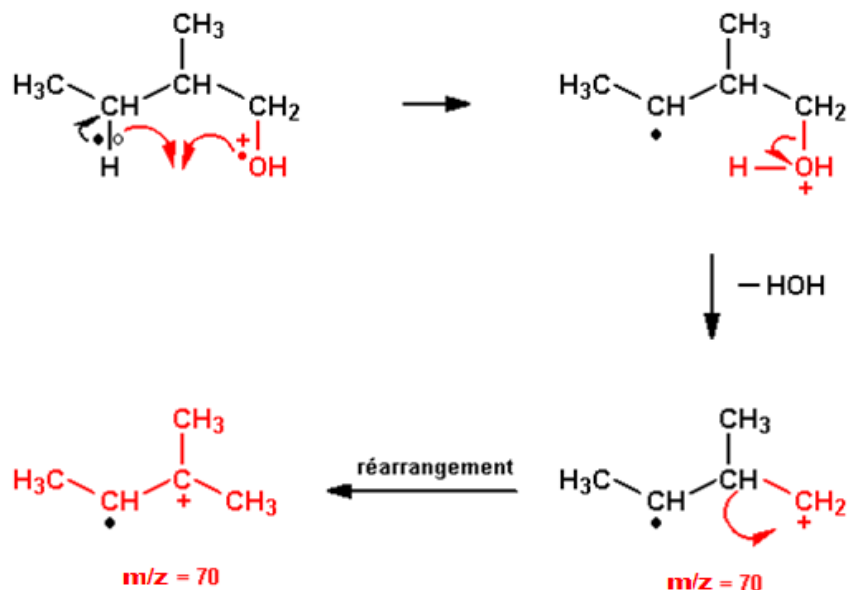
Fig. 5 : Spectre de masse 2-méthyl-1-butanol $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}$
dont la masse molaire = 88 g/mol.

Le pic à $m/z = 57$ correspondrait au fragment



Mais, bien qu'assez stable, il est assez difficile d'expliquer sa formation.

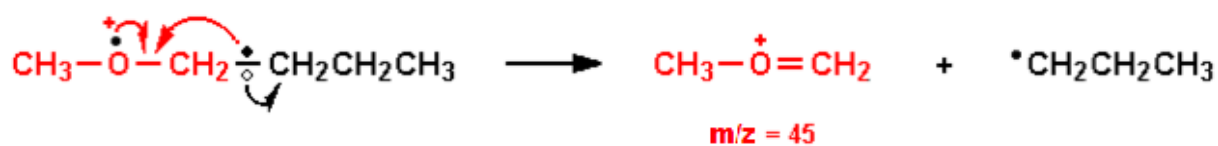
Le pic à $m/z = 70$ correspond à une déshydratation qui se ferait selon le mécanisme suivant :



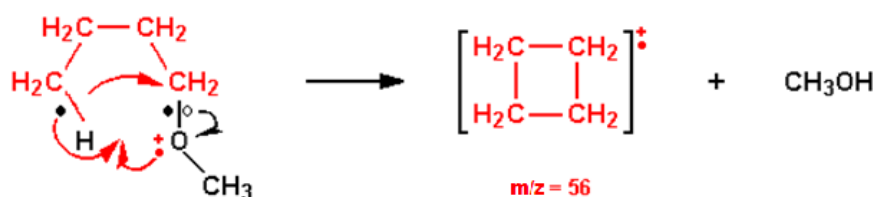
V.4.2.4. Éthers

La fragmentation des éthers se fait un peu de la même façon que celle des alcools.

a. Rupture en α du méthoxybutane.



b. Cyclisation avec formation du cyclobutane (dans ce cas particulier) et d'une molécule neutre.



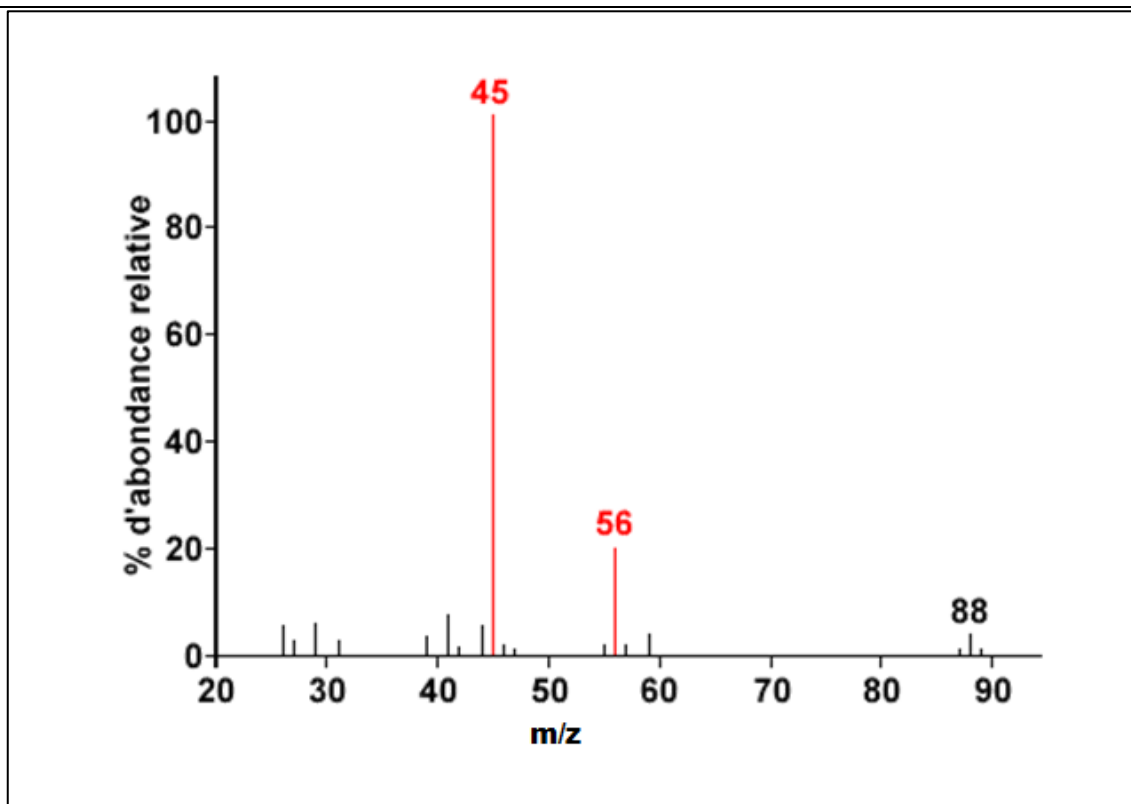
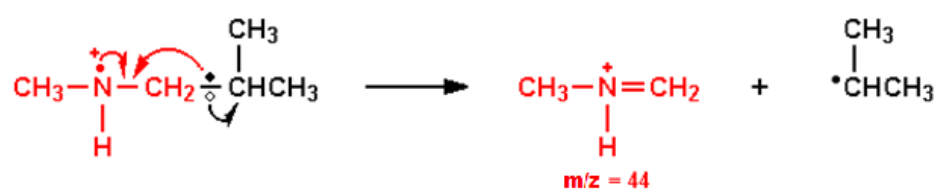


Fig.6 : Spectre de masse du methoxybutane $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ dont la masse molaire = 88 g/mol.

V.4.2.5. Les amines

Les amines se comportent comme les alcools et les amines secondaires comme les éthers. Par exemple la fragmentation de la N-méthyl-isopropylamine donne principalement :



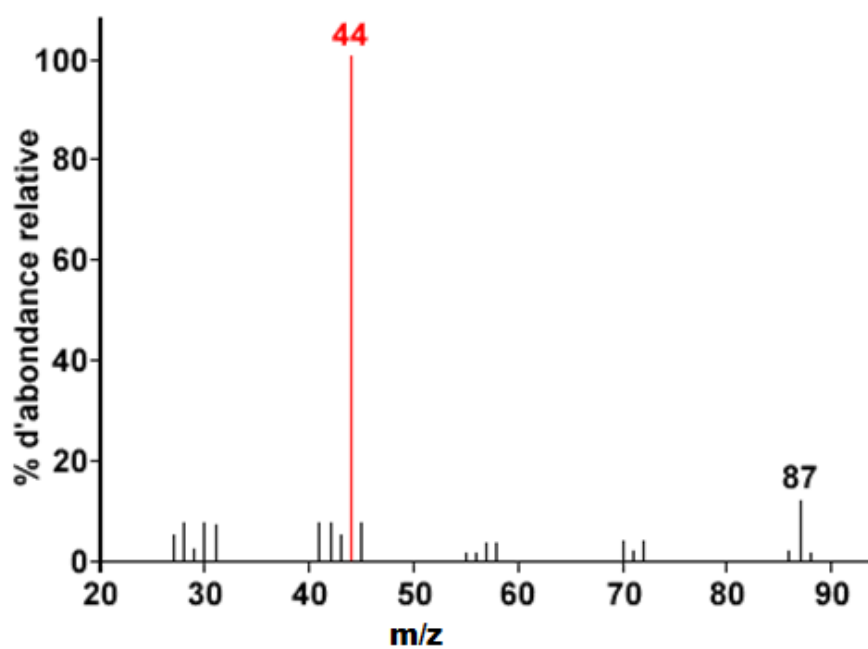


Figure 7 : Spectre de masse de la N-méthyl-2-méthylpropanamine $\text{CH}_3\text{NCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$ dont la masse molaire = 87 g/mol.

V.4.2.6. Les composés benzéniques

Ces composés donnent des spectres de masse facilement interprétables. Le pic moléculaire est toujours intense car l'ion moléculaire est fortement stabilisé.

a. Le benzène

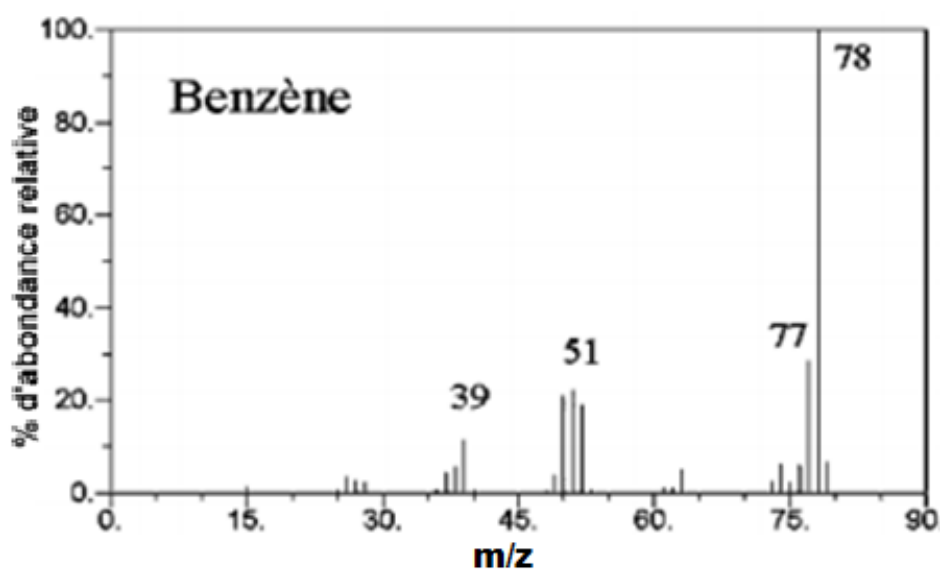


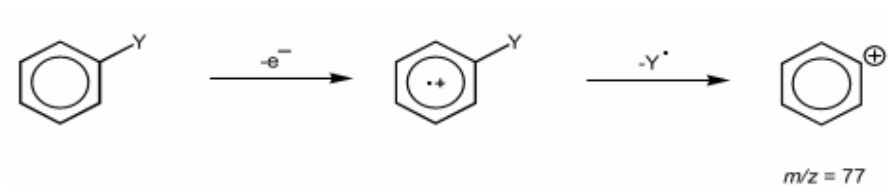
Fig. 8 : Spectre de masse du benzène C_6H_6 dont la masse molaire = 78 g/mol.

Les fragmentations du benzène produisent des ions caractéristiques : $m/z = 77$ $[M-H]^+$, $m/z = 51$: $C_4H_3^+$ [$77 - 26$ (acétylène)] et $m/z = 39$: ion cyclique $C_3H_3^+$.

b. Les benzènes monosubstitués

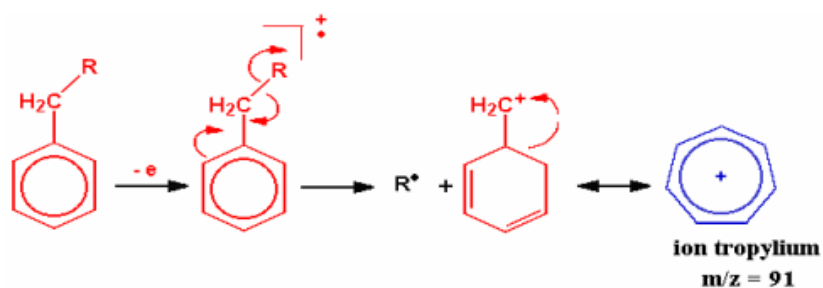
❖ Clivage α

Si le substituant n'est pas un alkyle, les benzènes monosubstitués perdent fréquemment leur substituant pour former le cation phényle à $m/z = 77$.



❖ Clivage β

Les benzènes substitués par un groupe alkyle ont une fragmentation prépondérante : la rupture en β du cycle aromatique, appelée rupture benzylique. Ils perdent un hydrogène ou un groupe alkyle de façon à former le cation aromatique tropylium à $m/z = 91$.

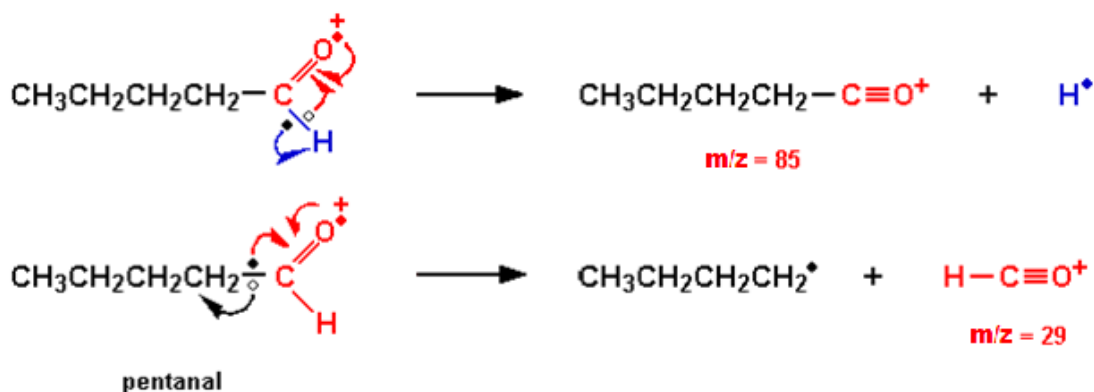


Cet ion est fortement stabilisé et constitue souvent le pic de base du spectre de masse.

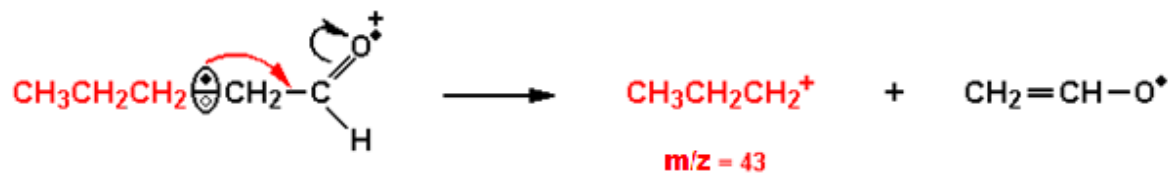
V.4.2.7. Les aldéhydes

Chez les aldéhydes il y a quatre « patrons » de fragmentation. Le pentanal servira d'exemple.

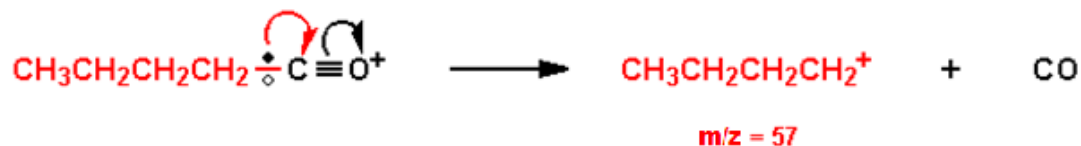
❖ Clivage α



❖ Clivage β



❖ Rupture de la liaison en α



❖ Réarrangement de type McLafferty

Dans cet exemple, on a un H en γ de l'insaturation (fonction aldéhyde).

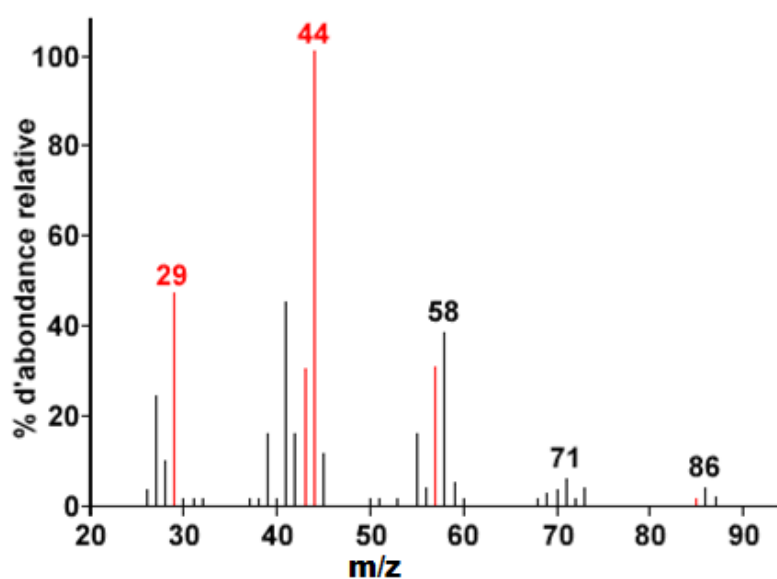
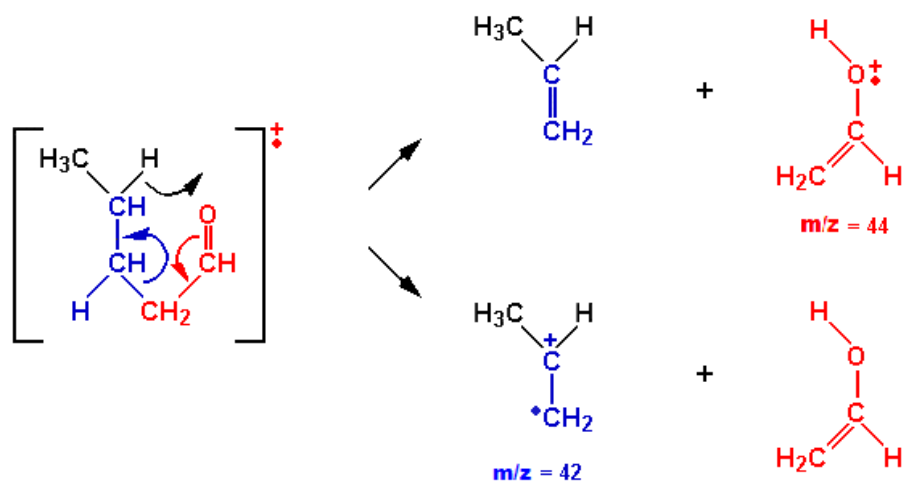
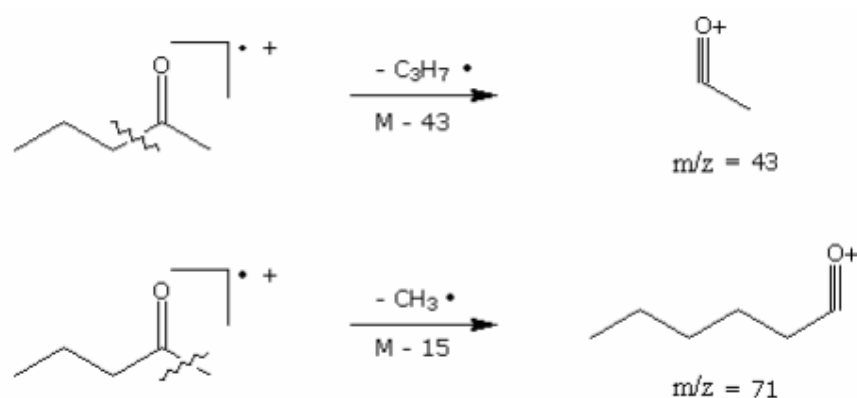


Fig. 9 : Spectre de masse du pentanal $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$ dont la masse molaire = 86 g/mol.

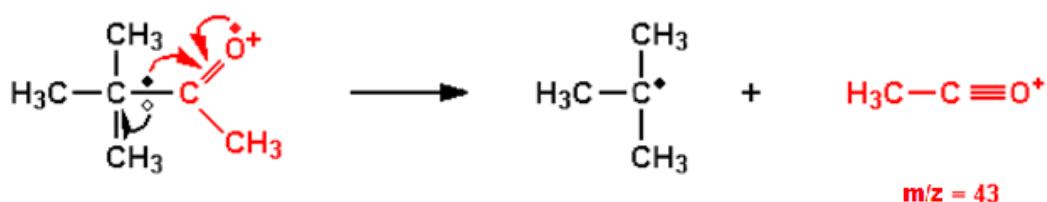
V.4.2.8. Les cétones et les esters

Le mode de fragmentation le plus fréquent des cétones $\text{R}'\text{COR}''$ est la rupture en α qui peut donner $\text{R}'\text{CO}^+$ ou $\text{R}''\text{CO}^+$.

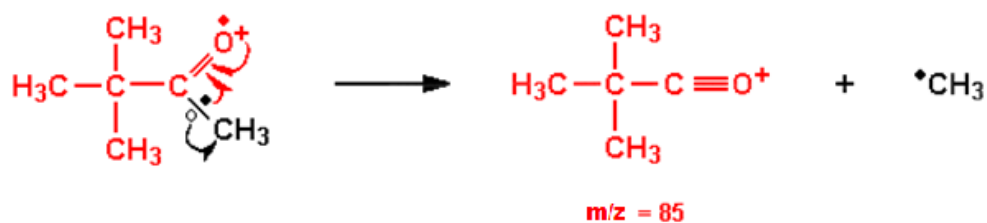
❖ Clivage α



Ce qui donne dans le cas de la cétone dont le spectre de masse apparaît sur la figure 10:



et dans une moindre mesure :



Le pic à $m/z = 57$ correspond au fragment qui est un carbocation très stable.

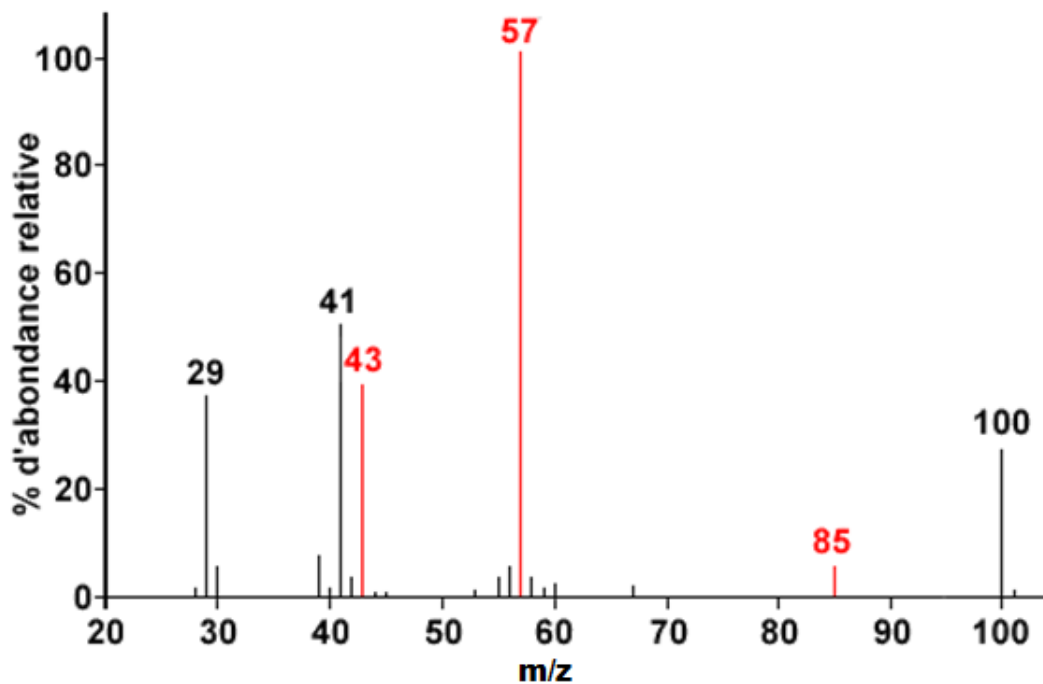
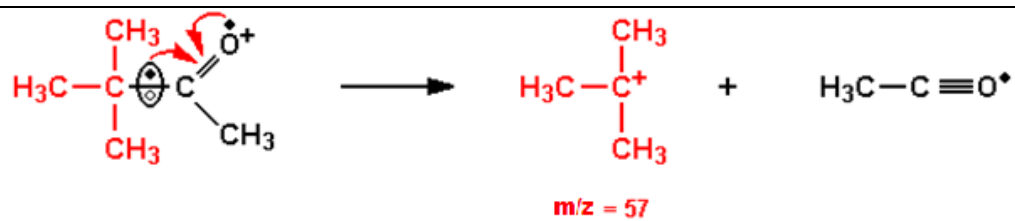
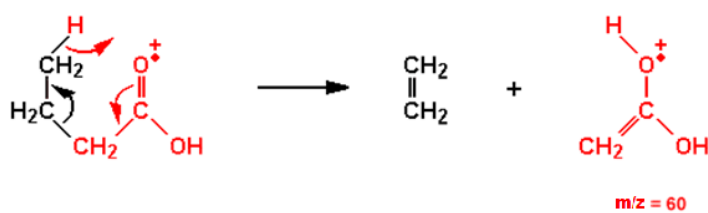


Fig.10 : Spectre de masse de la 3,3-diméthyl-2-butanone $\text{CH}_3\text{COC}(\text{CH}_3)_3$ dont la masse molaire = 100 g/mol.

V.4.2.9. Les acides

Réarrangement de type McLafferty chez l'acide butanoïque



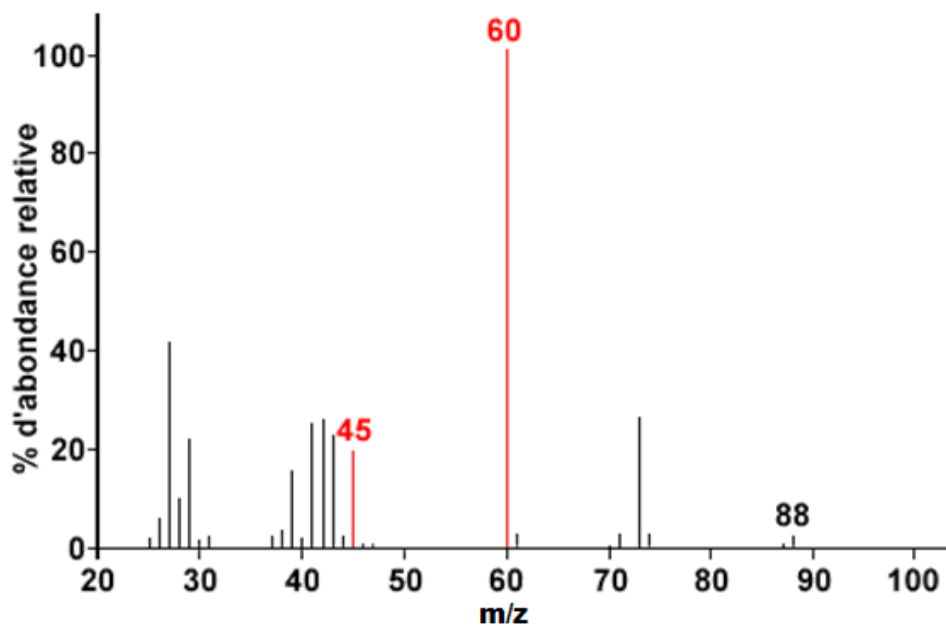
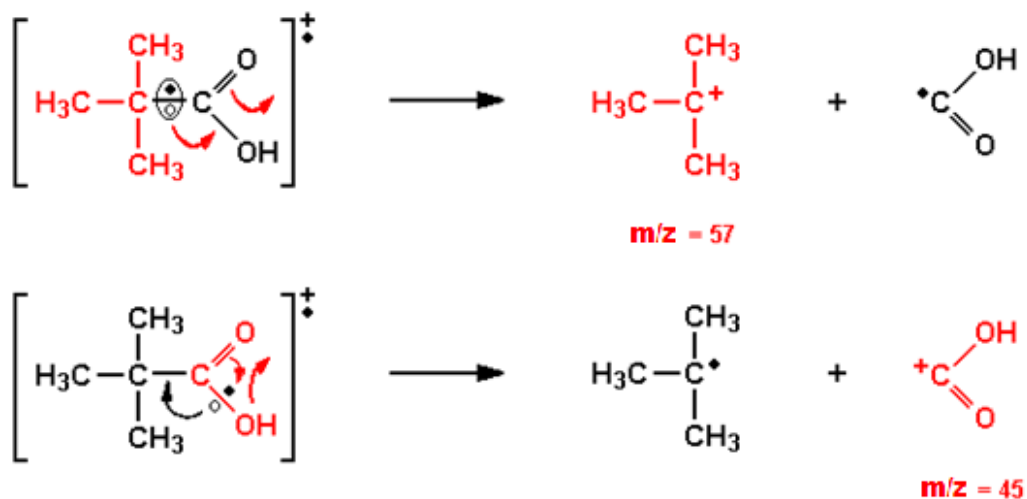


Fig. 11 : Spectre de masse de l'acide butanoïque $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ de masse molaire = 88 g/mol.

Fragmentation de façon à donner des carbocations très stables à $m/z = 45$ et $m/e = 57$ dans le cas de l'acide 2,2-diméthylpropanoïque. Dans la ligne du bas de ces équations il y a rupture en α de la fonction acide ($m/z = 45$).



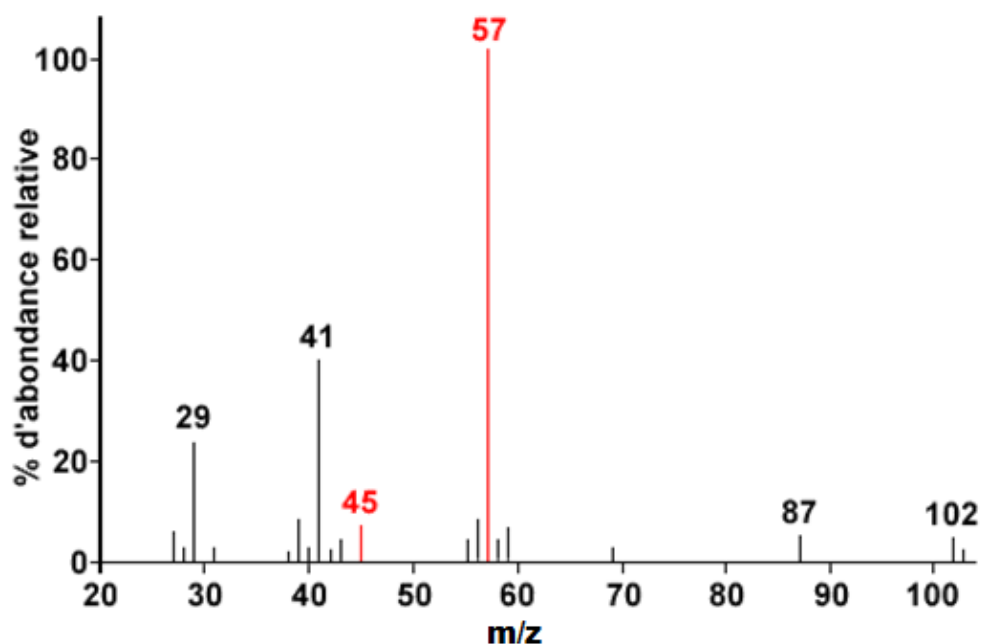


Fig.12 : Spectres de masse de l'acide 2,2-diméthylpropanoïque $(\text{CH}_3)_3\text{CCOOH}$ de masse molaire = 102 g/mol.

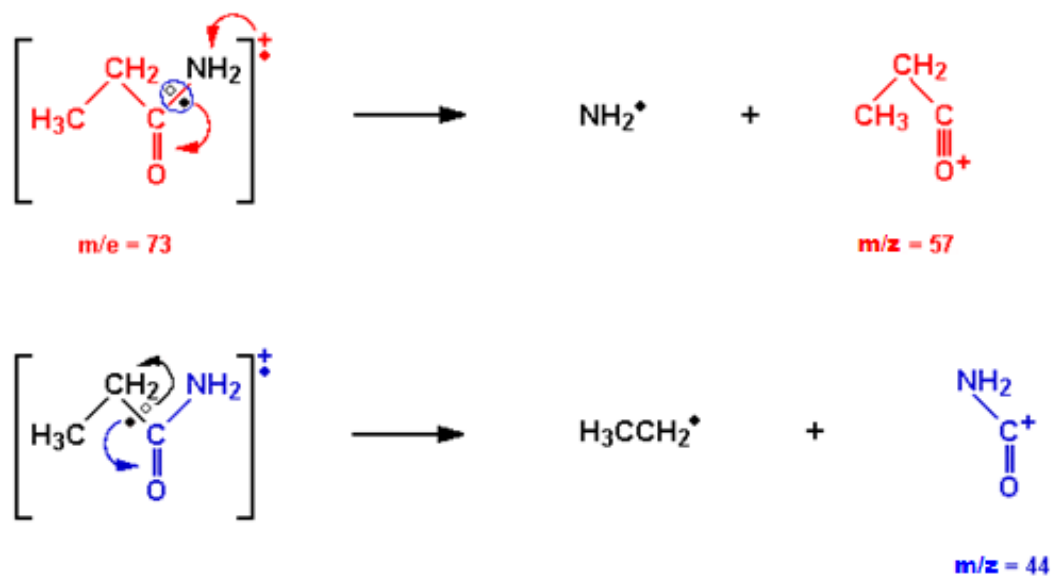
V.4.2.10. Les amides

a. Le propanamide

L'ion moléculaire est habituellement observable et fournit une bonne indication de la présence d'un amide.

Un patron important de fragmentation implique la rupture de la liaison en α (rupture d'une ou de l'autre vers la liaison double $\text{C}=\text{O}$).

Les fragments importants sont:



Le réarrangement McLafferty peut impliquer les fonctions amides du côté chaîne alcoyle.

Voici ce réarrangement :

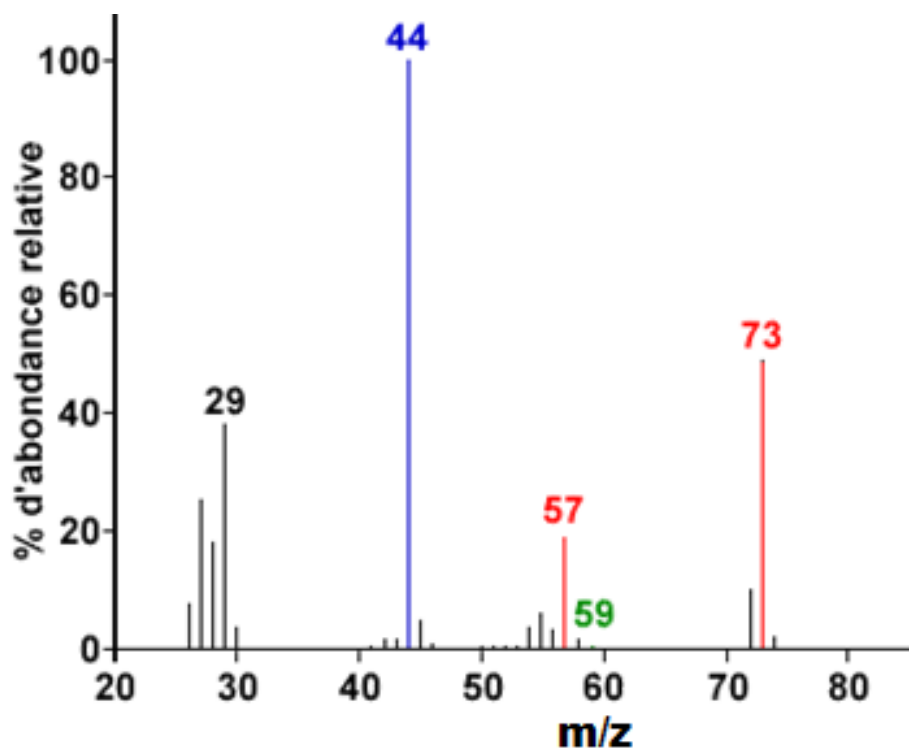
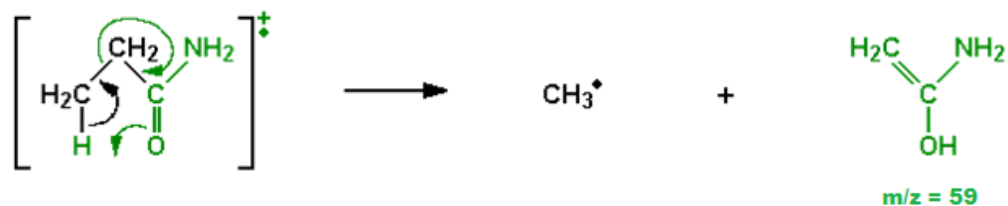


Fig. 13 : Spectre de masse du propanamide $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CONH}_2$ dont $M = 73$ g/mol.

b. Le benzamide

Différents types d'ions sont produits dans le processus d'ionisation. Le fait de ne perdre qu'un électron fait retrouver la présence de la molécule dans son entier, surtout si la molécule est stable comme un aromatique.

Les fragments importants sont :

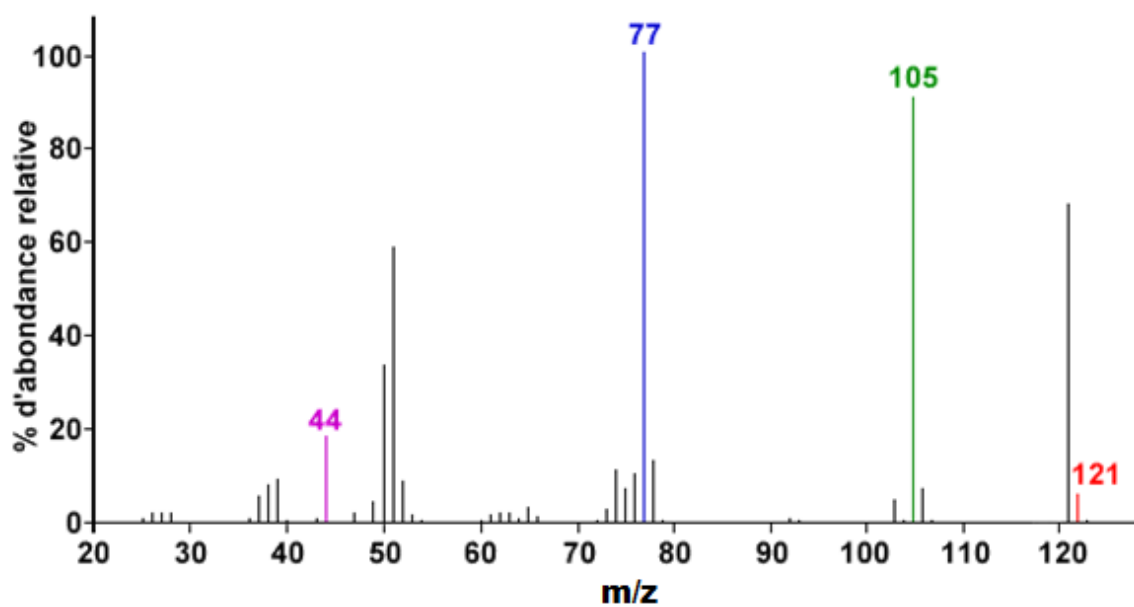
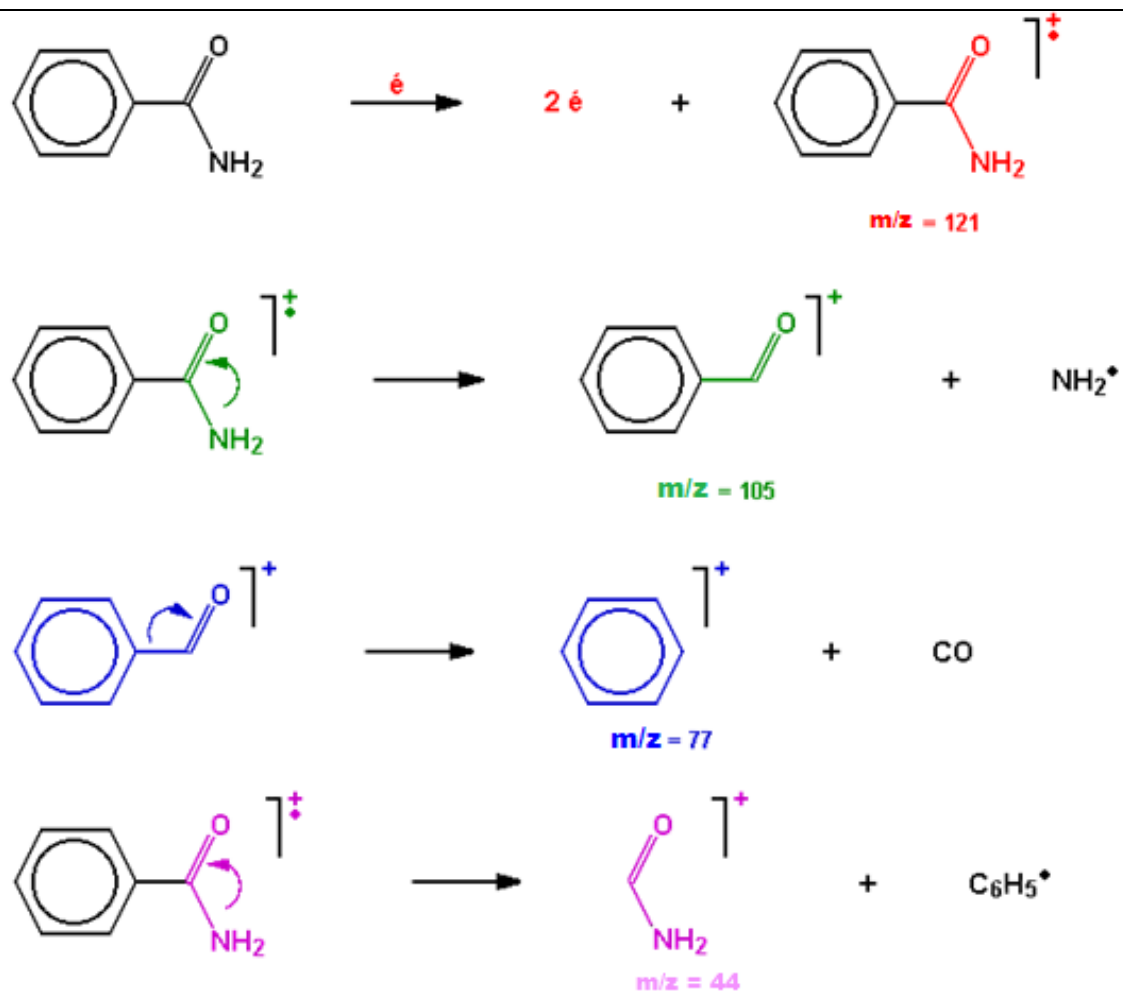


Fig. 14: Spectre de masse du benzamide ArCONH₂ dont M = 121 g/mol.

VI. APPAREILLAGE

Un spectromètre de masse doit permettre de réaliser les trois premières au moins des opérations suivantes:

- ✓ Formation des ions
- ✓ Séparation des ions
- ✓ Détection des ions : Aide à l'interprétation des spectres

VI.1. Techniques d'ionisation

Le grand nombre de méthodes d'ionisation, certaines étant très spécialisées, exclut une étude exhaustive. Les plus courantes, sont la phase gazeuse, la désorption et l'évaporation et sont décrites ci-dessous.

VI.1.1 Techniques d'ionisation en phase gazeuse

Les techniques de génération d'ions en phase gazeuse pour la spectrométrie de masse sont les plus anciennes et les plus populaires auprès des chimistes organiciens.

VI.1.1.1 Ionisation par impact électronique (IE) est historiquement la technique de production d'ions la plus répandue en spectrométrie de masse. C'est également celle sur laquelle se focalise l'interprétation des spectres de masse à des fins de détermination de structure. Des molécules en phase vapeur, de l'échantillon, sont bombardées par des électrons très énergétiques (généralement 70 eV), qui ont pour fonction d'éjecter un électron d'une molécule de l'échantillon en produisant un radical cation, nommé ion moléculaire. De plus, ce procédé de fragmentation étant en partie prédictible, il est à la base de la puissance de la spectrométrie de masse dans l'élucidation de structure. Les bases de données **IE** facilement accessibles contiennent les spectres IE de plus de 400000 composés et disposent de moteurs de recherche efficaces.

VI.1.1.2 Ionisation chimique (IC) un gaz réactif (habituellement le méthane, l'isobutane, l'ammoniac ou autres) est introduit dans la source d'ionisation et ionisé. Les molécules de l'échantillon entrent en collision avec les molécules ionisées du gaz réactif ($C_2H_5^+$, $C_4H_9^+$, etc.) dans la source IC où la pression est relativement élevée pour conduire à une ionisation secondaire (c.-à-d. une ionisation chimique) par transfert de proton en produisant un ion $[M + 1]^+$, par addition électrophile en produisant des ions $[M + 15]^+$, $[M + 29]^+$, $[M + 41]^+$ ou $[M + 18]^+$ (avec les ions NH_4^+) ou (plus rarement) par transfert de charge en produisant un ion $[M]^+$. Les spectres d'ionisation chimique présentent parfois des pics d'ion $[M - 1]^+$ résultants de l'abstraction d'un hydrure. L'ionisation est suffisamment faible, généralement inférieur à 5 eV, si bien que la fragmentation est grandement réduite.

Exemple : le spectre de masse IE de la 3,4-diméthoxyacétophénone (**Fig.15**) montre, en plus du pic de l'ion moléculaire à m/z 180, de nombreux pics de fragments dans la plage m/z 15 – 167; parmi ceux-ci on trouve le pic de base à m/z 165 et des pics remarquables à m/z 77 et 137. Dans le spectre de masse IC (gaz réactif méthane, CH_4), le pic de base (100 %) est l'ion quasi-moléculaire ($[\text{M} + 1]^+$, m/z 181) et les seuls autres pics, chacun de faible intensité, sont issus de l'ion moléculaire, à m/z 180, 209 ($[\text{M} + 29]^+$ ou $\text{M} + \text{C}_2\text{H}_5^+$) et 221 ($[\text{M} + 41]^+$ ou $\text{M} + \text{C}_3\text{H}_5^+$). Ces deux derniers, résultant de l'addition électrophile de carbocations, sont particulièrement utiles à l'identification de l'ion moléculaire. Le gaz vecteur, méthane en excès, est ionisé lors de l'impact électronique pour former les ions CH_4^+ et CH_3^+ , qui réagissent avec l'excès de méthane pour donner des ions secondaires.

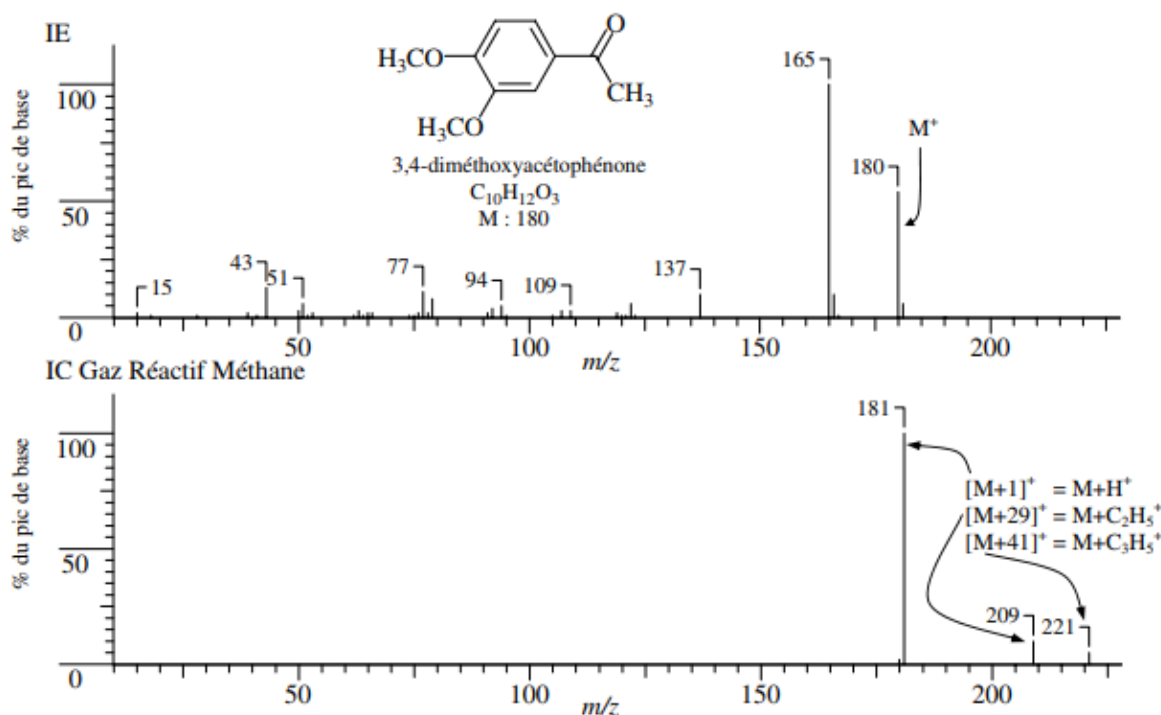
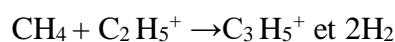
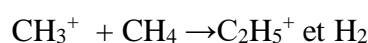


Fig.15 : Spectres IE et IC de la 3,4-diméthoxyacétophénone.

VI.1.2. Techniques d'ionisation par désorption

Les molécules à étudier passent directement d'une phase condensée (matrice) à la phase vapeur sous forme d'ions. Ces techniques sont principalement utilisées dans le cas de composés lourds, non-volatils ou ioniques. Souvent l'information retirée est limitée. Pour des composés inconnus, ces techniques servent principalement à fournir la masse moléculaire et parfois une masse exacte. Il en résulte souvent des spectres compliqués par de nombreux ions provenant de la matrice.

VI.1.2.1 Ionisation par désorption de champ(FD)

L'échantillon est placé sur un émetteur métallique disposant de micro-aiguilles de carbone. Les micro-aiguilles activent la surface qui est soumise à une tension d'accélération et tient le rôle d'anode. Les gradients de très haute tension à l'extrémité des aiguilles arrachent un électron à l'échantillon et le cation formé est expulsé de l'émetteur. Les ions générés ont très peu d'énergie excédentaire et se fragmentent donc peu ; l'ion moléculaire est habituellement le seul observé en quantité significative. Par exemple, aucun ion moléculaire n'est observé par IE ou IC pour le cholest-5-ène-3,16,22,26-tétrol. Alors que le spectre de masse FD (**Fig.16**) montre principalement l'ion moléculaire et pour ainsi dire aucune fragmentation.

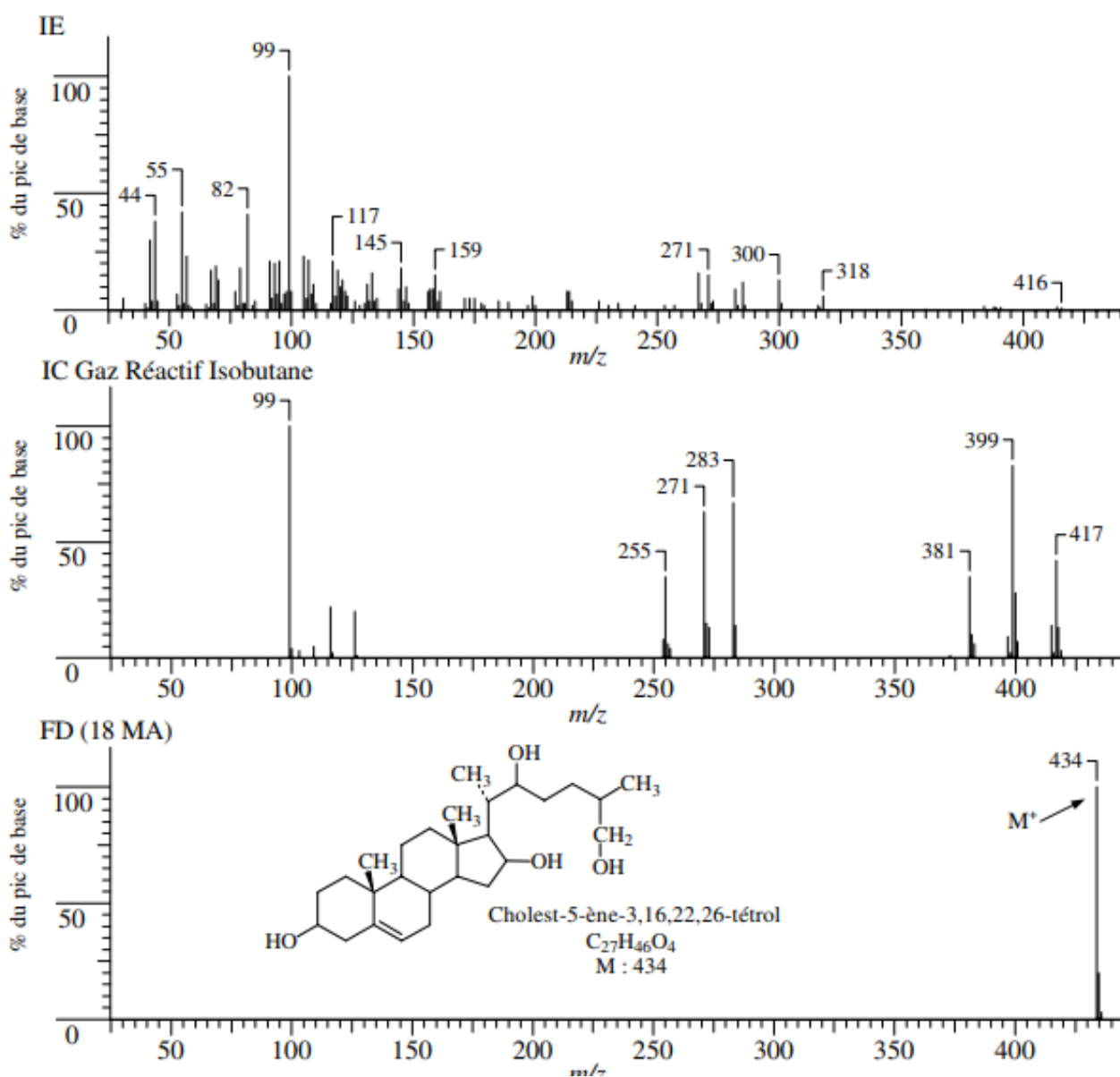


Fig.16 : Spectres de masse du cholest-5-ène-3,16,22,26-tétrol en impact électronique (IE), ionisation chimique (IC) et désorption de champ (FD).

VI.1.2.2 Ionisation par bombardement d'atomes rapides(FAB)

Met en jeu des atomes de xénon ou d'argon très énergétiques (6 à 10 keV) pour bombarder des échantillons dissous dans un liquide de faible tension de vapeur (ex: glycérol). Cette matrice protège l'échantillon des dommages excessifs dus aux radiations. Une méthode similaire, la spectrométrie de masse par ionisation secondaire liquide, **LSIMS**, met en jeu des ions de césium encore plus énergétiques (10 à 30 keV). Ces deux techniques produisent des ions positifs (par captation de cation $[M + 1]^+$ ou $[M + 23, Na]^+$) et des ions négatifs (par déprotonation $[M - 1]^-$). Le FAB est le plus souvent équipé d'un instrument à secteur magnétique à double focalisation; il peut cependant être couplé à la plupart des analyseurs.

VI.1.2.3 Désorption-ionisation par plasma

C'est une technique très spécialisée presque exclusivement employée avec un analyseur à temps de vol (TOF). Les produits de fission du californium 252 (^{252}Cf), sont utilisés pour bombarder et ioniser l'échantillon. L'appareil doit être (TOF-SM).

VI.1.2.4 Désorption-ionisation laser

Un faisceau laser pulsé peut être utilisé en spectrométrie de masse pour l'ionisation d'échantillon. Comme la méthode d'ionisation est pulsée, elle doit être employée avec un spectromètre de masse soit TOF, soit à transformée de Fourier.

La technique est bien plus puissante assistée d'une matrice (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, ou **MALDI**). Deux matériaux de matrice, l'acide gentisique et l'acide sinapinique, dont les bandes d'adsorption coïncident avec le laser utilisé, sont couramment employés. Des échantillons de masses moléculaires allant jusqu'à deux-cent mille à trois-cent mille Da ont été analysés avec succès. Quelques pico-moles d'échantillon sont mélangées à la matrice avant d'être irradiées par une impulsion, qui provoque l'éjection d'ions. Le MALDI est le plus souvent utilisé avec un TOF-MS ou un spectromètre de masse à transformée de Fourier (FT-MS).

VI.1.3. Techniques d'ionisation par évaporation

Couplées à un appareillage de chromatographie liquide, ces méthodes sont devenues extrêmement populaires.

VI.1.3.1 Spectrométrie de masse thermospray

L'échantillon est introduit en solution dans le spectromètre de masse au moyen d'un tube capillaire chauffé. Le tube nébulise et évapore partiellement le solvant pour former un courant de fines gouttelettes introduites dans la source d'ions. Lorsque le solvant est totalement évaporé, les ions peuvent être analysés.

VI.1.3.2 Spectrométrie de masse par électrospray (ES)

L'échantillon en solution (habituellement dans un solvant polaire volatil) pénètre la source d'ions via un capillaire en acier inoxydable entouré d'un flux coaxial d'azote, appelé gaz nébuliseur. L'extrémité du capillaire est maintenue à une tension élevée par rapport à une contre électrode. La différence de potentiel produit un gradient de champ pouvant aller jusqu'à 5 kV/cm. Un aérosol de gouttelettes chargées se forme lorsque la solution quitte le capillaire. Le flux de gaz nébuliseur dirige les effluents vers le spectromètre de masse (**fig.17**).

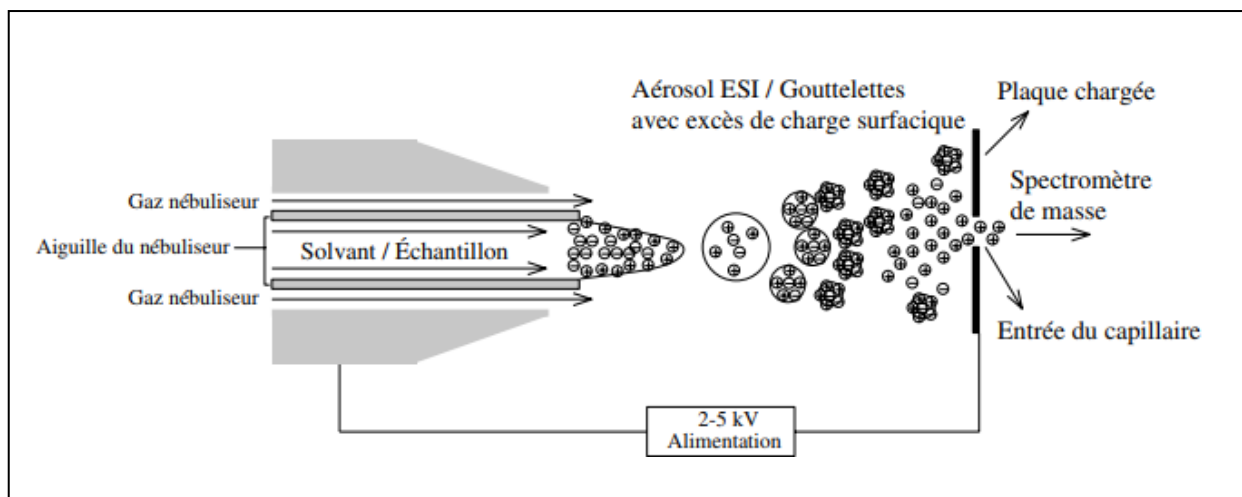


Fig.17 : Schéma montrant l'évaporation conduisant aux ions isolés dans un appareil à électrospray.

La figure 18 compare les spectres de masse IE et ES du lactose. Le spectre IE est absolument inexploitable car le lactose est peu volatil et thermiquement labile ; le spectre ne montre aucun pic caractéristique. Le spectre ES montre un pic moléculaire de faible intensité à m/z 342 et un pic à $[M + 23]^+$ caractéristique de l'ion moléculaire plus sodium. Le spectre ES d'un tétra-peptide composé de valine, glycine, sérine et acide glutamique (VGSE) est présenté à la figure 19. Le VGSE: Le pic de base est l'ion $[M + 1]^+$ à m/z 391 et l'intensité de l'adduit de sodium, $[M + 23]^+$ est de presque 90 % de celle-là. De plus, on accède à des informations utiles sur la fragmentation, caractéristique de chacun des acides aminés. Pour des petits peptides, il n'est pas rare d'avoir une fragmentation intéressante mais cela est moins vrai pour les protéines. Les méthodes d'ionisation sont récapitulées dans le tableau 2.

Tableau 2. Résumé des techniques d'ionisation.

Technique d'ionisation	Ions formés	Sensibilité	Avantages	Inconvénients
Impact électronique (IE)	M ⁺	ng – pg	Possibilité de recherche dans des bases de données	M ⁺ parfois absent
Ionisation chimique (IC)	M + 1, M + 18, etc.	ng – pg	Informations structurales	Peu d'informations structurales
Désorption de champ (FD)	M ⁺	µg – ng	M ⁺ généralement présent	Équipement spécialisé
Bombardement d'atomes rapides (FAB)	M + 1, M + cation, M + matrice	µg – ng	Composés non volatils	Interférence avec la matrice
Désorption plasma	M ⁺	µg – ng	Informations sur le séquençage	Difficulté d'interprétation
Désorption laser (LD / MALDI)	M + 1, M + matrice	µg – ng	Composés non volatils	Interférence avec la matrice
Thermospray	M ⁺	µg – ng	Composés non volatils	Dépassé
Électrospray (ES)	M ⁺ , M ²⁺ , M ³⁺ , etc.	ng – pg	Composés non volatils	Classes de composés limitées
			Interface possible avec CL phase aqueuse	Peu d'informations structurales
			Forme des ions poly-chargés	

VI.2. Analyseurs de masse

L'analyseur, qui sépare le mélange d'ions généré à l'étape d'ionisation par ordre de m/z afin d'obtenir un spectre, est le cœur du spectromètre. Il en existe différents types qui ont chacun leurs propres caractéristiques.

VI.2.1. Spectromètres de masse à secteur magnétique

Un champ magnétique dévie circulairement la trajectoire des ions (Fig.20). La séparation des ions est fondée sur le rapport m/z; les ions les plus légers étant plus déviés que les ions les plus lourds, selon l'équation :

$$m/z = B^2 r^2 / 2V$$

D'où

B : champ magnétique

z : charge de l'ion

v : vitesse de l'ion

m : masse de l'ion

r : rayon de l'ion

Puisque le rayon de l'instrument est fixe, le champ magnétique est balayé pour focaliser successivement les ions de m/z différents.

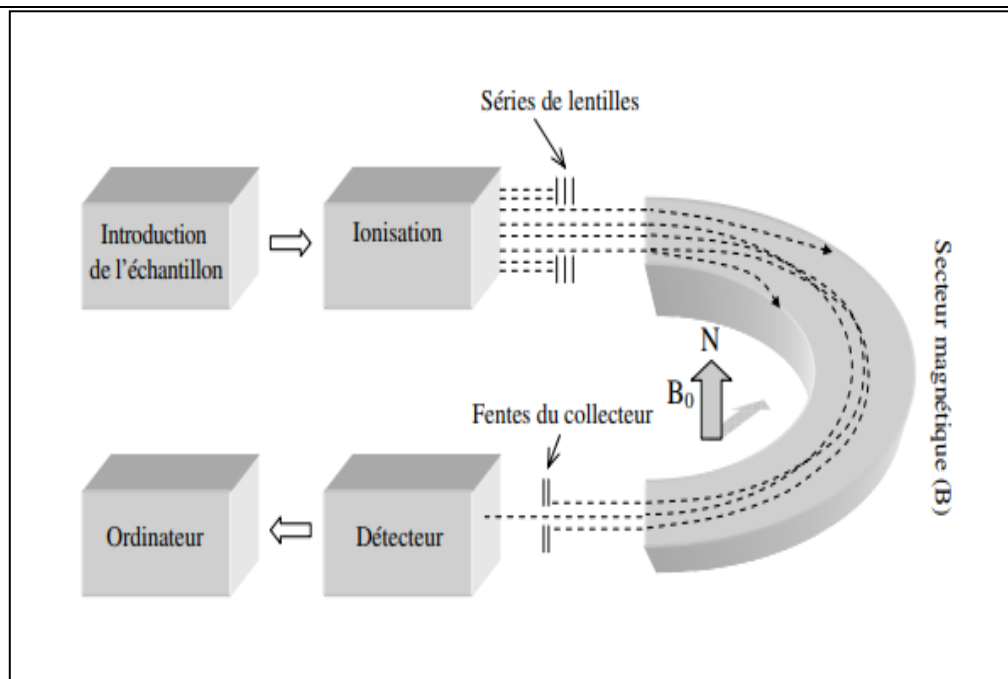


Fig.20 : Diagramme schématisé d'un analyseur à secteur 180° et focalisation simple. Le champ magnétique (B_0) est perpendiculaire à la page. Le rayon de courbure varie d'un instrument à l'autre.

IV.2.2. Spectromètres de masse quadripolaires

L'analyseur quadripolaire (parfois abrégé en (QMF) pour filtre de masse quadripolaire), également appelé quadripôle de transmission, est beaucoup moins encombrant et onéreux qu'un appareil à secteur magnétique. Un quadripôle (schématisé à la **figure 21**) se compose de quatre barreaux (de 100 à 200 mm de long) cylindriques (ou de section hyperbolique) parallèles entre eux, placés aux sommets d'un carré. Une analyse mathématique complète du quadripôle est complexe mais son fonctionnement peut être décrit en termes simples. Cet analyseur de masse non magnétique emploie une tension continue, modifiée par une tension radiofréquence, appliquée aux barreaux. Les ions sont introduits à une extrémité du «tunnel» formé par les quatre barreaux, au centre du carré et se déplacent le long de son axe. Pour chaque combinaison de tension continue et de modulation à la fréquence appropriée (toujours selon un rapport constant), seuls les ions d'un m/z donné ont une trajectoire stable et donc traversent le quadripôle pour atteindre le détecteur. Tous les ions de m/z différents ont des trajectoires instables ou erratiques et percutent un des barreaux ou sortent du quadripôle. On peut se représenter facilement le quadripôle comme un filtre de masse réglable. En d'autres termes, tous les ions entrent d'un côté mais seuls les ions d'un m/z donné sortent de l'autre. En pratique, le filtrage peut être réalisé extrêmement rapidement, à tel point que l'intégralité de la gamme de masse peut être balayée en

moins d'une seconde. Les temps de balayage très rapides permettent le couplage du spectromètre de masse quadripolaire à un chromatographe en phase gazeuse.

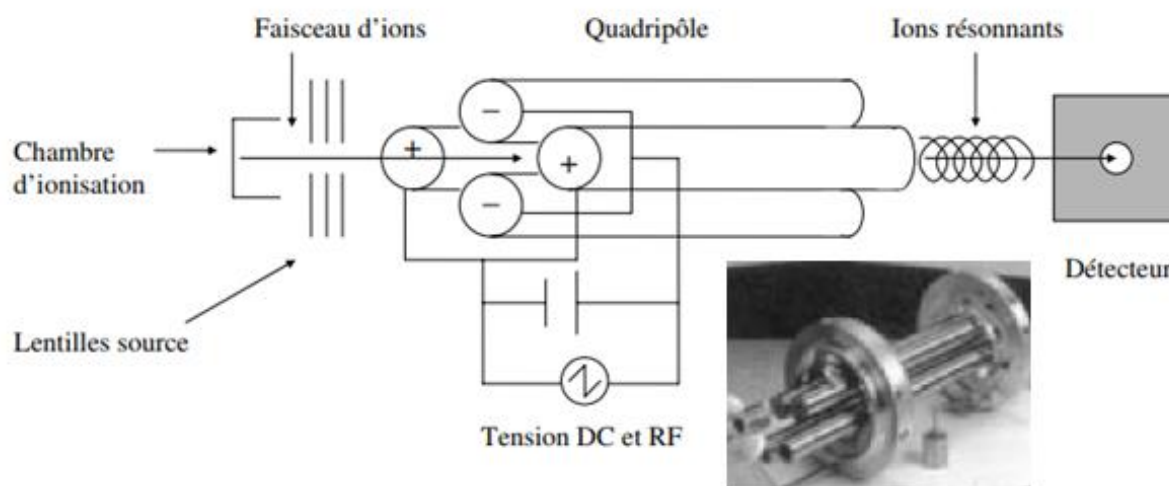


Fig.21 : Représentation schématique et photo d'un «filtre de masse» quadripôle ou séparateur d'ion.

VI.2.3. Spectromètre de masse à piège ionique

Également appelé piège ionique à quadripôle, est parfois considéré comme une variante du quadripôle. Le piège ionique « piège » littéralement des ions pendant une durée relativement longue, avec des conséquences importantes. Il se compose généralement de trois électrodes (d'où le nom de piège ionique quadripolaire 3D, ou QIT 3D qui lui est souvent donné), l'une annulaire de face interne hyperbolique et les deux autres (électrodes chapeaux d'entrée et de sortie), hyperboliques, aux extrémités (une vue en coupe d'un piège ionique est représentée sur la figure 22). L'électrode annulaire reçoit un champ radiofréquence sinusoïdal alors que les deux autres sont soumises à l'un des trois modes suivants. L'électrode chapeau peut être soumise au potentiel de masse, à une tension CA ou CC.

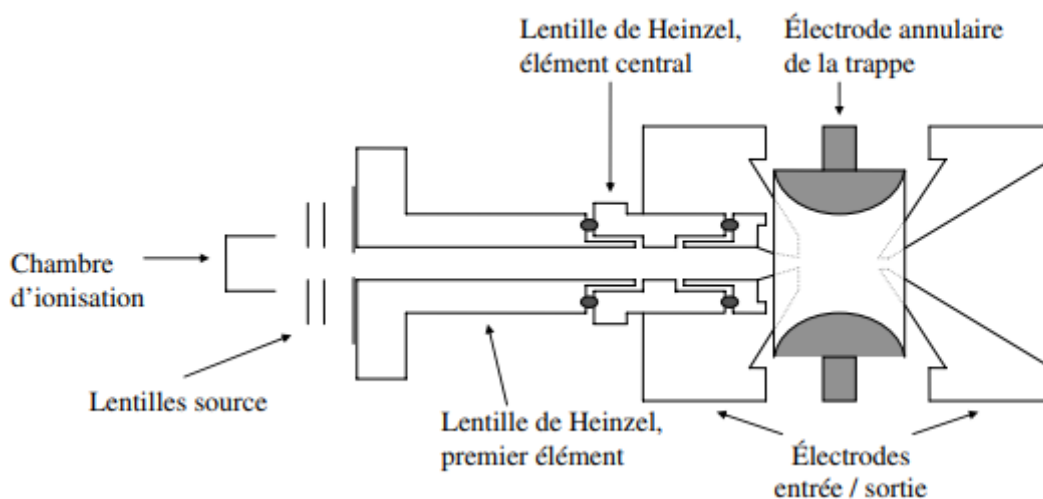


Fig.22 : Coupe d'une trappe ionique.

VI.2.4. Spectromètres de masse à temps de vol

Le concept de spectromètre de masse à temps de vol (TOF) est assez simple. Les ions sont accélérés par un potentiel (V), on les laisse ensuite «dériver» le long d'un tube jusqu'à un détecteur. le temps de vol d'un ion est donné par :

$$t = (L^2 m/2zeV)^{1/2}$$

D'où

L : longueur spectromètre

B : champ magnétique

z : charge de l'ion

v : vitesse de l'ion

m : masse de l'ion

e : charge de l'électron

r : rayon de l'ion

La nécessité de produire les ions à des positions et temps initiaux précisément connus. Ces contraintes limitent les spectromètres TOF à des techniques d'ionisation pulsées, dont la désorption laser et plasma (MALDI, Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice). La gamme de masse de ces instruments est illimitée et, comme pour les quadripôles. Cette technique est donc particulièrement adaptée aux grosses bio molécules.

VII. SPECTROMETRES DE MASSE EN TANDEM (MS/MS)

Pour obtenir des informations plus précises sur la structure des ions fragments issus de la décomposition des composés moléculaires introduits, on fait appel à des spectromètres de masse comportant au minimum deux analyseurs en série. Il ne s'agit pas de la mise bout à bout d'appareils distincts, mais de l'association dans un appareil hybride soit d'un secteur magnétique suivi d'un quadripôle, soit de deux quadripôles, soit d'un TOF avec un second quadripôle (ou l'inverse). Entre les deux analyseurs est placée une chambre de collision. Il existe plusieurs façons d'utiliser de tels appareils.

- ✓ Une première technique consiste à sélectionner les ions correspondant à un rapport m/z choisi au moyen du premier analyseur qui joue ainsi le rôle d'un filtre. Ces ions traversent ensuite la chambre de collision dans laquelle il s'ensuit de nouvelles décompositions. Les ions fils de fragmentation poursuivent leur course vers le second analyseur, utilisé en mode normal, ce qui conduit à un spectre donnant des informations de structure de l'ion m/z sélectionné en amont, à l'exclusion des autres ions formés dans la source de l'appareil (recherche de filiations).
- ✓ Dans une autre technique on règle le second analyseur pour qu'il ne laisse passer que les ions d'un même rapport m/z et on fait un balayage des masses avec le premier analyseur. On repère ainsi tous les ions donnant le même fragment (recherche des parents).
- ✓ Enfin on peut faire un double balayage synchrone des deux analyseurs avec un décalage correspondant à une masse donnée (ex. un fragment neutre tel CO ou C₂H₂). On repère alors les ions de la source qui se décomposent en éliminant le fragment en question (recherche des neutres).

EXERCICES CORRIGES

Exercice 1 :

Dans le spectre d'un bromoalcane, il y a deux signaux d'intensité égale pour l'ion parent à $m/z = 136$ et 138 . Déduisez sa formule moléculaire.

Solution :

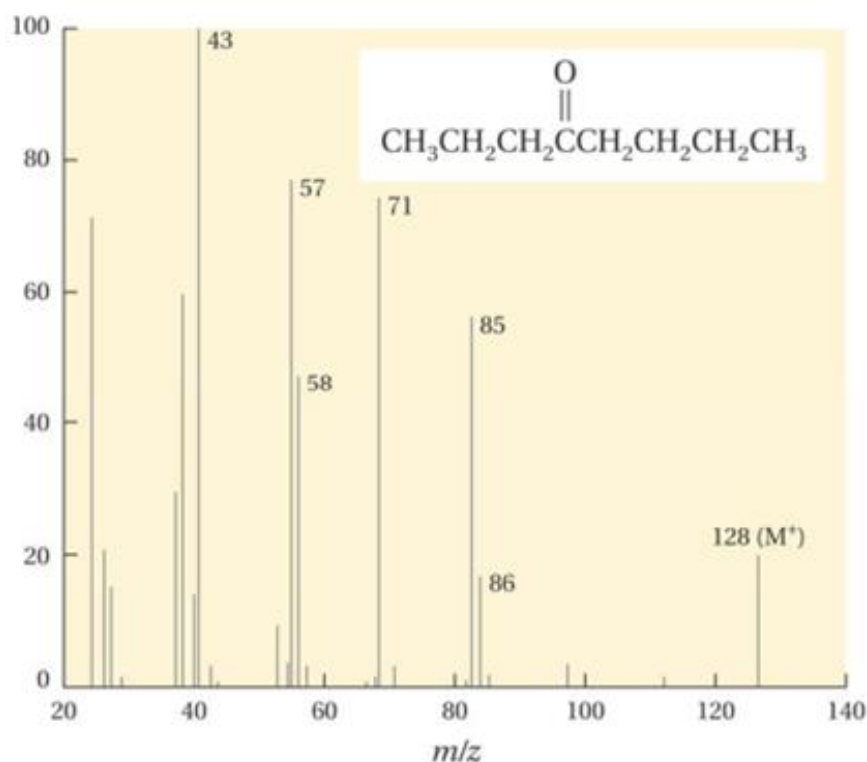
Un seul atome de Br peut être présent (la masse moléculaire n'est pas assez élevée pour correspondre à deux atomes de brome). Il faut faire l'opération $136 - 79$ (ou $138 - 81$) pour obtenir 57, le chiffre qui représente la masse des atomes de carbone et des atomes d'hydrogène. En divisant 57 par 12 (la masse du carbone), on obtient 4, et il reste 9, le chiffre qui représente la masse des atomes d'hydrogène. La formule est donc C_4H_9Br .

Exercice 2 :

Le signal le plus intense (appelé pic de base) de le spectre de masse apparaît à $m/z = 43$.

Expliquez sa provenance.

- Donnez le mécanisme d'obtention du fragment à $m/z = 57$.

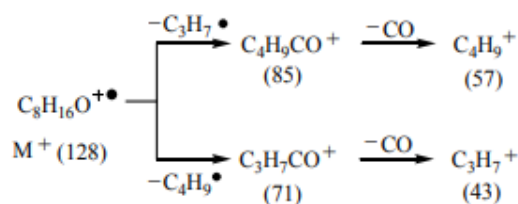


Spectre de masse de l'octan-4-one.

Solution :

Le signal correspond au m/z de $C_3H_7^+$, ce qui suggère que l'ion fille $C_3H_7CO^+$ perd un monoxyde de carbone pour donner $C_3H_7^+$. Cette explication est encore plus possible en

constatant que le spectre contient aussi un signal intense à $m/z = 57$ qui correspond à la structure dérivée d'un processus analogue appliqué à $C_4H_9CO^+$. Ces conclusions sont résumées dans le schéma suivant illustrant l'« arbre généalogique » des ions :



Exercice 3 :

Un alcane présente un signal de M^+ à $m/z = 114$. Quelle est sa formule moléculaire ? Quelle sera l'intensité relative des signaux 115/114 ?

Solution :

Les alcanes possèdent des formules moléculaires C_nH_{2n+2} . Pour tous les alcanes, il y a : n (masse atomique du C) + $(2n+2)$ (masse atomique de l'hydrogène) = m/z ratio des ions parents Pour l'alcane de cet exercice, on a : $n(12) + (2n+2)(1) = 114 \Rightarrow 14n = 112$ et $n = 8$ La formule de l'alcane est donc C_8H_{18} . L'intensité du signal à m/z 115 sera de $(1,1)(8)$, ou 9% de l'intensité du pic à m/z 114

Exercice 4 :

Un composé contenant uniquement des atomes de C, H et Cl donne des signaux de l'ion parent à $m/z = 74$ et 76 dans un rapport de 3:1. Proposez des structures possibles de ce composé.

Solution :

Tout d'abord, il y a la présence d'un seul atome de Cl. Il faut faire l'opération $74 - 35$ pour obtenir 39, la masse des atomes de carbone et des atomes d'hydrogène. En divisant 39 par 12 (la masse du carbone), on obtient 3, et il reste 3 (soit $39 - (3 \times 12)$), le chiffre qui représente la masse des atomes d'hydrogène. La formule est donc C_3H_3Cl . Cette molécule possède deux insaturations ou cycles, soit deux liaisons π ou une liaison π et un cycle. Les possibilités sont :

1. $HC \equiv CCH_2Cl_2$
2. $H_2C=C=CHCl_3$
3. $CH_3C \equiv CCl$
- 4.
- 5.



Exercice 5 :

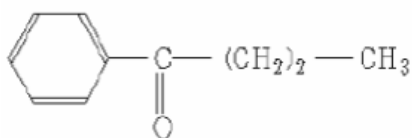
Dans le spectre d'un bromoalcane, il y a deux signaux d'intensité égale pour l'ion parent à $m/z = 136$ et 138 . Déduisez sa formule moléculaire.

Solution :

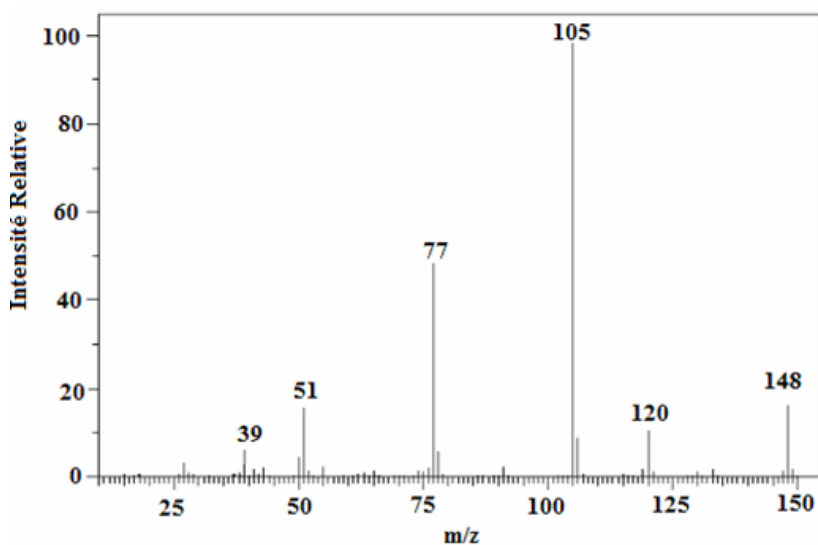
Un seul atome de Br peut être présent (la masse moléculaire n'est pas assez élevée pour correspondre à deux atomes de brome). Il faut faire l'opération $136 - 79$ (ou $138 - 81$) pour obtenir 57, le chiffre qui représente la masse des atomes de carbone et des atomes d'hydrogène. En divisant 57 par 12 (la masse du carbone), on obtient 4, et il reste 9, le chiffre qui représente la masse des atomes d'hydrogène. La formule est donc C_4H_9Br .

Exercice 6 :

L'étude spectroscopique (autre que SM) d'un composé (A) de formule brute $C_{10}H_{12}O$ à montrer avec doute que sa structure est :



À partir du spectre de masse du composé (A), pouvez-vous confirmer sa structure ? Expliquez (avec mécanismes de fragmentation).



Spectre de masse du composé A.

a. Donner les mécanismes de fragmentation des pics à $m/z = 77$, 105 et 120 , ic moléculaire : $m/z = 148$, Pic de base : $m/z = 105$

Solution :

C_7H_7NO : I = 5

Fragmentations : $148 - 120 = 28$: perte de C_2H_4 (éthylène) selon un réarrangement de Mc Lafferty car pour la molécule proposée, il y a un H en γ d'une insaturation.

148-105 = 43 : perte du groupement C₃H₇ selon un clivage en α de C=O.

77 ; 51 ; 39 : C₆H₅⁺; C₄H₃⁺; C₃H₃⁺: confirment le noyau benzénique monosubstitué.

Ces fragmentations sont compatibles avec la structure proposée.

Pic moléculaire : m / z = 121

Pic de base : m / z = 77

Le pic moléculaire correspond bien à la masse du composé étudié. De plus la masse impaire est compatible avec un nombre impair d'atomes trivalents (un azote).

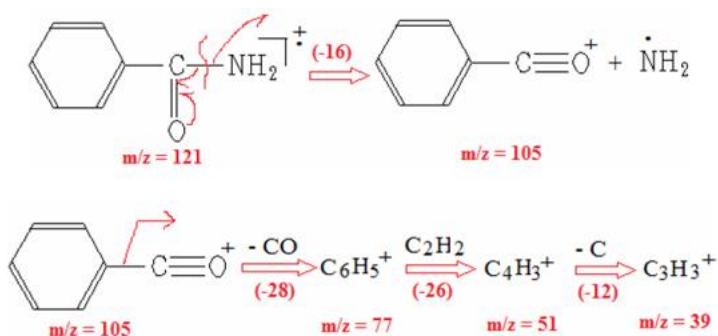
Fragmentations :

Pic à 77 : correspond au cation C₆H₅⁺ (fragmentation en α d'un noyau benzénique monosubstitué)

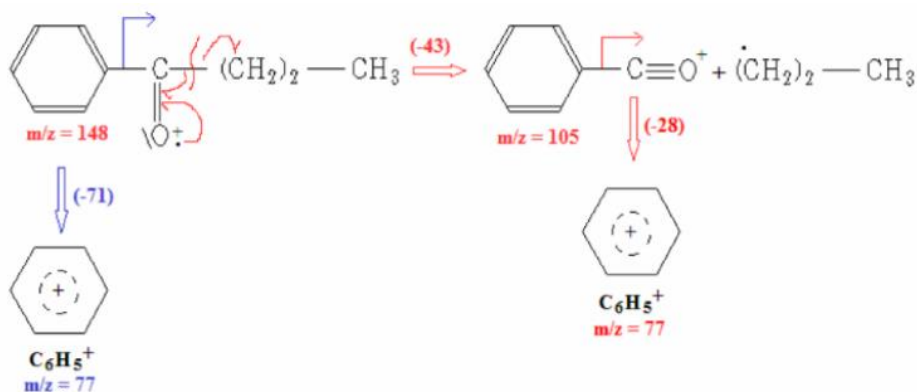
Pic à 51 : C₄H₃⁺ (perte de C₂H₂ à partir de l'ion C₆H₅⁺)

Pic à 39 : C₃H₃⁺ (perte de C à partir de l'ion C₄H₃⁺)

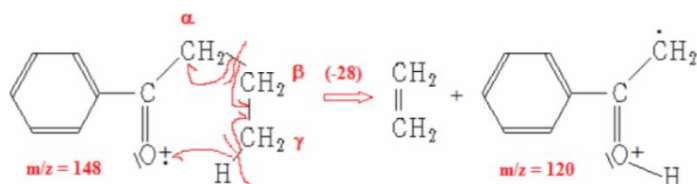
Toutes ces fragmentations sont compatibles avec le noyau benzénique monosubstitué.



Clivage en α de C=O :

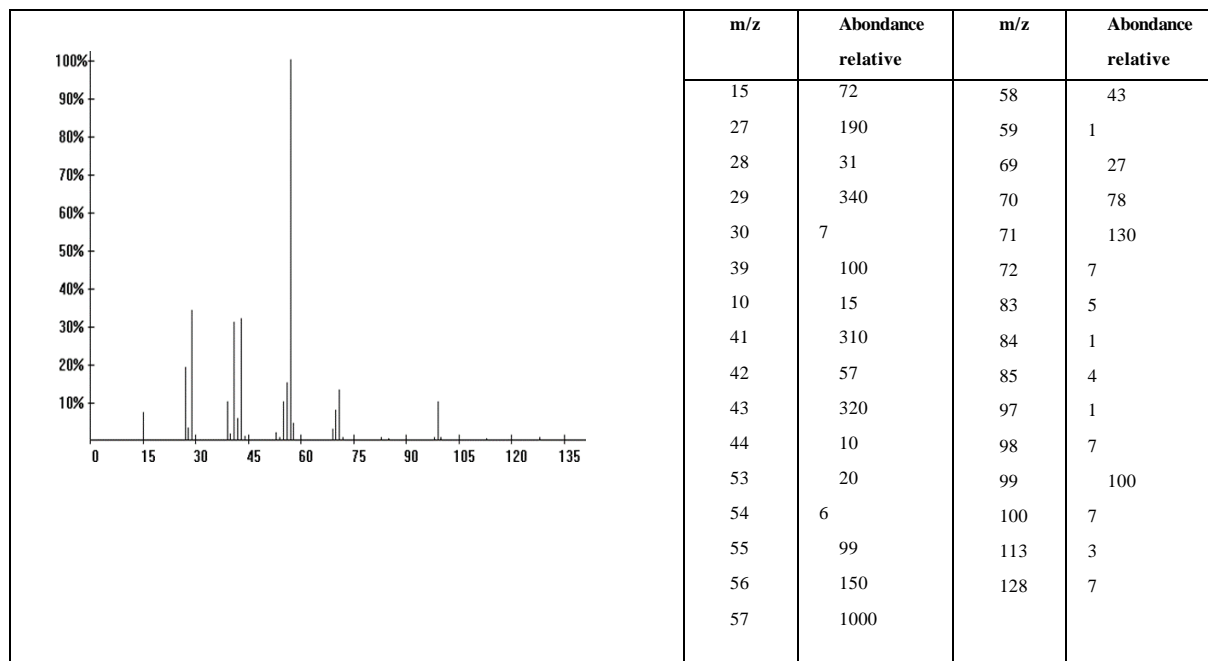


Réarrangement de MC Lafferty



Exercice 7 :

Le spectre suivant est celui d'un alcaneramifié. Ce spectre a été obtenu en bombardement électronique (EI) sur un appareil courant utilisé en laboratoire d'analyse, dont le filtre est de type "quadripôle". Cherchez à situer la ramification en fonction de l'allure du spectre et des abondances relatives de certains pics. Remarquez les similitudes et les différences avec un alcané linéaire.



Solution :

Le spectre étudié correspond-il à celui d'une molécule saturée ou insaturée ? Pic de base à $m/z=57$.

Le pic moléculaire est à $m/z=128$.

Recherche d'une éventuelle insaturation. C_nH_{2n+2}

$$\rightarrow n \times 12 + (2n+2) \times 1 = 128 \quad 12n + 2n = 128 - 2$$

$14n = 128 \rightarrow n = 126/14 = 9,0$. On est donc en présence du spectre d'un alcané.

Dans ce cas, il est difficile d'estimer le nombre de carbone par l'abondance relative du pic en M et en $M+1$, car celle de M est très faible (0,7%). En normalisant à 100% on ferait une erreur très importante sur la valeur de $M+1$ dont la valeur n'est connue qu'avec une précision de l'ordre de 0,1%.

En observant le spectre, on voit que le fragment correspondant à une chaîne de 6 atomes de C est quasi absent ($m/z = 85 : 0,4\%$), comparé à C_5 et C_7 . C'est dû au fait que la probabilité de fragmenter la molécule en union de cette structure sans réarrangement est très faible.

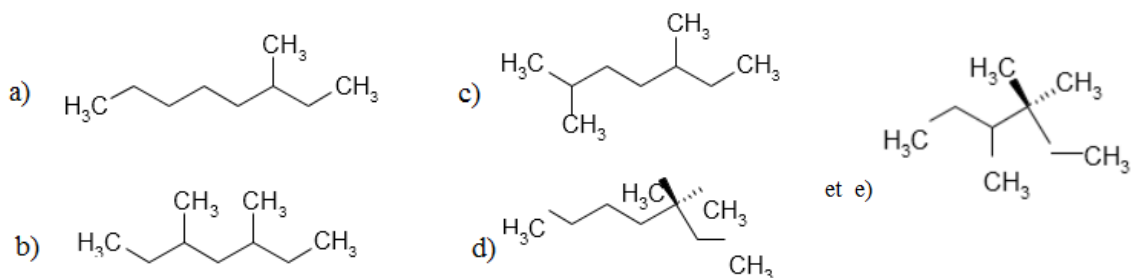
Si la molécule était linéaire, cette fragmentation serait possible.

Puisque l'intensité relative du pic de l'ion moléculaire est plus forte pour les composés à chaîne linéaire que pour les composés ramifiés et

leclivageestfavoriséauniveaud'atomesdecarbonesubstituéspardegroupesalkyles.

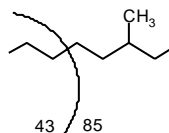
Récapitulons:lamoléculeestunalcanecomportant9atomesdeCetneprésentantpasdefragmenten6C.

La molécule pourrait être une des suivantes :



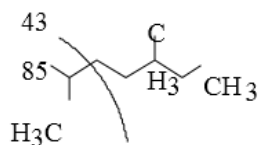
Lepicdebaseestà57etnon43.CequisignifiequelafragmentenC₃estdifficilementforméparunecassuresim
ple.

Reprenons chaque isomère. Molécule a)



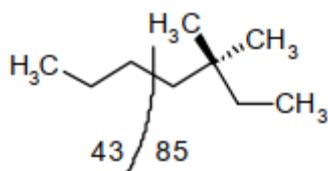
Elle présente une coupure possible de 6C, mais celle-ci est
peuprobable, car elle devrait présenter une coupure au niveau de la substitution avec un fragment principale
n4C ou/et 5C.

Molécule b)



Elle présente une coupure très probable de 6C, car elle devrait présenter une coupure au niveau
de substitution. Donc elle ne convient pas.

Molécule d)



Elle présente une coupure possible de 6C, mais celle-ci est peu probable, car d'après la règle n°3 elle
devrait présenter une coupure au niveau de la substitution avec un fragment principal en 4C ou/et 5C.

Il est difficile de choisir entre c) et e), il s'agit en fait de la molécule c) :

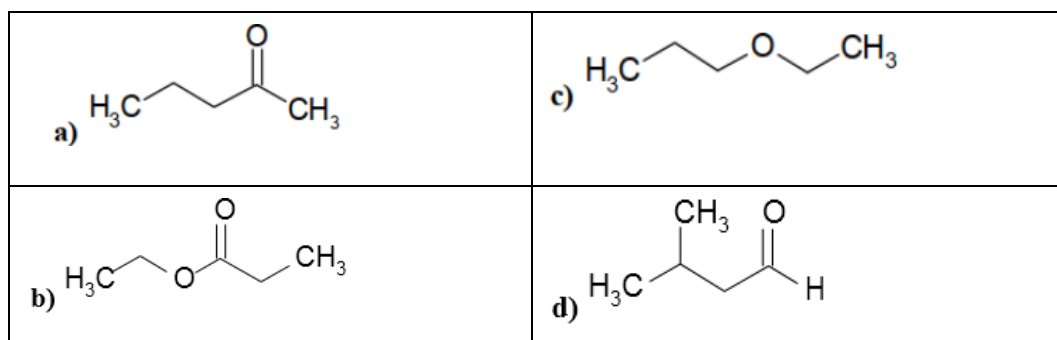
le 3,5 diméthylheptane.

Dans la bibliothèque NIST, les molécules a) b) c) d) une part et d) e) d) d'autre part ont des spectres de masses semblables.

Exercice 8 :

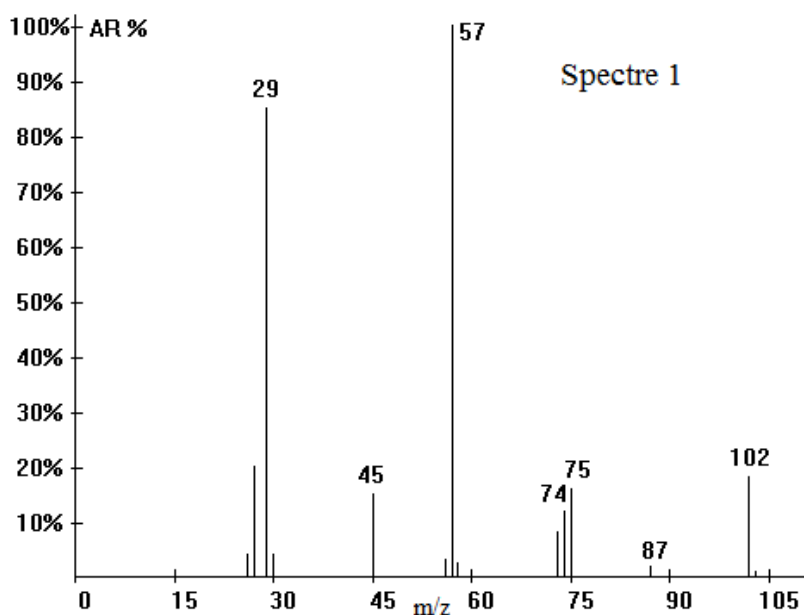
Parmi les molécules suivantes, quelles sont celles pour lesquelles on devrait voir un pic correspondant au réarrangement de McLafferty ?

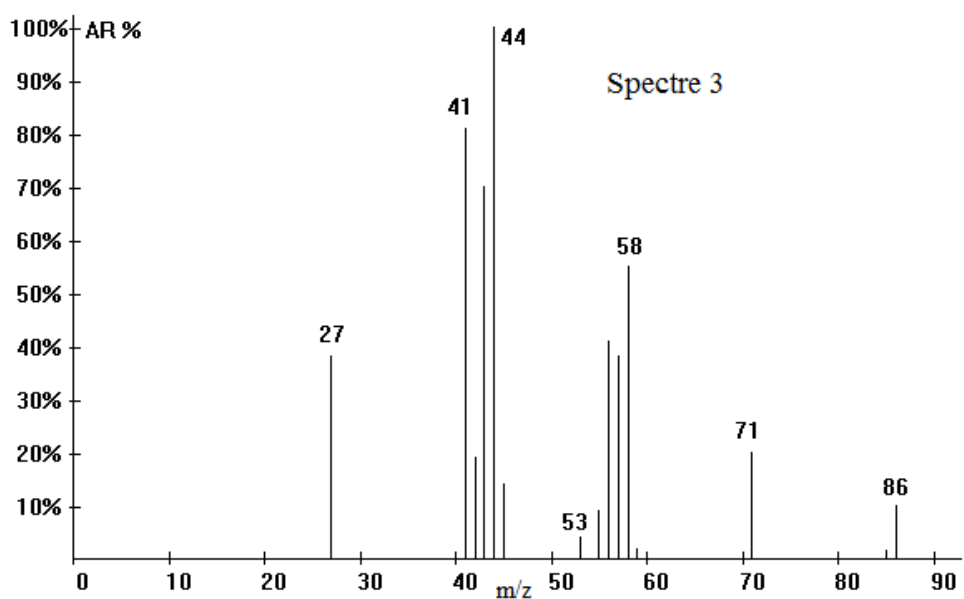
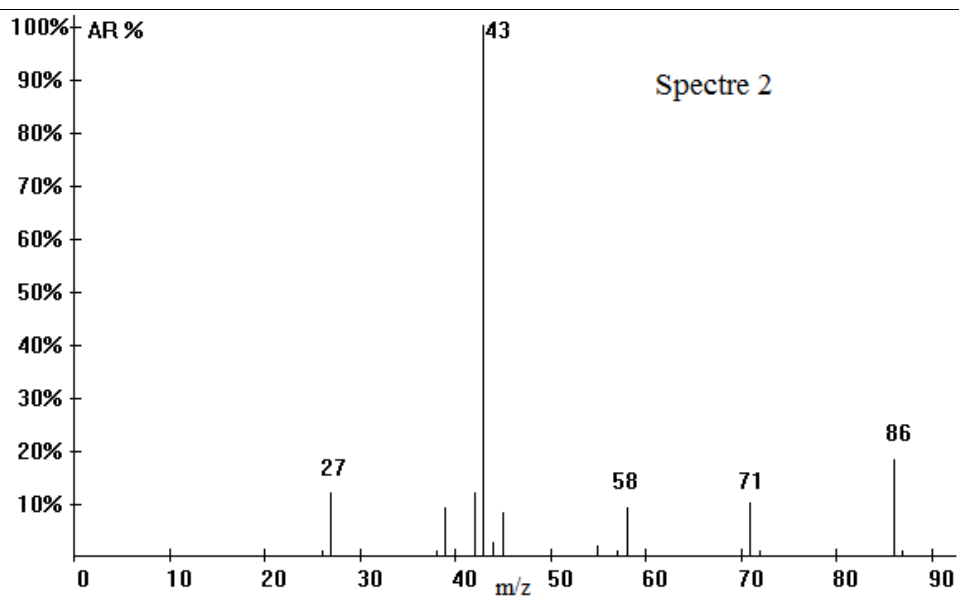
Donner la structure du fragment chargé et la valeur de m/z.



Voici les spectres correspondant à 3 des 4 molécules étudiées.

Attribuer chacun des spectres à la molécule qui convient.

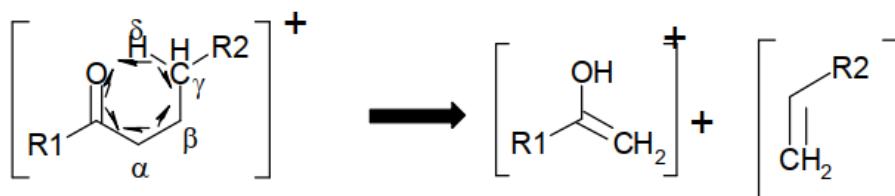




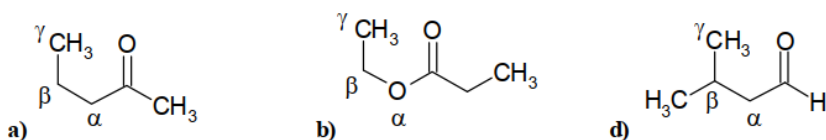
- Quelles sont les molécules pour lesquelles on devrait voir un pic correspondant au réarrangement de McLafferty?

Solution :

Le réarrangement de type RML est un transfert à six centres avec migration d'un atome de H. Pour que ce type de réarrangement puisse se produire, il faut un H sur un atome (C, N, O...) en γ (gamma) d'un groupement $>C=O$ ou $>C=C<$.

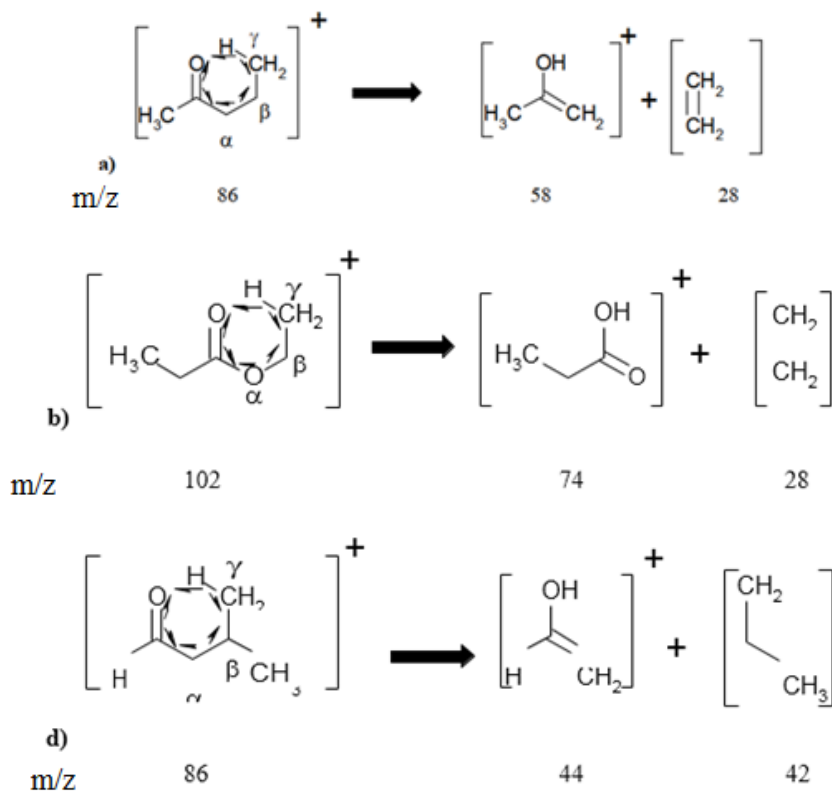


Après cassure, la charge peut aussi être portée sur l'autre fragment. Suivant l'électro-négativité des 2 fragments, ils peuvent être tous les 2 visibles sur le spectre avec des intensités relatives similaires ou très différentes.



Ces molécules ne comportent pas toutes un groupement $>C=O$. La molécule c'est un éther. a, b et d ont toutes un H sur le l'atome en γ (gamma) du groupement $>C=O$.

A priori, seules ces 3 molécules sont susceptibles de se fragmenter avec un Réarrangement de Mc Lafferty, mais pas la molécule c.



Spectre 1

Le fragment le plus lourd du Spectre 1 a une valeur de m/e de 102. Ce spectre correspond probablement à la molécule b.

Confirmons en recherchant d'autres fragments.

57 \rightarrow M-45 correspondant à la perte de CH_3CH_2O . De plus le fragment de 45 est visible sur le

spectre.

29 → M-73 correspond à CH_3CH^+ .

Le fragment à $m/z = 74$ correspond à un de ceux provenant du Réarrangement de Mc Lafferty. Il n'est pas très intense. Ce n'est donc pas une cassure très probable. L'autre fragment qui devrait être neutre (l'éthène) semble céder un H plus facilement ($\text{C}_2\text{H}_3\bullet$) pour donner un fragment à $m/z = 75$ et non pas 74.

Spectre 2 et Spectre 3

Il reste à attribuer un des 2 spectres à l'une des 2 molécules.

Les fragments les plus lourds du Spectre 2 et du Spectre 3 ont une valeur de m/z de 86.

Ces spectres correspondent soit à la molécule a soit à la molécule d.

La molécule d est susceptible de former par un Réarrangement de Mc Lafferty des fragments de masse 44 et 42. Ils sont tous 2 présents dans le Spectre 25 mais en très faible intensité, surtout 44 qui correspondent probablement à l'abondance isotopique du pic de 43 plutôt qu'à un pic de réarrangement. Par contre, le fragment en 44 est le pic de base dans le Spectre 3. Les règles de fragmentations ne nous aident pas beaucoup. La molécule d présente une fonction aldéhyde HC=O^\bullet qui favorise le clivage de la liaison C-C située en α par rapport à la double liaison, soit à $m/z = 29$ soit à M-29 ($86 - 29 = 57$). 57 est présent dans le Spectre 26.

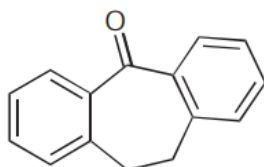
La molécule d correspond probablement au Spectre 3.

La molécule a présente une fonction méthyl-cétone $\text{CH}_3\text{C=O}^\bullet$ qui favorise la formation d'un fragment à $m/e = 43$. Cette molécule est susceptible de former par un Réarrangement de Mc Lafferty des fragments de masse 58 et 28. 58 est présent dans les 2 spectres, avec une plus grande abondance dans le Spectre 3. Le pic à 28 est absent dans les 2 spectres. A cause du fragment 43, la molécule a correspond probablement au Spectre 2.

Exercice 9 :

La dibenzosubérone 1 est une cétone dont la formule développée est donnée ci-après.

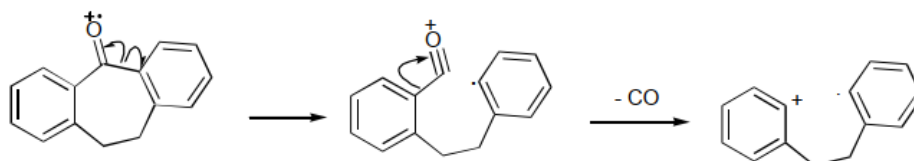
- Calculer la masse précise du pic moléculaire le plus abondant et écrire les compositions isotopiques des différentes espèces constituant le pic M + 1.
- Dans le spectre de masse de ce composé on remarque entre autres deux fragments de même masse nominale dont l'un résulte de la perte de CO et l'autre de C_2H_4 .
- Expliquer uniquement la perte de CO à partir de l'ion parent, et indiquer si par perte de C_2H_4 on doit obtenir un ion positif, un radical ou un cation-radical.
- Indiquer pour les deux fragments les formules brutes qui leur correspondent.



Solution :

a. 208,088815 u.

b. Les deux modes de décomposition correspondent à une perte de masse paire (28 u). Les ions formés ($m/z = 180$) sont donc d'après la règle générale pour les composés CHO, des cations radicaux.



c. Par perte de CO : $m/z = 180,0939$. Par perte de C_2H_4 , $m = 180,05732$. Sur un enregistrement en haute résolution, on peut déduire que le pic le plus à droite correspond aux ions formés à partir de l'ion parent par perte de CO.

d. La formule brute de cet ion est donc $C_{14}H_{12}$. Le second pic a pour formule $C_{13}H_8O$;

CHAPITRE V : LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (CLHP)



I. GENERALITES

La chromatographie liquide haute performance est une forme moderne des méthodes chromatographiques dont les intitulés sont rassemblés sous le vocabulaire général de chromatographie liquide sur colonne, qui quel que soit le phénomène physique invoqué (adsorption, partage, échange d'ions...) est assez peu utilisée en raison :

- ✓ de la lenteur des séparations
- ✓ de l'absence de détection aisée et rapide

La mise au point de phases stationnaires de granulométrie fine et homogène a permis d'améliorer l'efficacité de la chromatographie et d'accélérer considérablement la vitesse des analyses (ordre de grandeur des durées 5 min à 1h pour une CLHP et 1 h à 20 h pour une chromatographie liquide « ancienne »). De plus le couplage à la colonne de chromatographie de détecteurs fonctionnant selon plusieurs principes a permis de simplifier les manipulations.

II. DOMAINES D'APPLICATION DE LA CLHP

Les domaines d'application de la HPLC sont nombreux :

- ✓ Pharmaceutiques : Antibiotiques, Sédatifs, stéroïdes, analgésique ;
- ✓ Biochimie : Acides aminés, protéines, lipides ;

-
- ✓ Alimentaire : antioxydants, additifs, aflatoxines ;
 - ✓ Analyse médicale : acides biliaires, métabolites de médicaments, œstrogènes
 - ✓ Chimie légale : Médicaments, alcool dans le sang, poisons ;
 - ✓ Environnement : Pesticides, herbicides, phénols.

III. CHROMATOGRAPHIE CLASSIQUE

III.1. Description

C'est une technique basée sur des phénomènes d'adsorption. La phase solide, le plus souvent l'alumine ou la silice, remplit une colonne de longueur varier de quelques centimètres à un mètre et parfois plus. Le diamètre moyen est voisin du quinzième de la hauteur ; l'échantillon, en solution concentrée, est déposé en haut de la colonne et la séparation des composants résulte de l'écoulement continu d'un éluant, traversant la colonne par gravité. On peut utiliser comme éluant un solvant unique ou bien accroître progressivement la polarité de l'éluant de façon à accélérer le déplacement des composés.

Les molécules sont entraînées vers le bas à des vitesses variables selon leur affinité pour l'adsorbant et leur solubilité dans l'éluant. Le chromatogramme se développe en formant une succession de zones cylindriques qui se séparent en migrant vers le bas (Fig.1).

Elle présente cependant plusieurs inconvénients :

- ✓ de grandes quantités de solvant sont nécessaires à l'élution
- ✓ la durée de l'élution est généralement très grande
- ✓ la détection des composés exige une attention constante

Elle est adaptée à la purification de faibles quantités de produit, lorsque les conditions opératoires sont au point. Cependant, la méthode étant très empirique, sa mise au point nécessite souvent de nombreux essais.

- * 1 à 4 cm diamètre interne
- * 15 à 20 cm de longueur
- * 150 à 200 μm diamètre des particules

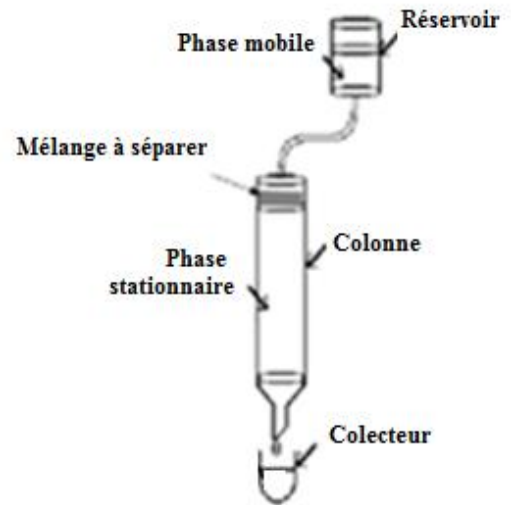


Fig.1 : Chromatographie classique sur colonne

III.2. Détection des substances éluées

Au fur et à mesure de sa sortie, l'éluant est recueilli à l'extrémité de la colonne par petites fractions de volume bien déterminé qui sont ensuite systématiquement soumises à l'analyse (Fig. 2.)

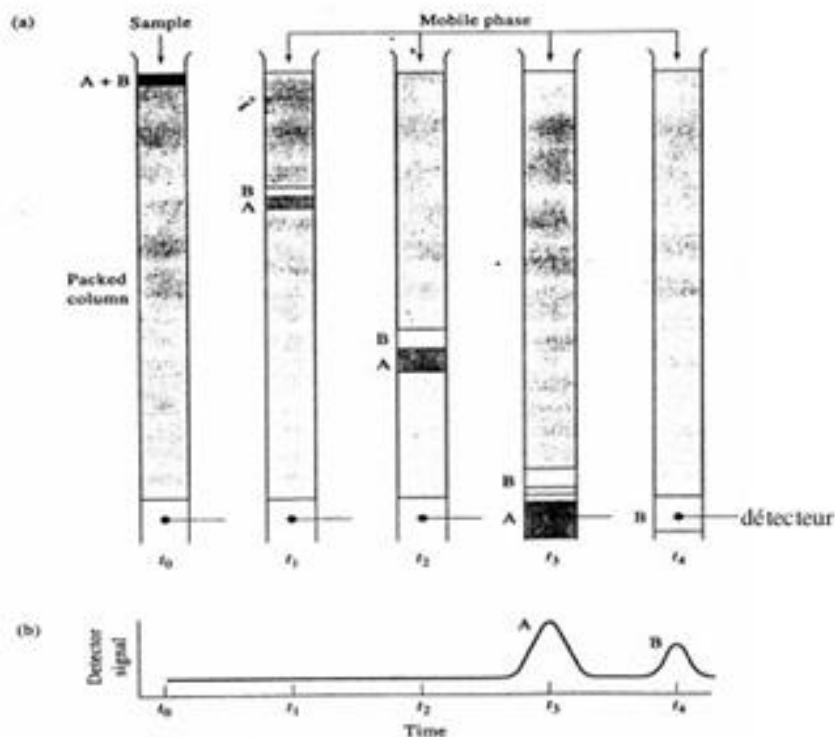


Fig. 2 : Séparation des constituants d'un mélange par chromatographie d'éluion sur colonne.

La chromatographie liquide sur colonne utilisée actuellement de nos jours se distingue de la chromatographie classique par les points suivant :

- ✓ diamètre interne plus petit 2 à 8 mm.
- ✓ phases stationnaires de granulométrie fines et régulière 3 à 10 μ m.
- ✓ pression d'entrée élevée qui nécessite l'utilisation d'une pompe.
- ✓ contrôle du débit de la phase mobile.
- ✓ introduction de faible quantité de substances.
- ✓ détecteurs spécifiques et sensibles.
- ✓ rapidité des analyses.
- ✓ résolution élevée.

En raison de ces différentes caractéristiques, cette nouvelle technique a été appelée : Chromatographie liquide haute performance, haute pression, ou haute résolution (HPLC). Le terme général de chromatographie liquide (C.L) est actuellement adopté.

IV. PRINCIPE GÉNÉRAL DE LA CLHP

Quel que soit le genre de chromatographie effectué, la séparation des composés d'un mélange est basée sur la distribution différente de ces composés entre une phase stationnaire et une phase mobile. Les composés seront séparés uniquement si certains d'entre eux sont plus fortement retenus par la phase stationnaire, pendant que les autres se déplacent plus rapidement au sein de la phase mobile.

Dans une chromatographie, les petites différences dans le comportement de chaque composé d'un mélange au sein des phases stationnaire et mobile sont multipliées plusieurs milliers de fois, ce qui rend la séparation possible.

- ✓ Tous les composés d'un mélange se déplacent à la même vitesse dans la phase mobile.
- ✓ Les temps de rétention des composés sur la phase stationnaire doivent être différents pour que la séparation se fasse.

IV.1 Appareillage

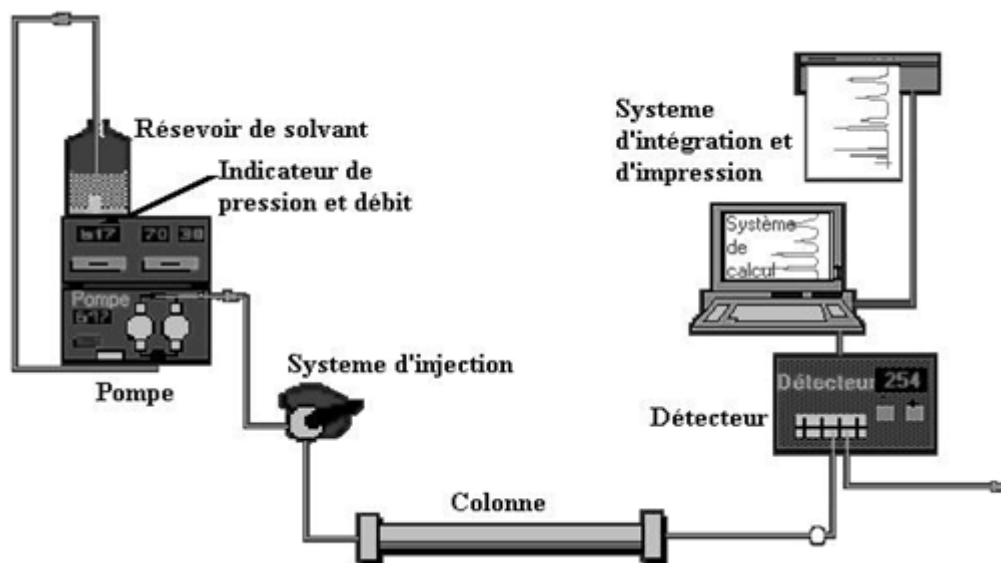


Fig.3 : Schéma du principe d'une chaine CLHP.

IV.1.1. Les réservoirs de phase mobile

- ✓ Un ou plusieurs réservoirs de phase mobile.
- ✓ Des réservoirs de 0,5 à 2litres équipent en général les appareils les plus courants.
- ✓ Des volumes importants qui peuvent aller jusqu'à 10litres sont réservés aux chromatographies préparatives (appareillage différents dans ce cas).
- ✓ les réservoirs doivent être étanches afin d'éviter l'évaporation des solvants ou leur contamination par la vapeur d'eau de l'atmosphère.
- ✓ La phase mobile doit être filtrée et dégazée pour éliminer les poussières et chasser les gaz dissous afin d'éviter la perturbation de la chromatographie et les systèmes de détection par les bulles formées par ce gaz.



❖ **Techniques de dégazage**

- ✓ Barbotage à l'hélium : ce gaz, très peu soluble, permet de déplacer l'oxygène et l'azote dans la plupart des solvants.
- ✓ Filtration sous vide : cette technique permet en outre de se débarrasser des petites impuretés qui pourraient se trouver dans le solvant.
- ✓ Bain ultrasonique : permet d'éliminer environ 50 % de l'air contenu dans la phase mobile.

❖ **Elution en mode isocratique**

Dans ce type d'élution, la composition de la phase mobile reste constante tout au long de l'analyse chromatographique.

- ✓ Elle peut être préalablement préparée et déposée dans un seul réservoir.
- ✓ Certains appareils permettent cependant de l'obtenir instantanément par mélanges de solvants provenant de réservoirs différents. La proportion de chaque liquide est alors réglée par des vannes dont l'ouverture est réglable.
- ✓ On utilise généralement soit un mélange binaire type eau / méthanol, eau / acétonitrile, etc, soit un mélange ternaire eau / acétonitrile / méthanol.

❖ **Elution en mode gradient (une élution avec programmation de solvant)**

- ✓ L'utilisation d'un mélange de solvants dont la composition est variable dans le temps
- ✓ La modification de la polarité de la phase mobile nécessite la présence des systèmes munis de dispositifs de programmation qui permettent de faire varier dans le temps la composition des mélanges de solvant qui constituent la phase mobile
- ✓ Les appareils modernes proposent des systèmes gérés par microordinateurs qui permettent de réaliser des gradients par mélange de 2 à 4 solvants.

IV.1.2. Pompe

La pompe d'un chromatographe a pour rôle de provoquer dans la colonne un écoulement de la phase mobile compatible avec la séparation chromatographique. Ces pompes doivent être très puissantes car la viscosité des solvants et les très fines granulométries des phases stationnaires entraînent une différence de pression ou perte de charge, entre le sommet et l'extrémité des colonnes qui peut parfois être importante (50 ou 100 bars).

Les plus usuelles permettent d'obtenir des pressions de 420 bars et certaines peuvent aller jusqu'à 600 bars.

On distingue deux sortes de pompes : les pompes à pression constante et les pompes à débit constant.

❖ Pompe à pression constante

Ce sont des pompes pneumatiques qui, par l'intermédiaire d'un gaz inerte, imposent une pression constante à la phase mobile.

Moins coûteuse que les suivantes, elles présentent par contre, l'inconvénient de ne pouvoir corriger les modifications de débit due aux changements de la perméabilité des colonnes au cours de leur vieillissement ou aux variations de viscosité des solvants.

❖ Pompe à débit constant

La régularité des débits qui peuvent aller de 0,01 ml à 10 ml.min⁻¹ est une condition essentielle à la reproductibilité des chromatographies et est très souvent obligatoire pour certains systèmes de détection. Le modèle le plus simple est du type seringue dans lequel le déplacement d'un piston refoule le liquide à vitesse constante.

IV.1.3 Injecteur

Vanne à boucle d'échantillonnage : c'est le système actuellement le plus utilisé. La quantité injectée est très reproductible (volumes injectés entre 10 µl et 100 µl). On injecte toujours un volume supérieur à celui de la boucle sans bulles d'air. (Position LOAD).

En tournant la valve en position INJECT (seul le contenu de la boucle est dirigé en tête de colonne).

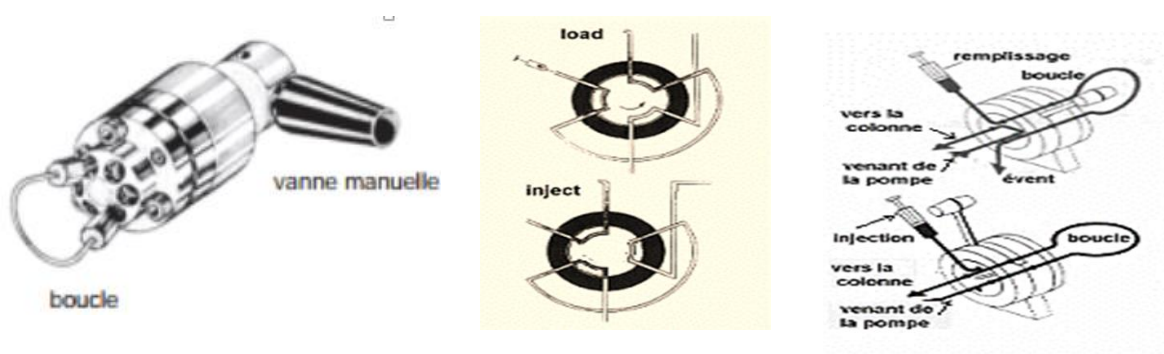


Fig.4 : Vanne d'injection pour CLHP

IV.1.4. Colonne

Les colonnes utilisées en CLHP se caractérisent par leur géométrie et par la nature des phases stationnaires qu'elles contiennent.

Les colonnes sont en acier inoxydable

- ✓ diamètre intérieur 2 à 8 mm
- ✓ une longueur de 10 à 30 cm.

Capables de résister aux fortes pressions.



Le remplissage (en silice, silice greffée ou particules polymériques) a une granulométrie de 3, 5, ou 10 μ m.

Depuis peu sont apparues sur le marché des micros colonnes à haute performance et à grande vitesse. Leur diamètre interne est de 1 à 4,6 mm et leur longueur de 3 à 7,5 cm. Ces colonnes qui sont remplies de particules de 3 à 5 μ m possèdent jusqu'à 100 000 plateaux par mètre et présentent l'avantage de la rapidité et d'une consommation minimale de solvant, car les solvants utilisés en CLHP sont très coûteux.

❖ **Colonnes de garde**

On place souvent une courte colonne de protection avant la colonne afin d'en augmenter la durée de vie de notre colonne par élimination des impuretés contenus dans les solvants, et aussi des espèces qui se lient de manière irréversible à la phase stationnaire.

La composition de la colonne de garde doit être semblable à celle de la colonne analytique.

IV.1.5. Les détecteurs

Le détecteur a pour but de suivre en continu la présence des composés dans la phase mobile au fur et à mesure de leur élution

IV.1.5.1 Détecteur UV-visible

C'est le détecteur le plus utilisé car un grand nombre de composés organiques peuvent absorber la lumière UV-visible.

❖ **Détecteurs spectrophotométriques**

La détection est basée sur la loi de Lambert-Beer ($A = \epsilon lc$) : l'absorbance A de la phase mobile est mesurée en sortie de colonne, à la longueur d'onde λ ou plusieurs longueurs d'onde dans l'UV ou le visible.

✓ **Détection monochromatique**

Le modèle de base se compose d'une source au deutérium ou à vapeur de mercure, d'un monochromateur pour isoler une bande passante étroite (10 nm) ou une raie (ex. la raie 254 nm du Hg), d'une cellule à circulation d'un volume de quelques mL (trajet optique de 0,1 à 1 cm) et d'un moyen de détection optique.

L'essor actuel des biotechnologies, comme de la biochimie, a accru la demande d'analyses des acides aminés (hydrolysats de protéines) ; on peut utiliser les détecteurs photométriques

✓ **Détection polychromatique**

Les détecteurs plus perfectionnés permettent soit d'enregistrer l'absorbance à plusieurs longueurs d'onde quasi-simultanément, soit de capter en une fraction de seconde tout un domaine de longueurs d'onde sans interrompre la circulation dans la colonne.

Le détecteur à barrette de diodes permet non seulement d'obtenir un chromatogramme, mais il fournit des renseignements spectraux pouvant servir à s'assurer de l'identité des composés séparés. C'est ce qu'on nomme l'analyse de certitude.

IV.1.5.2. Détecteur à fluorescence

Fluorimètre, ce mode de détection est spécifique aux composés qui présentent une fluorescence lorsqu'ils sont excités par une radiation lumineuse. Ce détecteur est caractérisé par sa grande sélectivité et sa grande sensibilité.

IV.1.5.3. Réfractomètre

Consiste à mesurer la différence de réfraction entre la phase mobile pure qui sert de référence et les différentes substances.

IV.1.5.4. Détecteur électrochimique

Ne s'adresse qu'aux composés doués de propriétés Oxydo-réductrice. Leur fonctionnement est basé sur l'ampérométrie, la polarographie, et la coulométrie.

Le tableau 1 résume les principaux détecteurs utilisés en CLHP

Le tableau 1 : principaux détecteurs utilisés en CLHP.

Tableau 1: Principaux détecteurs utilisés en chromatographie liquide

type	Universalité	Limite de détection	Destructeur	Identification de composés	facilité d'utilisation	Remarques et coût
Détecteur UV-visible	+++	0,3 ng/ml	-	+	+++++	Le plus utilisé peu coûteux
UV-visible barettes diodes	+++	1 ng/ml	-	++	+++++	bande passante assez coûteux
Fluorimètre	+	5 pg/ml dérivatisation	+/-	++	++++ souvent une	nécessite
Réfractomètre	+++++	0,7 mg/ml	-	-	++	peu coûteux cellule lecture
Détecteur électrochimique	++++	pg/ml	+	-	+	détecteur d'avenir
Détecteur par conductivité	sélective d'ions	0,1 ng/ml	-	+	++	limité aux ions
Spectromètre de masse	+++++	ng/ml	+++++	+++++	+/-	très cher
Diffusion de lumière	+++++	1 ng glucose	+++	-	+	détecteur d'avenir

IV.1.5.5. Couplage CLHP/MS

La spectrométrie de masse (SM) et la chromatographie liquide sont deux techniques d'analyse de prime abord non compatibles : la première nécessite un vide poussé, la deuxième des pressions élevées. Pendant longtemps le couplage chromatographie liquide/spectrométrie de masse (CL/SM) n'était pas possible ou posait de nombreux problèmes, principalement au niveau de la jonction du chromatographe et du spectromètre. Le couplage permet l'identification structurale des composés séparés. L'intérêt porté à la technique couplée CLHP/SM a fait progresser la chromatographie liquide dans le sens de la miniaturisation. En effet le principal problème rencontré lorsqu'on installe un spectromètre de masse en aval d'un chromatographe liquide est l'élimination de la phase mobile. Pour cela le passage à la chromatographie liquide capillaire ou à la nano-chromatographie, deux techniques en voie de développement, facilite l'interfaçage entre les deux appareils.

IV.1.5.5.1. Interface

Les premières interfaces (ruban mobile, introduction directe d'une fraction de l'effluent) ne sont pratiquement plus employées car elles sont nettement moins performantes que les interfaces apparues ultérieurement. L'interface thermospray (TSP) était pendant longtemps l'interface la plus courante. Actuellement, elle est de moins en moins utilisée, au profit d'interfaces permettant l'ionisation à pression atmosphérique : l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et l'ionisation électrospray (ESI), qui ne présentent pas les inconvénients du TSP, tout en étant plus performantes.

Deux autres interfaces sont également utilisées : l'interface particule beam (PB) et l'interface à analyse continue par bombardement d'atomes rapides (FAB dynamique).

- ❖ **Interfaces pour l'ionisation à pression atmosphérique et FAB dynamique** Les interfaces permettant l'ionisation à pression atmosphérique (APCI et ESI) et l'interface FAB dynamique nécessitent à la fois un système d'introduction de l'effluent liquide dans le spectromètre de masse et un système d'ionisation spécifique (le système d'ionisation peut faire partie intégrante de l'interface). Les interfaces APCI et ESI possèdent, pour la plupart des appareils, une partie commune installée en permanence. Le passage de l'une à l'autre se fait par un changement de sonde et ne nécessite pas la remise du spectromètre à pression atmosphérique. Pour les interfaces APCI et FAB les principes d'introduction et d'ionisation de l'échantillon impliquent une ionisation de type chimique ; pour l'interface ESI, l'ionisation se fait en phase liquide et est induite par un champ électrique. Il en résulte que le nombre de fragmentations est réduit pour ces trois interfaces, mais que l'ion moléculaire est visible pour la majorité des molécules (ce qui n'est pas toujours le

cas en IE). Toutefois, la fragmentation peut être augmentée par collision avec le gaz résiduel se trouvant dans la chambre d'ionisation (processus couramment désigné par le sigle CID). Mais l'élucidation des structures repose principalement sur l'interprétation des fragmentations (les conditions opératoires étant difficilement reproductibles d'un appareil à l'autre, il n'est pas possible de constituer des bibliothèques de spectres, sauf des bibliothèques personnelles).

❖ **Interface**

PB

L'interface PB est une interface d'introduction de l'effluent liquide dans le spectromètre de masse, avec passage de l'état liquide à l'état gazeux ; l'ionisation est assurée par une source à ionisation électronique indépendante, identique à celle utilisée en CG/SM.

Par conséquent, les spectres sont pareils à ceux obtenus par CG/SM, c'est-à-dire que, dans le cas de l'IE, les spectres peuvent être comparés à ceux des bibliothèques. L'IC sont également possibles. Les appareils de CL et CG peuvent donc être couplés au spectromètre de masse en permanence, puisque les sources d'ionisation sont les mêmes et indépendantes du système d'introduction.

Suivant le type d'interface et sa géométrie il peut être recommandé d'utiliser des tampons volatils, pour éviter de former des dépôts et, par conséquent, de boucher certains orifices d'écoulement. Certaines interfaces APCI et ESI sont prévues ou peuvent être modifiées pour accepter des effluents non volatils. Le tableau 2 résume et compare quelques caractéristiques de ces différentes techniques de couplage (débit, type d'ionisation, nature physico-chimique des substances pour lesquelles l'interface est la plus appropriée, avantages, inconvénients). Les limites inférieures et supérieures des débits indiqués correspondent à des valeurs relevées dans la littérature ou dans les fiches de caractéristiques de certains appareils. Les domaines de débit préconisés par les fabricants peuvent légèrement varier suivant le modèle de spectromètre.

Les indications données sur la nature des substances correspondent à des observations moyennes.

Tableau 2: Comparaison de quelques caractéristiques des interfaces LC/MS

Interface/ ionisation	Débit de l'effluent	Type d'ionisation	Substances	Avantages-Inconvénients
Particle Beam	0,1 – 1 ml/min	IE, IC+, IC-	<ul style="list-style-type: none"> – non ou modérément polaires – volatiles – thermiquement stables – domaine de masses moléculaires : 100–1400 (suivant volatilité) 	<ul style="list-style-type: none"> – réponse non linéaire – variabilité de la réponse (suivant substance, volatilité...) – moins de sensibilité qu'avec les autres interfaces – nécessité d'utiliser des tampons volatils – bibliothèques de spectres, en IE
TSP	0,1 – 2 ml/min	IC+, IC-	<ul style="list-style-type: none"> – peu polaires à polaires – domaine de masses moléculaires : 100–2000 	<ul style="list-style-type: none"> – fragmentation limitée et difficilement reproductible – pas de spectres de référence – instabilité de l'intensité du signal – conditions CL limitées
APCI	0,2 – 2 ml/min	IC+, IC-	<ul style="list-style-type: none"> – peu polaires à polaires – domaine de masses moléculaires : 100–1200 	<ul style="list-style-type: none"> – fragmentation limitée – pas de spectres de référence – très bonne sensibilité – possibilité de dégradation de certaines molécules thermolabiles
ESI	1 µl/min – 2 ml/min	IC+, IC-	<ul style="list-style-type: none"> – peu polaires à très polaires – masses moléculaires faibles et élevées (formation d'ions multichargés) 	<ul style="list-style-type: none"> – fragmentation limitée – pas de spectres de référence – très bonne sensibilité
ESI-Nanospray	20 nl/min – 5 µl/min	IC+, IC-	<ul style="list-style-type: none"> – peu polaires à très polaires – masses moléculaires faibles et élevées (formation d'ions multichargés) 	<ul style="list-style-type: none"> – fragmentation limitée – pas de spectres de référence – utilisable avec colonnes capillaires
FAB dynamique	1 – 5 µl/min	IC+, IC-	<ul style="list-style-type: none"> – polaires à très polaires – masses moléculaires jusqu'à quelques milliers de daltons 	<ul style="list-style-type: none"> – fragmentation limitée – pas de spectres de référence – le débit de l'effluent doit être faible

IV.1.5.6. Couplage CLHP-MS/MS

De manière générale, la LC-MS comprend un spectromètre de masse et seul l'ion précurseur sera analysé tandis que la LC-MS/MS est constitué d'un spectromètre de masse en tandem qui permet l'analyse de l'ion précurseur et des ions fragments. La majeure différence entre une LCMS et une LC/MS/MS se retrouve ainsi au niveau de l'analyseur des ions. Deux spectromètres de masse sont utilisés.

L'utilisation de la CLHP/MS/MS) est en augmentation en complément aux techniques GC/MS et LC/UV pour les méthodes de dépistage d'inconnus. L'identification par MS/MS semble plus sûre que la simple MS ou la LC/UV.

V. PRINCIPAUX MODES DE SEPARATION EN CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

On dispose d'un grand nombre de modes de chromatographie. Certains ont un champ d'application très large, d'autres au contraire correspondent à des applications très spécialisées.

On distinguera dans ce qui suit :

- ✓ Chromatographie d'adsorption
- ✓ Chromatographie de partage (en phase directe ou inverse)
- ✓ Chromatographie d'échange d'ions (chromatographie ionique)
- ✓ Chromatographie d'exclusion
- ✓ Chromatographie d'affinité

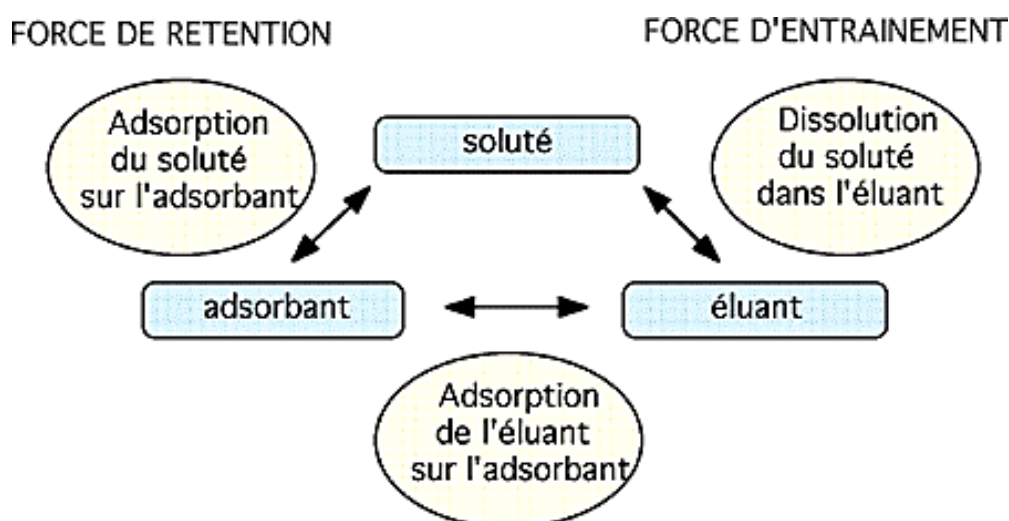
La nature des phases mobiles et stationnaires utilisées, ainsi que le mécanisme de rétention peuvent servir de base de classement des méthodes chromatographiques :

V.1. La chromatographie d'adsorption

La chromatographie d'adsorption encore appelée chromatographie liquide-solide (CLS) utilise comme phases stationnaires des gels de silice et d'alumine.

Les différents solutés sont plus ou moins adsorbés sur la phase stationnaire, et plus ou moins solubles dans la phase mobile ; il en résulte une migration différentielle des solutés en fonction de la résultante entre les deux forces (de rétention et d'entraînement) et donc une séparation de ces solutés.

Le schéma ci-après résume les interactions entre le soluté, le solide adsorbant et l'éluant :

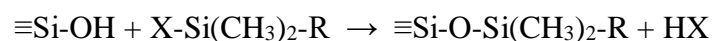


Cette technique s'applique bien à la séparation de composés présentant des groupements fonctionnels polaires différents (cas de nombreuses molécules thérapeutiques).

V.2. La chromatographie de partage liquide-liquide

La chromatographie de partage (ou chromatographie liquide-liquide) met en jeu un mécanisme de partition entre solvants que constituent respectivement par la phase stationnaire et la phase mobile. La phase stationnaire peut être constituée par un film liquide (non miscible avec la phase mobile) imprégné sur un support rigide (silice) ou fixé par liaison covalente (phases greffées). C'est ce second type qui est utilisé actuellement.

❖ Le greffage est réalisé par établissement de ponts siloxane (Si-O-Si) :



- ✓ Selon la nature des radicaux R, on distinguera :
- ✓ Les phases greffées polaires (-diol, -cyanopropyl, aminopropyl,...)
- ✓ Les phases greffées apolaires (-alkyl, -phényl, ...)

Les premières sont utilisées avec des solvants peu polaires et permettent de réaliser de la chromatographie en phase normale ou directe.

Les principales phases greffées polaires sont les suivantes :

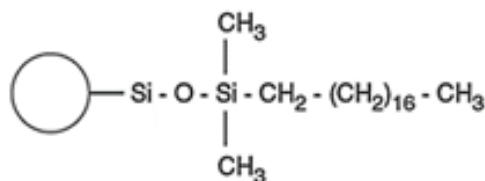
- ✓ aminopropyl : $-(\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2$
- ✓ paranitrobenzil :



- ✓ alkilnitrile : $(-\text{CH}_2)_n\text{-C}\equiv\text{N}$
- ✓ glycéroprpyl (diol) : $-(\text{CH}_2)_3\text{-O-CH}_2\text{-CH}(\text{OH})\text{-CH}_2(\text{OH})$

Les secondes s'emploient avec des solvants polaires et l'on a alors de la chromatographie en phase inverse ou réverse.

Les greffons les plus courants sont les chaînes octyle et octadécyle généralement commercialisées sous les qualificatifs C8 ou RP8, C18 ou RP18.



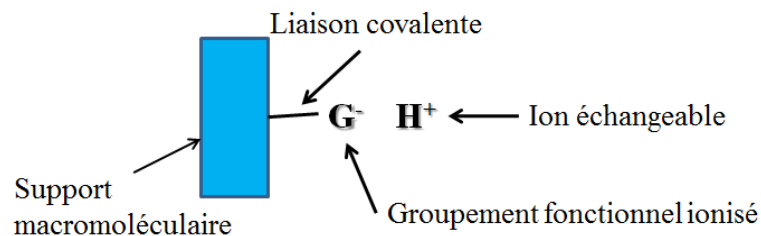
Silice greffée organosillanée

On considère que 80 % des séparations sont actuellement réalisées avec des phases stationnaires apolaires.

V.3. La chromatographie d'échange d'ions

Les séparations par échange d'ions s'adressent plus particulièrement aux espèces ionisées ou ionisables.

La phase stationnaire est un échangeur d'ions, c'est-à-dire un solide comportant des groupements fonctionnels ionisés, fixes, porteurs de charges positives ou négatives, et des ions mobiles de signe contraire assurant l'électroneutralité. Les ions, retenus au voisinage des groupements fonctionnels par des forces d'attraction électrostatique, sont interchangeables, en nombre équivalent, avec ceux de la solution mise en contact avec l'échangeur.



Les groupements les plus utilisés sont de type sulfonate ($-SO_3^-$), phosphonate ($-PO_2^{3-}$) et carboxylate ($-COO^-$) pour les échangeurs de cations et de type ammonium quaternaire ($-N^+R_3$), tertiaire ($-N^+HR_2$) ou secondaire ($-N^+H_2R$) pour les échangeurs d'anions.

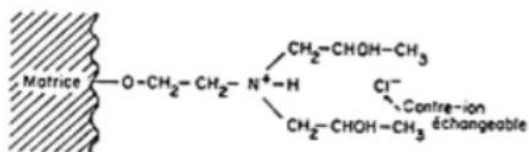
Exemples de résines échangeuses d'ions

Les résines polyosidiques chargées de type SephadexTM sont utilisées pour la séparation de macromolécules ionisées : protéines, acides nucléiques,.... La matrice polysidique (composée de cellulose ou de dextrans) porte les groupements chargés suivants :

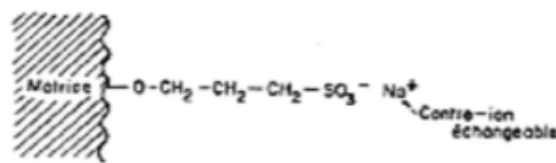
Echangeurs anioniques	Echangeurs cationiques
Le DEAE-polysidique (diéthylaminoéthyl) échangeur anionique faible : 	Le CM-polysidique (carboxyméthyl) : échangeur cationique faible :
Le QAE-polysidique (quaternaire)	Le SP-polysidique (sulfopropyl)

aminoéthyl) échangeur anionique

fort :



échangeur cationique fort :

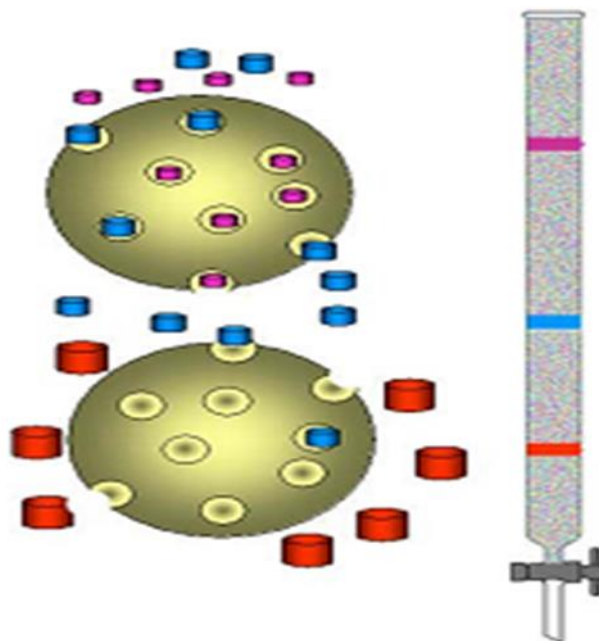


V.4. La chromatographie d'exclusion

La chromatographie d'exclusion est fondée sur la rétention sélective des molécules de soluté suivant leur taille lors de leur pénétration dans les pores, remplis de solvant, d'une phase stationnaire appropriée

Cette technique est celle qui a reçu le plus d'appellations différentes, en particulier :

- ❖ **chromatographie de filtration sur gel**, terme que l'on réserve au cas où la phase mobile est une solution aqueuse ; l'application la plus importante est alors le fractionnement ou la caractérisation des polymères solubles dans l'eau tels que les protéines.



- ❖ **chromatographie de perméation sur gel (C PG)**, qui est l'une des plus utilisées, surtout en chimie macromoléculaire ; en principe, le terme GPC sous-entend que la phase mobile est de nature organique.

➤ **Aspects théoriques**

On considère une colonne de volume totale V_t remplie d'un gel solvaté :

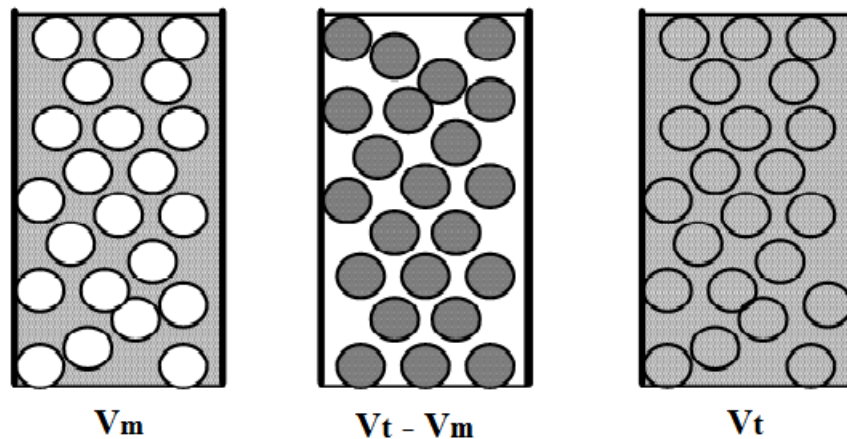
$$V_t = V_m + V_s + V_g$$

Où :

V_m : volume mort, c'est-à-dire le volume de phase mobile entre les grains.

V_s : volume de la phase stationnaire c'est-à-dire volume de liquide se trouvant à l'intérieur des grains.

V_g : volume occupé par le substrat du gel.



L'expression qui relie le volume d'élution d'un soluté à son coefficient de distribution est :

$$V_r = V_m + K \cdot V_s$$

Avec la constante $K = \frac{C_s}{C_m}$

C_s : Concentration du soluté dans l'eau interne

C_m : Concentration du soluté dans l'eau externe

- Si $K = 0$, le soluté est totalement exclu.
- Si $0 < K < 1$, le soluté est partiellement inclus. Le taux d'inclusion augmente avec K .
- Si $K = 1$, le soluté est totalement inclus dans le gel.
- Si $K > 1$, le soluté est non seulement inclus, mais aussi adsorbé par le gel.

➤ **Relation entre le logarithme de la masse moléculaire et le volume de rétention**

En chromatographie d'exclusion, on a l'habitude de porter le logarithme de la masse moléculaire en fonction du volume de rétention $\log MM = f(V_r)$ (Fig.5).

- ✓ Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et sont donc toutes éluées les premières, au niveau du volume mort V_m (A).

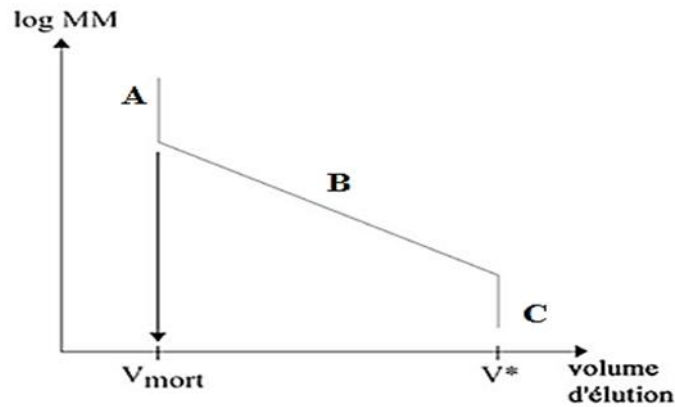


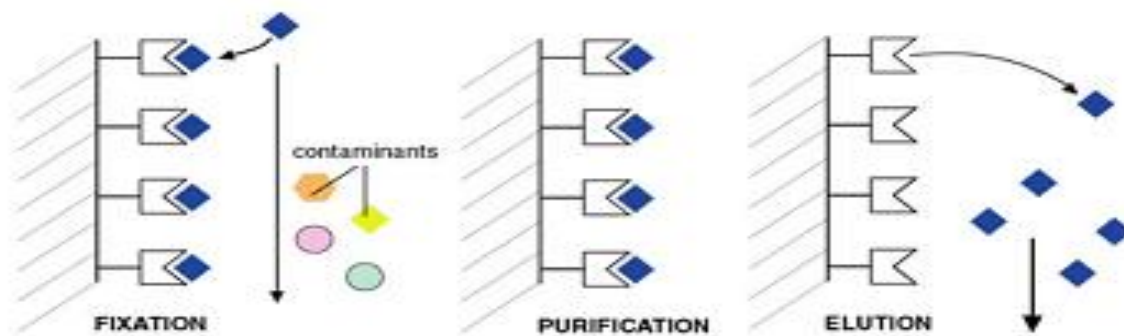
Fig.5 : Relation entre le logarithme de la masse moléculaire et le volume de rétention.

- ✓ Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses dans le gel, leur migration est gênée (B,C).

V.5. La chromatographie d'affinité

La chromatographie d'affinité consiste à greffer, sur un support solide inerte, un ligand présentant une interaction ligand-molécule conduit à une fixation ou une rétention de cette dernière. L'élué est ensuite effectuée au moyen d'un solvant qui favorise la dissociation du complexe ligand-macromolécule. Cette technique est surtout utilisée en biologie dans le cas de la purification des protéines, dans des processus de séparation de cellules, de virus, d'acides nucléiques etc,...

La purification se fait en 3 étapes :



Etape de fixation

Le mélange de molécules contenant le composé à purifier est chargé sur la colonne d'affinité. Seule la molécule présentant une affinité pour la colonne sera retenue par l'effecteur greffé sur la phase stationnaire.

Etape de purification

En continuant à faire passer du tampon dans la colonne, toutes les molécules contaminants sont éliminées et éluées.

Etape d'éluion

La molécule est finalement décrochée de la colonne et recueillie dans l'éluât.

Le choix du procédé chromatographique

Substances de PM > 2 000		- Chrom. d'exclusion-diffusion
Substances de PM < 2 000	a) Molécules non ionisées	{ Polarité élevée : - Chrom. d'adsorption - Chrom. de partage sur phase polaire
		{ Polarité faible : ou moyenne - Chrom. de partage à polarité de phase inversée
	b) Molécules ionisées ou ionisables	- Chrom. par échange d'ions - Chrom. de partage avec appariements d'ions sur phase inverse - Chrom. de partage sur polarité de phase inversée après recul d'ionisation

➤ Choix de la phase stationnaire :

En générale on choisit la phase stationnaire dont la partie linéaire de la courbe (Fig. x) correspond au domaine des masses moléculaires des constituants à séparer. Si les solutés à

séparer on des masses moléculaires trop différentes, il est nécessaire d'utiliser plusieurs colonnes en série qui possèdent des limites d'exclusion différentes.

➤ **Choix de la phase mobile :**

La phase mobile doit présenter les propriétés suivantes :

- Dissoudre l'échantillon ;
- Imprégner le gel;
- Etre compatible avec le système de détection ;
- Ne pas détériorer les phases stationnaires.

Suivant un principe général, à une phase stationnaire polaire on oppose une phase mobile peu ou pas polaire et vice-versa. La chromatographie est dite en phase normale dans le premier cas et à polarité de phase inversée (« R - HPLC »). dans le second. Sachant que la plupart des applications actuelles font appel à des gels de silice transformés, peu polaires, de nature plutôt hydrophobe, on choisit comme phases mobiles des mélanges d'eau et d'un modifiant tel le méthanol ou l'acétonitrile. En changeant la composition de la phase mobile, donc sa polarité, on agit par l'intermédiaire des coefficients de distribution $K (C_S/C_M)$ sur les facteurs de rétention k des composés (fig.6).

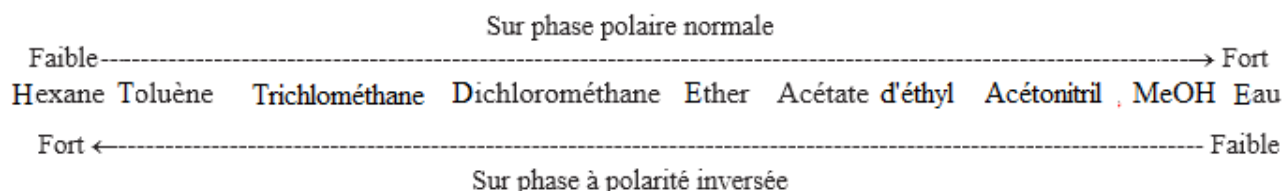


Fig.6 : comparaison du pouvoir d'élution des solvants selon les phases stationnaires.

On peut, en mélangeant plusieurs solvants, ajuster le pouvoir d'élution de la phase mobile. On notera que la viscosité, donc la pression en tête de colonne varie selon la composition de la phase mobile (Fig.7).

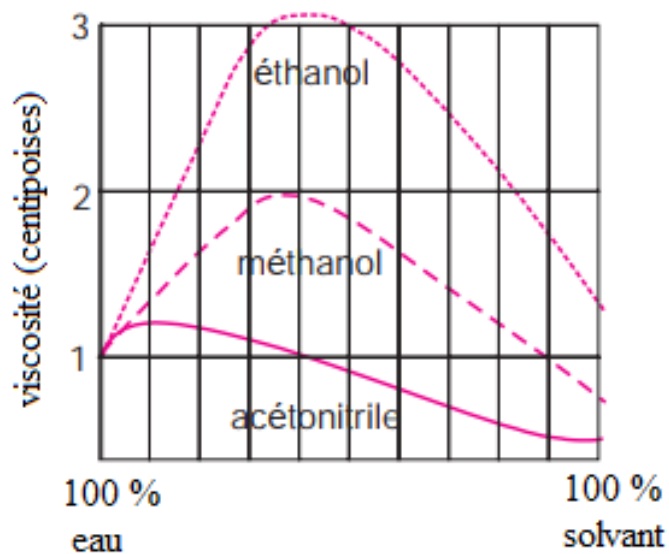


Fig.7 : viscosité des mélanges eau/solvant.

La difficulté pour le chromatographe est de faire le bon choix en fonction des composés à séparer (Fig.8).

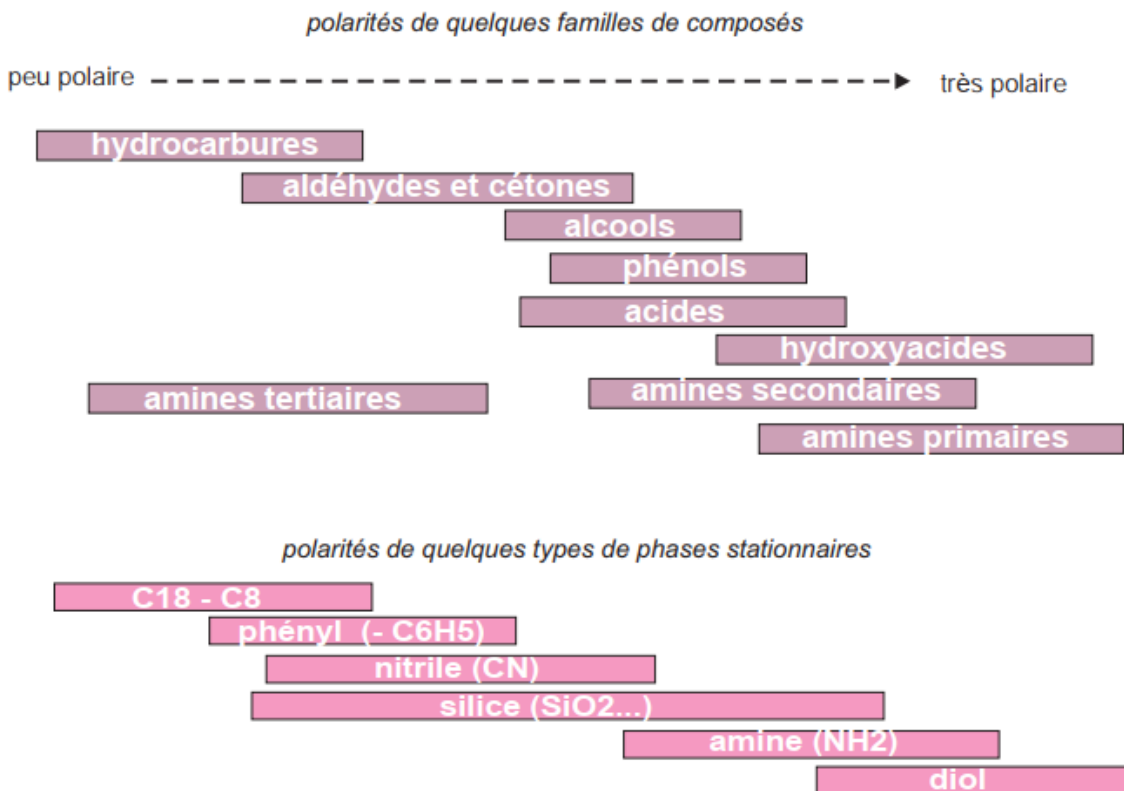


Fig.8 : Polarités de quelques familles de composés organiques ainsi que des principaux types de greffons des phases stationnaires actuelles.

VI. PRECAUTIONS GENERALES

Un problème rencontré fréquemment en CLHP est l'obstruction de l'appareillage, ce qui entraîne une augmentation rapide de la pression et le déclenchement automatique de l'arrêt de l'appareil. C'est pourquoi outre la filtration des solvants il est recommandé :

- ✓ d'aspirer l'éluant à travers une crépine filtrante
- ✓ d'adapter un filtre à la seringue de chargement de la boucle
- ✓ d'insérer entre l'injecteur et la colonne une colonne de garde (ou précolonne) qui retient les particules solides
- ✓ Lorsqu'on recherche des meilleures conditions de séparation, il ne faut modifier qu'un facteur à la fois.
- ✓ Lorsqu'on change le débit, il est important d'attendre que la pression soit stabilisée avant de faire une nouvelle injection de produit.
- ✓ La concentration de l'échantillon doit être de l'ordre de 0,01%. Il faut éviter de surcharger la colonne en injectant un échantillon trop concentré.
- ✓ En cas de surcharge de la colonne, éluer avec du méthanol jusqu'à ce que la pression soit normale et la ligne de base stable.
- ✓ Lorsque des tampons sont utilisés comme phase mobile, il faut toujours veiller à leur écoulement constant, même faible. En cas de débit nul, il pourrait se former un précipité qui boucherait la colonne et endommagerait l'appareillage. Il faut par ailleurs utiliser des colonnes bien adaptées à l'étude à laquelle on les destine, et ne jamais les laisser sécher.

VII. CHROMATOGRAMME ET GRANDEURS DE RETENTION

VII.1. Chromatogramme

Le chromatogramme est une courbe 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. La ligne de base correspond au tracé obtenu en l'absence de composé élué. La séparation est complète quand le chromatogramme présente autant de pics chromatographiques revenant à la ligne de base qu'il y a de composés dans le mélange à analyser.

Le chromatogramme est utilisé à la fois en analyse qualitative et quantitative.

✓ Analyse qualitative : permet l'identification des composés par la position du pic

Analyse quantitative : on se contente le plus souvent de bien séparer du mélange le ou les constituants à doser. Si le signal envoyé par le capteur varie linéairement avec la concentration d'un composé, il en sera de même de l'aire du pic correspondant sur le chromatogramme.

VII.2. Elution

L'éluion est l'entraînement d'un soluté à travers la phase stationnaire par le mouvement de la phase mobile. En chromatographie liquide solide, la phase mobile peut être appelée éluant.

VII.3. Le temps de rétention

Un constituant est caractérisé par son temps de rétention, (t_r) qui représente le temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui qui correspond sur le chromatogramme au maximum du pic qui lui est lié. Dans le cas idéal t_r est indépendant de la quantité injectée.

VII.4. Le temps mort

Un constituant non retenu par la colonne sort de la colonne au temps t_m , appelé temps mort (désigné également par t_0).

VII.5. Le temps de rétention réduit

La différence entre le temps de rétention et le temps mort est désignée par le temps de rétention réduit (t_r') du composé. Il représente le temps passé par le soluté dans la phase stationnaire.

La figure 9 illustre Chromatogramme avec les grandeurs de rétention.

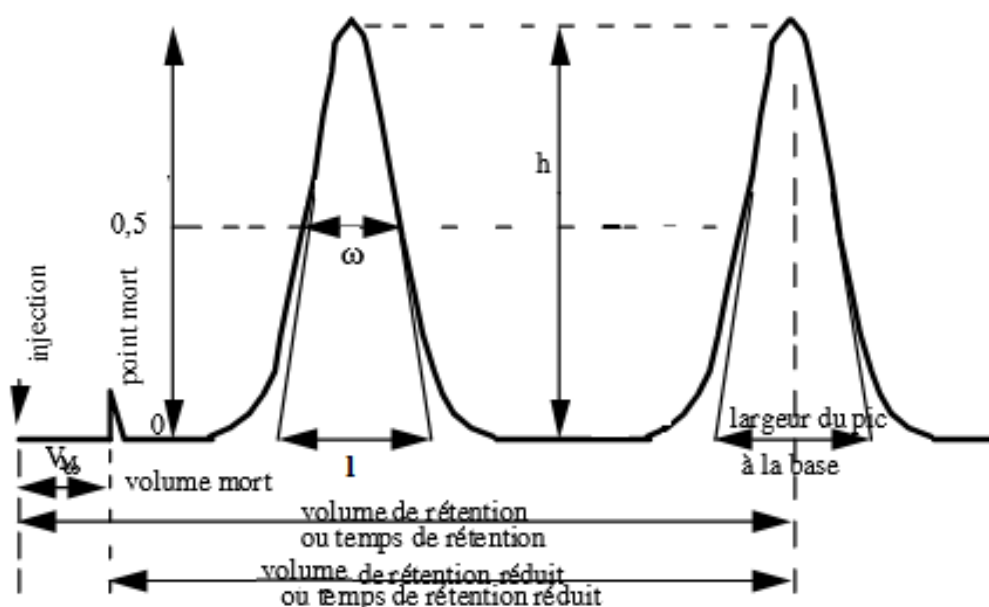


Fig.9 : Principaux paramètres d'un chromatogramme.

VII.6. Le volume de rétention

Connaissant le débit D de la phase mobile, supposé maintenu constant, on définit le volume de rétention (V_r)

$$V_r = t_r \cdot D$$
$$V_r = t_r \cdot u \cdot s \cdot \varepsilon$$

u : vitesse linéaire moyenne de la phase mobile

s : section droite de la colonne

ε : porosité de la phase stationnaire ($\approx 0,75$ pour la silice poreuse)

Le volume de la phase mobile dans la colonne (encore appelé volume mort) peut être calculé d'après le chromatogramme, à condition d'introduire un soluté non retenu par la phase stationnaire. Cette grandeur est exprimée par :

$$V_m = t_m \cdot D$$

VII.7. Le volume de rétention

Le volume de rétention V_r représente à l'étalement près, le volume de phase mobile nécessaire pour éluer chaque composé. Autrement dit : le volume de la phase stationnaire désigné par V_s est calculé en retranchant du volume total interne de la colonne vide le volume de la phase mobile.

VII.8. Vitesse linéaire moyenne du soluté et de la phase mobile

La vitesse linéaire moyenne de progression du soluté v est égale à :

$$v = L/t_r$$

L : longueur de la colonne.

La vitesse linéaire moyenne de la phase mobile u est égale à :

$$u = L/t_m$$

VII.9. Le facteur de capacité

Le facteur de capacité (ou facteur de rétention) k' exprime le rapport de la quantité de soluté dans la phase stationnaire à la quantité de soluté dans la phase mobile. Ce facteur sans dimension, peut être relié au temps de rétention par l'expression :

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

k' est aussi le rapport du temps passé par une espèce dans la phase stationnaire au temps passé par cette même espèce dans la phase mobile.

De faibles valeurs de k' indiquent des composés peu retenus. Des valeurs élevées de k' indiquent des composés fortement retenus, en pratique $1 < k' < 10$.

Le temps et le volume de rétention sont liés au facteur de capacité par les relations :

$$t_r = t_m(1 + k')$$

et

$$V_r = (1 + k')$$

VII.10. Facteur de sélectivité

Pour caractériser la distance séparant les sommets de deux pics on utilise le facteur de sélectivité ou de séparation α . Ce facteur est égal au rapport des facteurs de capacité de deux solutés dont on veut réaliser la séparation. Il s'exprime par :

$$\begin{aligned}\alpha &= \frac{(t_{r2} - t_m)}{(t_{r1} - t_m)} \\ &= \frac{k'_2}{k'_1}\end{aligned}$$

Avec $k'_2 > k'_1$

Il s'agit du rapport des temps de rétention réduits

k'_2 : facteur de capacité du composé 2

k'_1 : facteur de capacité du composé 1

$\alpha = 1$ aucune séparation ne s'effectue aussi le temps de rétention est le même. La sélectivité doit être supérieure à 1. Deux composés ne peuvent être séparés sauf s'ils ont $k' \neq 0$.

VIII. EFFICACITE D'UNE COLONNE

L'efficacité d'une colonne chromatographique est mesurée, pour chaque composé, par le nombre de plateaux théoriques N de la colonne et la hauteur équivalente à un plateau théorique H . Cette théorie est née de la recherche d'un modèle statique permettant de décrire le fonctionnement d'une colonne chromatographique comme celui d'une colonne à distiller. Au lieu de considérer le déplacement réel, continu de la phase mobile, on admet que celle-ci progresse par sauts successifs et se met en équilibre avec la phase stationnaire entre deux transferts, ce qui permet de découper fictivement la colonne en un certain nombre de zones dans lesquelles les équilibres sont réalisés et que l'on appelle plateaux théoriques.

Les pics d'éluion peuvent être assimilés à des courbes de Gauss. Les caractéristiques géométriques de la courbe de Gauss (Fig.9) permettent de calculer, pour un soluté donné, N à partir du chromatogramme.

$$N = 16 (t_r/l)^2$$

$$= 5,54 (t_r/\omega)^2$$

l : largeur du pic à la base

Avec $l = 1,7 \omega$

ω : largeur du pic à mi-hauteur

Pour comparer entre elles des colonnes de différentes longueurs on définit la hauteur équivalente à un plateau théorique.

$$N = L/H$$

H : est la distance où l'équilibre chromatographique est atteint.

En HPLC les HEPT (hauteur équivalente à un plateau théorique) sont comprises entre 0,001 et 1 mm permet de comparer entre elles des colonnes de différentes longueurs. *L'efficacité des colonnes chromatographiques augmente si le nombre de plateaux théoriques augmente ou si la hauteur équivalente à un plateau théorique diminue à longueur constante.

Lorsqu'on double la longueur de la colonne ou la vitesse de la phase mobile, le temps de rétention est multiplié.

Il y'a des facteurs extra-colonne qui peuvent influencer sur l'efficacité de celle-ci est d'utiliser des tubes trop larges ou trop long (tube de liaison qui influe sur la largeur du pic mais pas sur le temps de rétention).

Afin de juger des performances d'une colonne chromatographique en tenant compte du diamètre des particules (dp) de la phase stationnaire, on définit la hauteur de plateaux réduites h.

$$h = H/dp$$

Deux colonnes de mêmes efficacités possèdent le rapport L/dp semblable.

IX. RESOLUTION

La résolution de deux pics voisins est définie par le rapport de la distance entre le maximum des deux pics et la moyenne arithmétique.

Deux caractéristiques déterminent le degré de recouvrement des pics

- a. la distance séparant les sommets de deux pics mesurée par $t_{r2} - t_{r1}$
- b. la largeur des pics à la base l

$$R_s = 2 \frac{(t_{r2} - t_{r1})}{(l_2 + l_1)}$$

Plus la résolution est grande, meilleure est la séparation Deux pics sont bien résolus, si $R \geq 1,5$ (Fig.10).

Pour des valeurs de R_s beaucoup plus grande que 1, la séparation des pics n'est pas meilleure, mais le temps de la séparation devient inutilement long.

La résolution est une mesure de la qualité d'une séparation et pour l'optimiser, il est important de relier les facteurs de sélectivité et capacité à la résolution.

En supposant $l_1=l_2$, en combinant les expressions on obtient la relation de Purnell :

$$R_s = \frac{1}{4} \cdot \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \cdot \frac{k'_2}{(k'_1 + 1)} \cdot \sqrt{N_2}$$

On pourra améliorer une séparation en faisant varier l'un au moins des trois facteurs précédents.

X. EQUATION DE VAN DEEMTER

L'équation ci-dessus correspond à celle proposée par Van Deemter et al. (1956) pour la chromatographie en phase gazeuse

$$H = A + \frac{A}{B} + C \cdot U$$

La courbe représentant l'équation de Van Deemter est donc une hyperbole ou A, B, C sont des constantes.

u: vitesse moyenne de la phase mobile (gaz vecteur).

A : est l'influence de la diffusion turbulente due aux hétérogénéités dans l'écoulement.

B : est un facteur de la diffusion moléculaire dans la phase mobile.

C : dépend de la résistance au transfert de masse en phase liquide

Le tracé de la courbe HEPT en fonction de la vitesse moyenne du gaz vecteur, permet de déterminer le débit minimum donnant la meilleure efficacité de la colonne.

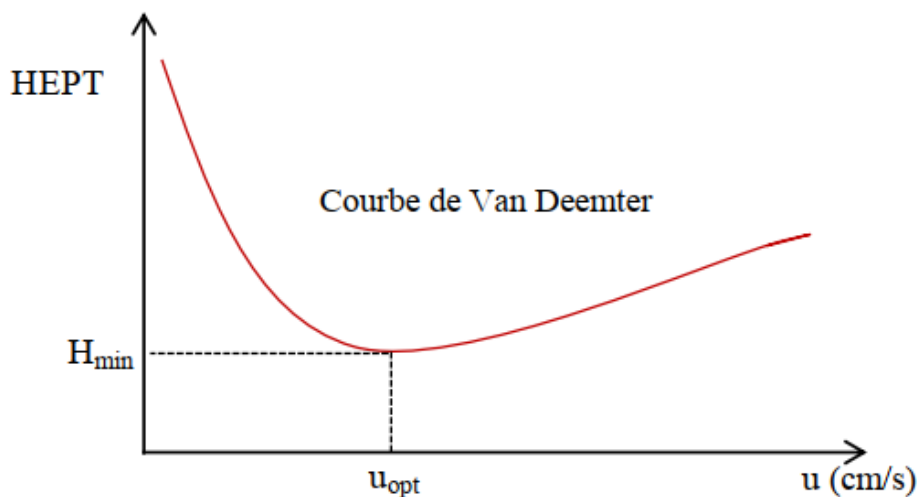


Fig.10: Courbe de Van Deemter.

Variation de la hauteur d'un plateau théorique en fonction de la vitesse moyenne du gaz vecteur, aux faibles valeurs de u , le terme B/u prédomine (la courbe devient asymptote à une droite de pente négative) et explique la perte d'efficacité vers les très faibles vitesses. Aux grandes vitesses, le terme $C.u$ prédomine (la courbe devient asymptote à une droite de pente positive) et explique la perte d'efficacité aux très grandes vitesses. Dans la région intermédiaire, le terme A est prépondérant et H passe par un minimum (H_{\min}). Elle montre que la variation de H en fonction de u passe par une valeur minimale calculée en cherchant la valeur de u correspondant à l'annulation de la dérivée première de cette fonction :

$$U_{opt} = \sqrt{B/C}$$

XI. OPTIMISATION D'UNE ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE

La résolution et le temps d'élution sont les deux variables dépendantes les plus importantes à considérer. Dans toute optimisation, le but est de réussir une séparation suffisante des composés intéressants en un minimum de temps. Dans la pratique, on s'efforcera d'abord de choisir les conditions chimiques de la séparation (nature et composition chimique de la phase stationnaire, nature et composition chimique de l'éluant, modification éventuelle des produits à séparer) pour que le facteur de sélectivité ne soit pas trop proche de 1 et pour que les facteurs de capacité soient compris entre 1 et 10.

EXERCICES CORRIGES

Exercice 1 :

- Quels paramètres pourrait-on varier pour changer la résolution de deux pics trop proches ?
- Après optimisation d'une élution isocratique avec différents solvants, la résolution de deux pics est de 1,2. Comment peut-on améliorer la résolution sans changer les solvants d'élution ni le type de phase stationnaire ?

Solution :

- Force du solvant, Température, pH, Utiliser des solvants différents, Changer de phase stationnaire.
- Diminuer le débit, Température, Augmenter la longueur de colonne, Utiliser des particules plus petites.

Exercice 2 :

- Des composés aromatiques non polaires sont séparés par HPLC. La phase stationnaire est une phase inverse C18 constituée de greffons de chaînes aliphatiques à 18 carbones. L'éluant utilisé est un mélange 65% méthanol / 35% H₂O. Comment les temps de rétention seraient-ils modifiés en utilisant un mélange avec 90% de méthanol ?
- Deux composés, octanoic acid et 1-aminooctane, sont chromatographiés sur la même colonne HPLC décrite en (a) et en utilisant comme éluant un mélange 20% méthanol / 80% tampon (pH 3.0).

Lequel des deux composés sera élué en premier ? Pourquoi ?

$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ *Octanoic acid*

$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ *1-aminooctane*

Solution :

- Temps de rétention plus courts.
- Composé élué en premier: *1-aminooctane*

Exercice 3 :

Quel est l'ordre d'élution des acides suivants en HPLC avec une colonne dont la phase stationnaire est de type C18 et comme phase mobile un tampon formiate pH 9 (C = 200 mM) ?

*1 *acide linoléique* $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$

2 *acide arachidique* $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}_2\text{H}$

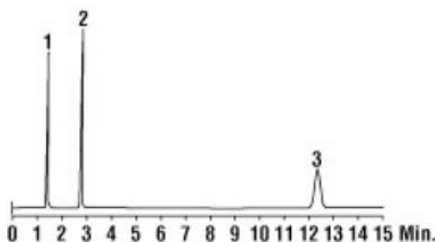
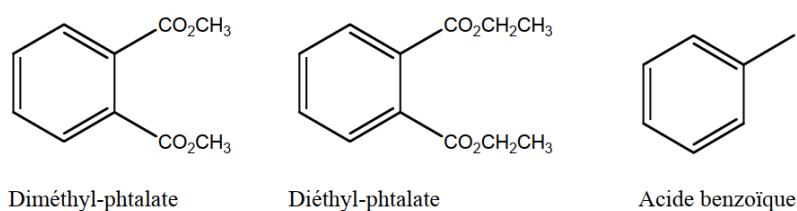
3 *acide oléique* $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2$

Solution :

Ordre d'élution : 1, 3, 2.

Exercice 4

Conditions expérimentales : la colonne a 4 mm de diamètre, 150 mm de long. Le débit est de 1 mL/min. La phase stationnaire C18 est constituée de greffons de chaîne saliphatiques à 18 carbones. L'élution est faite par un mélange isocratique de méthanol (58%) et d'eau (42%) avec 1% d'acide acétique.



A quels pics correspondent les composés représentés ci-dessus ? Expliquer l'ordre d'élution.

Solution :

Acide benzoïque – diméthylphtalate – diéthylphtalate

Exercice 5 :

a. Vous essayez de séparer un mélange inconnu par chromatographie en phase inverse avec un éluant 50% acetonitrile/ 50% H₂O. Les pics obtenus sur le chromatogramme se chevauchent et sont élués dans le domaine $k' = 2-6$.

Pour améliorer la chromatographie de ce mélange, utiliseriez-vous une plus forte ou plus faible concentration en acetonitrile ?

b. Vous essayez de séparer de nouveau un mélange inconnu sur phase normale avec comme éluant : 50% hexane/ 50% methyl *t*-butyl ether. Les pics se chevauchent avec un k' compris entre 2 et 6.

Utiliseriez-vous une plus forte ou plus faible concentration d'hexane pour la prochaine chromatographie de ce mélange ?

Solution

- a. Phase inverse : apolaire → une plus faible concentration en acétonitrile
- b. Phase normale : polaire → une plus forte concentration en hexane

Exercice 6 :

Indiquer en regard de chacune de ces techniques chromatographiques, le terme qui représente le mode essentiel de fixation sur la phase.

- 1. phase inversée a. masse moléculaire
- 2. perméation de gel b. hydrophilie
- 3. chromatographie ionique c. hydrophobie
- 4. phase d. protonation/ionisation

Solution :

(1,c) phase inversée ; (2,a) perméation de gel ; (3,d) chrom. ionique ; (4,b) phase normale.

Exercice 7 :

On étudie par CLHP la séparation de deux composés A et B avec une colonne de type RP-18. La phase mobile est un mélange binaire d'eau et d'acétonitrile. On admettra qu'il existe une relation linéaire entre le logarithme du facteur de capacité et le pourcentage d'acétonitrile du mélange binaire eau/acétonitrile utilisé. À partir de 2 chromatogrammes obtenus l'un avec pour phase mobile un mélange eau/acétonitrile 70/30v/v et l'autre avec un mélange eau/acétonitrile 30/70v/v, les équations des deux droites sont :

pour le composé A : $\log k_A = -6,075 \times 10^{-3} (\% \text{ MeCN}) + 1,3283$

pour le composé B : $\log k_B = -0,0107 (\% \text{ MeCN}) + 1,5235$

- a. Trouver la composition de la phase binaire qui conduirait à un facteur de sélectivité de 1.
- b. On suppose que pour chaque composé, la largeur du pic correspondant sur le chromatogramme à mi-hauteur est la même et que l'efficacité de la colonne n'est pas modifiée suivant la composition de la phase mobile. La résolution entre les deux pics est-elle meilleure pour la phase mobile contenant 70 % d'eau ou 30 % d'eau ? Montrer l'intérêt pratique du choix précédent.

Solution :

a. Si α est égal à 1, les pics sont confondus, les temps de rétention sont identiques ce qui implique

que $k_A = k_B$, donc $\log k_A = \log k_B$. Le % en MeCN doit vérifier les deux expressions :

$-0,0107 [\% \text{ MeCN}] + 1,5235 = -6,075 \times 10^{-3} [\% \text{ MeCN}] + 1,3283$. On trouve $\text{MeCN} = 42,2 \%$;

b. Composé A : $k_{30} = 14$; $k_{70} = 8$; composé B : $k_{30} = 16$; $k_{70} = 6$. Pour 30 % de MeCN : $\alpha = 1,143$ et pour 70 % de MeCN : $\alpha = 1,333$. En appliquant la formule donnant la résolution en fonction de k et α , on trouve que le terme en α et k vaut 0,222 pour 70 % et 0,118 pour 30 %. Ainsi il est préférable d'utiliser la phase mobile à 70 % de MeCN (séparation beaucoup plus rapide).

Exercice 8 :

Calculer le facteur de séparation entre deux composés 1 et 2 dont les volumes de rétention sont respectivement égaux à 6 et 7 ml. Le volume mort de la colonne utilisé est de 1mL.

Solution :

$$\alpha = 1,2$$

Exercice 9 :

Une colonne tubulaire ouverte utilisée pour la séparation d'un mélange a un diamètre intérieur de 0,25 mm. On utilise une vitesse d'écoulement volumétrique de 1,0 mL/min.

Calculer la vitesse d'écoulement linéaire en cm/s à la sortie de la colonne.

Solution :

$$2037 \text{ cm/s}$$

Exercice 10 :

A une solution aqueuse d'iode de concentration 10g/L, on ajoute 10 mL de tétrachlorométhane (CCl_4). Déterminer la concentration en iode dans le tétrachlorométhane.

Donnée : Le coefficient de partage de l'iode entre les deux solvants: tétrachlorométhane et eau, est égal à 100 à 25 °C.

Solution :

$$[\text{I}_2]_{\text{H}_2\text{O}} = 0,09 \text{ g/L}; [\text{I}_2]_{\text{CCl}_4} = 9,9 \text{ g/L}$$

Exercice 12 :

Les coefficients de l'équation de Van Deemter sont déterminés à : $A = 10^{-3} \text{ cm}$, $B = 0,144 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, $C = 10^{-3} \text{ s}$

a. Quelle est la vitesse linéaire moyenne de la phase mobile qui minimise la hauteur d'un plateau théorique ?

b. Quel serait la hauteur minimale équivalente à un plateau théorique de la colonne ?

Solution

a) $u_{\text{opt}} = 12 \text{ cm.s}^{-1}$

b) $H_{\text{min}} = 0,025 \text{ cm}$

Exercice 13 :

Un mélange de deux composés A et B est séparé sur une colonne de 2 m. Calculer la résolution de la colonne.

Données expérimentales :

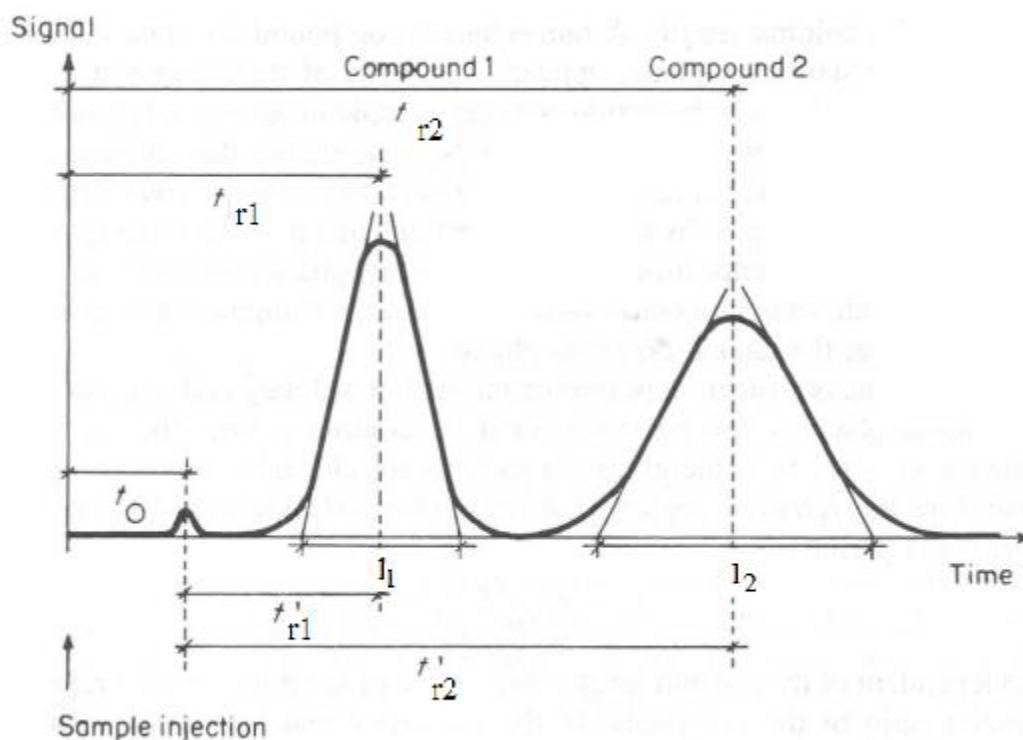
$$t_{rA} = 300 \text{ s} \quad l_A = 18,5 \text{ s}$$

$$t_{rB} = 320 \text{ s} \quad l_B = 21,5 \text{ s}$$

$$t_m = 60 \text{ s}$$

Solution

$R=1$ (mauvaise séparation)

Exercice 14 :

a. Définir les concepts suivants :

- Temps de rétention
- Temps mort
- Temps de rétention net
- Facteur de rétention
- Efficacité d'une colonne

- Hauteur efficace d'un plateau théorique

- Résolution chromatographique

- Facteur de séparation

b. Evaluer les proportions des solutés 1 et 2 dans la phase mobile et la phase stationnaire.

c. Calculer les facteurs de séparation des deux solutés.

Dans le cas où, que se passe-t-il ?

d. Calculer la résolution des solutés 1 et 2.

e. Calculer le nombre de plateaux théoriques du soluté élué en dernier.

Solution :

a. Voir cours

b. $t_0 = t_m = 12.5$ mm

$t_{r1} = 33.1$ mm

$t_{r2} = 70.5$ mm

- Temps de rétention : temps nécessaire pour éluer l'échantillon

$$t_{ri} = \frac{L}{u_i} = \frac{V_{ri}}{F_v}$$

- Temps mort : temps nécessaire pour l'élution des solutés non retenus

$$t_m = \frac{L}{u_m} = \frac{V_m}{F_v}$$

- Temps de rétention et : $t_{m,i} = t_{r,i} - t_m$

- Facteur de rétention : rapport des fractions des solutés entre la phase stationnaire et la phase mobile

$$k'_i = \frac{q_i}{p_i}$$

- Efficacité d'une colonne : elle est donnée par la résolution d'une colonne

$$R = \frac{\Delta t_r}{l}$$

- Hauteur efficace d'un plateau théorique : rapport entre variance et premier moment. C'est la longueur de la colonne divisée par le nombre de plateaux

théoriques

$$HETP = \frac{L}{N}$$

- Facteur de séparation: rapport entre les facteurs de rétention de deux solutés

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \quad \alpha \geq 1$$

a. Facteur de rétention:

$$k'_i = \frac{q_i}{p_i}$$

Où q_i est la fraction de soluté i retenue dans la phase stationnaire et p_i la fraction de soluté i dans la phase mobile.

D'où,

$$k' = \frac{1 - V_m/V_{r,i}}{V_m/V_{r,i}} = \frac{V_{rn,i}}{V_m} = \frac{t_{rn,i}}{t_m}$$

$$p_i = \frac{1}{1 + \frac{t_{rn,i}}{t_m}}$$

Donc, $p_1 \approx 0.38$ $q_1 \approx 0.62$
 $p_2 \approx 0.18$ $q_2 \approx 0.82$

c. Facteur de séparation α :

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t_{r2} - t_m}{t_{r1} - t_m}$$

D'où, $\alpha = 2,9$

Dans le cas où $\alpha=1$, la séparation des deux solutés est impossible. Ils sont élués en même temps.

d. Résolution R :

$$R = \frac{\Delta t_R}{w} = 2 \frac{t_{r2} - t_{r1}}{l_1 + l_2}$$

D'où $R \approx 1.6$

e. Nombre de plateaux théoriques du soluté élué en dernier, soit le soluté 2 :

$$N = 16 \cdot (t_{r2}/l_2)^2 \approx 94$$

Exercice 15 :

Deux substances A et B ont des temps de rétention respectivement de 16,40 min et 17,63 min sur une colonne de 30 cm de long. Le temps mort de la colonne est de 1,30 min. Les largeurs de pic à la base sont respectivement 1,11 et 1,21 min.

a. Calculer la résolution de la colonne, le nombre de plateaux théoriques et la hauteur de plateau théorique équivalente.

b. Pour améliorer les performances de la séparation, on peut allonger la colonne ou améliorer le pouvoir de rétention de la phase stationnaire. Afin de quantifier ces deux approches, effectuer les calculs suivants :

- La longueur de colonne qu'il faudrait utiliser pour avoir une résolution de 1,5 ?
- Le temps de rétention qu'aurait B sur cette nouvelle colonne ?
- La HETP nécessaire pour obtenir une résolution de 1,5 avec une colonne de 30 cm et les temps de rétention donnés ci-dessus ?

Solution

a. Définition de la résolution chromatographique :

$$R = \frac{\Delta R}{l} = \frac{2(t_{r1} - t_{r2})}{w_1 + w_2} = \frac{2(17,63 - 16,04)}{1,11 + 1,21} = 1,06$$

Nombre de plateaux théoriques :

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{l}\right)^2 = 16 \left(\frac{16,40}{1,11}\right)^2 = 3493$$

et

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{l}\right)^2 = 16 \left(\frac{17,63}{1,21}\right)^2 = 3397$$

et

$$N_{moy} = 3445$$

Hauteur équivalente de plateau théorique :

$$HEPT = \frac{L}{N} = 8,7 \cdot 10^{-3} \text{ cm}$$

b. Relation de Purnell :

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k'_2}{1 + k'_2} \Rightarrow R \text{ est proportionnel à } \sqrt{N}$$
$$\frac{R'}{R} = \frac{\sqrt{N'}}{\sqrt{N}} \Rightarrow \frac{1.5}{1.06} = \frac{\sqrt{N'}}{\sqrt{3445}} \Rightarrow N' = 6899$$

donc : $L' = N' \cdot HEPT = 6899 \cdot 8,7 = 60 \text{ cm}$

Temps de rétention de B sur la nouvelle colonne :

$$t'_{rB} = t_{rB} \cdot \frac{L'}{L} \Rightarrow t'_{rB} = 17,63 \cdot \frac{60}{30} = 35,26 \text{ min}$$

\Rightarrow temps de rétention doublé !

Hauteur HEPT pour une résolution 1,5 et une colonne de 30 cm :

$$HEPT' = \frac{L}{N'} = 4,3 \cdot 10^{-3} \text{ cm}$$

Exercice 16 :

Quatre solutés A, B, C et D sont séparés par HPLC (High Pressure Liquid Chromatography).

Leurs facteurs de rétention sont les suivants :

$$k_a = 0,75$$

$$k_b = 1,54$$

$$k_c = 2,38$$

$$k_d = 3,84$$

Est-ce que la séparation de ces quatre solutés peut également être accomplie à basse pression avec une colonne de seulement 300 plateaux, avec le même système de phase et une résolution minimale de 1 ? Justifier.

Solution

Pour évaluer si la séparation des quatre solutés est réalisable, il faut regarder si les pics les moins bien résolus en HPLC seront ou non suffisamment résolus à basse pression.

Pour cela, on calcule les facteurs de séparation entre les différents solutés obtenus en HPLC :

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t_{r2} - t_m}{t_{r1} - t_m}$$

Doù :

$$\alpha_{AB} = 2,05$$

$$\alpha_{BC} = 1,55$$

$$\alpha_{CD} = 1,61$$

La paire de pics la moins bien résolue est BC donc le facteur de séparation critique est 1,55

Donc, dans la nouvelle colonne, on considère les données suivantes :

$$\alpha = 1,55$$

$$R = 1$$

Pour déterminer si la séparation des solutés est réalisable à basse pression, il faut évaluer le nombre de plateaux théoriques minimum pour séparer nos solutés B et C.

$$\bar{k}' = \frac{1,54 + 2,38}{2} = 1,96$$

$$R = \frac{\sqrt{N_{\min}}}{2} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha + 1} \right) \left(\frac{\bar{k}'}{1 + \bar{k}'} \right)$$

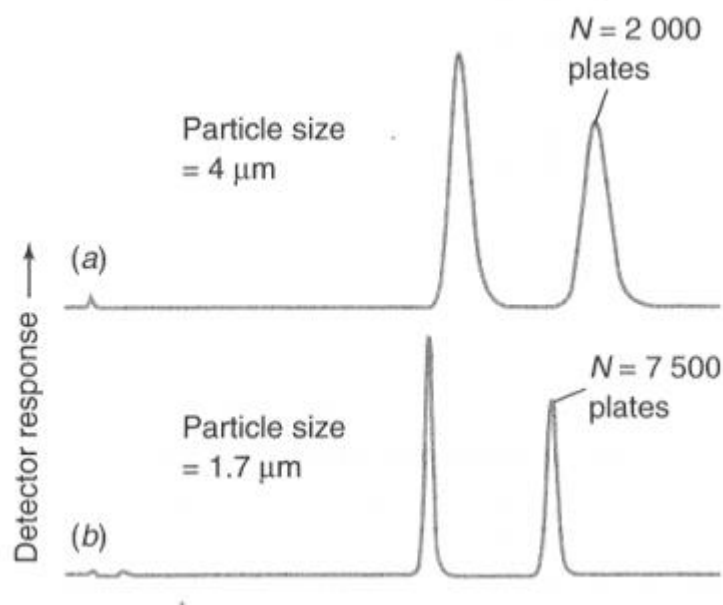
$$\sqrt{N_{\min}} = 2R \left(\frac{\alpha + 1}{\alpha - 1} \right) \left(\frac{1 + \bar{k}'}{\bar{k}'} \right) = 14$$

$$N_{\min} = 14^2 = 196$$

Il faut au minimum une colonne à 196 plateaux pour séparer les solutés les moins résolus B et C. Donc la séparation à basse pression est possible.

Exercice 17 :

Un même échantillon est chromatographié en HPLC avec une colonne de 5 cm avec phase inverse C18. Entre les chromatogrammes a et b, uniquement la taille des particules remplissant la colonne diffère : 4 μm (figure a) et 1,7 μm (figure b).



a. Comment évolue l'efficacité de la colonne lorsque la taille des particules diminue ? Justifier.

En général, les particules de silice occupent environ 40% du volume de la colonne et le solvant environ 60%.

La colonne (figure a) a un diamètre interne de 4,6 mm et est utilisée à un débit, D_v , de 3 mL/min. Le volume d'échantillon injecté dans la colonne est de 20 μ L.

La colonne (figure b) a un diamètre $d_c = 2,1$ mm.

b. Quel débit doit être utilisé dans la configuration de colonne b (figure b) afin d'obtenir la même vitesse linéaire, D_x , que la colonne a ?

Quel volume d'échantillon devra être injecté dans la colonne b ?

Solution :

a. L'efficacité d'une colonne remplie augmente lorsque la taille des particules diminue.

b. $D_v(\text{petite colonne}) = 0,62 \text{ mL} / \text{min}$

$vol_{inj} = 4,2 \mu\text{L}$

Exercice 18 :

Pour séparer un mélange de protéines, on utilise une colonne comportant une phase à base de cellulose carboxyméthylée. Le diamètre interne de la colonne est de 0,75 cm et sa longueur 20 cm. Le pH de la phase mobile est ajusté à 4,8. Le débit de la phase mobile est réglé à 1 mL/min. Le volume mort est de 3 mL. On note qu'il apparaît trois pics correspondant aux volumes d'élution V_1 à V_3 de 12, 18 et 34 mL.

a. S'agit-il d'une phase anionique ou, au contraire de type cationique ?

b. Pourquoi en augmentant le pH de la phase mobile, modifie-t-on notablement les temps de rétention de ces trois composés ? Prédire si ces temps vont être augmentés ou diminués.

Solution :

a. Cationique

b. Les temps de rétention vont être diminués.

Exercice 19 :

Pour les séries d'ions suivantes

a. Cl^- , I^- , F^- , Br^-) La^{3+} , Na^+ , Ca^{2+} , Th^{4+}

c. Na^+ , K^+ , Li^+ , Cs^+ , Rb^+

d. Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Be^{2+} , Sr^{2+}

1. Proposer un système de chromatographie ionique pour les séparer (phase stationnaire).

2. Prédire l'ordre d'élution.

Solution

1. Colonne "cationique"

Ex: Polymères greffés avec des groupements carboxyméthyls ou sulfonates...

Colonne "anionique"

Ex: Polymères greffés avec des groupements ammonium...

2. Ordre d'éluion:

a. F⁻, Cl⁻, Br⁻, I⁻) Na⁺, Ca²⁺, La³⁺, Th⁴⁺

c. Li⁺, Na⁺, K⁺, Rb⁺, Cs⁺

d. Be²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺

Exercice 20 :

La carboxyméthylcellulose (CM-cellulose) est un support pour colonne échangeuse de cations. Elle est obtenue en substituant la cellulose par des groupements carboxyméthyls (-CH₂-COOH).

1. Quelle est la proportion des groupements carboxyméthyls chargés négativement aux pH suivants : 1 - 4,76 - 7 - 9 (on considérera que le pKa du groupement COOH des carboxyméthyls est 4,76) ?

2. Parmi les protéines suivantes : ovalbumine (pHi = 4,6), cytochrome c (pHi = 10,65) et lysozyme (pHi = 11), quelles sont celles qui sont retenues par la CMcellulose à pH 7 ? (on considérera que les interactions protéine/CM-cellulosesont uniquement d'ordre électrostatiques).

Solution

1. Proportion des groupements carboxyméthyls chargés négativement :

La relation entre le pH et le pKa est donnée par :

$$pH = pKa + \log \frac{(base)}{(acide)}$$

$$pH = pKa + \log \frac{(-CH_2 - COO^-)}{(-CH_2 - COOH)}$$

$$\underline{pH = 1}$$

$$\log \frac{(base)}{(acide)} = pH - pKa \quad \Rightarrow \quad \frac{(base)}{(acide)} = 1,74 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Or } (acide) + (base) = 100\% \quad \Rightarrow \quad (acide) = 99,98\% \text{ et } (base) = 0,02\%$$

$$\underline{pH = 4,76}$$

$$(acide) = 50\% \text{ et } (base) = 50\%$$

$$\underline{pH = 7}$$

$$(acide) = 0,575\% \text{ et } (base) = 99,425\%$$

$$\underline{pH = 9}$$

$$(acide) = 5,73 \cdot 10^{-3}\% \text{ et } (base) = 99,994\%$$

Globalement, pour un pH < pKa (pH acide), les groupements carboxyméthyls sont majoritairement sous forme acide (-CH₂-COOH). Pour un pH > pKa (pH basique), les

groupements carboxyméthyles sont majoritairement sous forme basique ($-\text{CH}_2\text{-COO}^-$).

2. A pH 7, on a montré que la résine était à 99,425% sous forme basique, chargée négativement ($-\text{CH}_2\text{-COO}^-$).

Protéine	pHi	Charge à pH = 7
Ovalbumine	4,6	-
Cytochrome c	10,65	+
Lysozyme	11	+

Ainsi seule l'ovalbumine qui, à pH 7, est chargée négativement, ne sera pas retenue sur la colonne. Le cytochrome c et le lysozyme resteront fixés.

Exercice

21

:

Une colonne de filtration sur gel a un rayon r de 0,80 cm et une longueur l de 20 cm.

- Calculer le volume de la colonne.
- Le volume V_i de la phase mobile en dehors des particules du gel est de 18,1 ml et le volume total de la phase mobile est de 35,8 ml. Déterminer le coefficient K pour un soluté élué à 27,4 mL.

Solution

a. Volume de la colonne :

$$V = \pi r^2 l = 40,2 \text{ mL}$$

b.

$$V_e = V_i + K V_p$$

$$K = \frac{V_e - V_i}{V_p} = 0,52$$

c. Les molécules doivent s'adsorber aux particules.

Exercice 22 :

Une colonne HPLC d'exclusion moléculaire avec résine polystyrène a un diamètre de 7,8 mm et une longueur de 30 cm. La proportion solide des particules du gel occupe 20% du volume, les pores occupent 40% et le volume entre les particules 40%.

- A quel volume les molécules totalement exclues sortiraient de la colonne ?
- A quel volume sortiraient les plus petites molécules ?
- Un mélange de polyéthylène glycols de masses moléculaires différentes est élué entre 23 et 27 mL. Qu'est-ce que cela implique concernant les mécanismes de rétention de ces solutés dans la colonne ?

Solution :

Volume de la colonne :

$$V = \pi r^2 l$$

$$V = 14,33 \text{ mL}$$

$$V_p = 5,73 \text{ mL (40\%)}$$

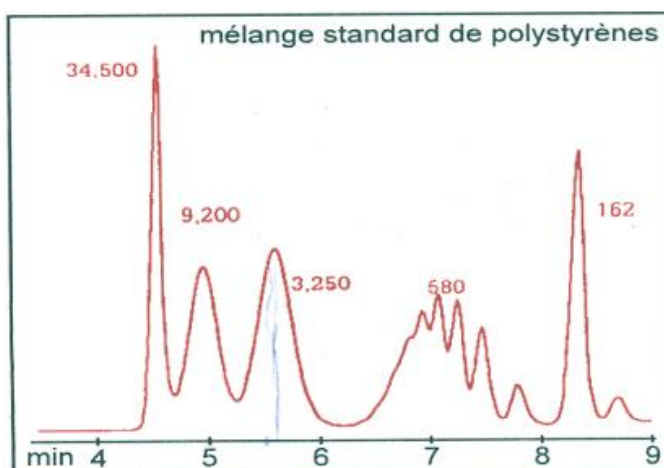
$$V_i = 5,75 \text{ mL (40\%)}$$

Exercice 23 :

On chromatographie une solution dans le tétrahydrofurane (THF) d'un mélange de polystyrènes de masses moléculaires connues sur une colonne (I.D=7.5mm, L=300mm) dont le domaine de perméation s'étend de 400 à 30 000 daltons. La phase éluante est du THF. Son débit est 1mL/min. La détection UV est effectuée à 254nm.

A partir du chromatogramme obtenu reproduit ci-après :

- Calculer le volume d'exclusion total (volume interstitiel) et le volume des pores de la colonne utilisée.
- Calculer le coefficient de diffusion K pour le composé de masse 3250 Da.
- On observe quelquefois en chromatographie d'exclusion stérique des valeurs de K supérieures à 1. Interpréter ce phénomène.



Solution :

- La plus grosse molécule (34500 Da) est éluée à 4,5 min.

Débit de la colonne: 1 mL.min⁻¹ Donc, $V_i = 4,5 \text{ mL}$

La plus petite molécule (162 Da) est éluée à 8,25 min.

$$V_m = V_i + V_p = 8,25 \text{ mL} \quad V_p = 3,75 \text{ mL}$$

- Pour le composé à 3250 Da: $V_e = 5,6 \text{ mL}$

$$K = \frac{V_e - V_i}{V_p} = 0,29$$

- Si $K > 1$, interactions entre le soluté et la phase stationnaire. Phénomène de partition qui se superpose à la diffusion dans les pores.

Exercice 24 :

Les composés suivants sont séparés par chromatographie d'exclusion stérique.

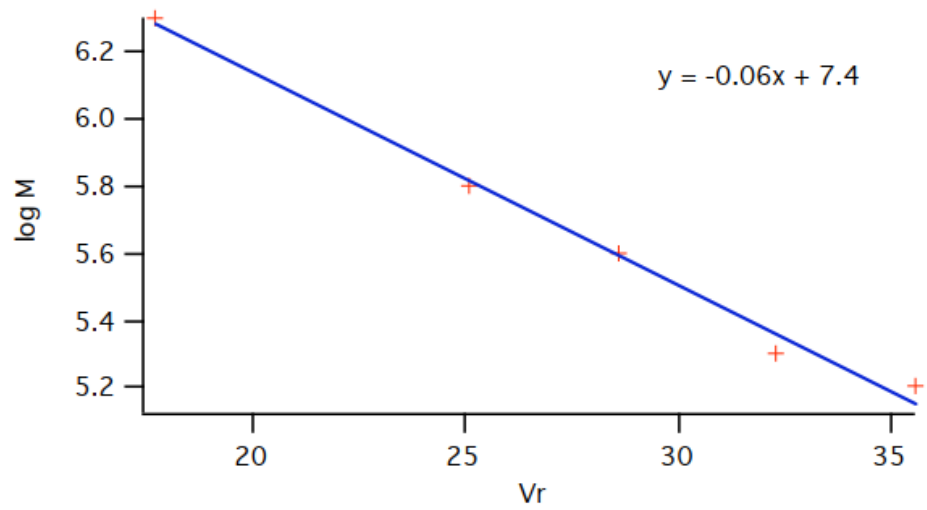
- Par quelle méthode peut-on évaluer la masse moléculaire de composés inconnus ?
- Estimer la masse moléculaire du soluté inconnu.

Composés	V _r (mL)	Masse moléculaire (Da)
Blue Dextran 2000	17,7	2.10 ⁶
Aldolase	35,6	158000
Catalase	32,3	210000
Ferritin	28,6	440000
Thyroglobulin	25,1	669000
Inconnu	30,3	?

Solution :

- Représentation log M en fonction du volume d'élution.

Composés	V _r (mL)	Masse moléculaire (Da)	Log M
Blue Dextran 2000	17,7	2.10 ⁶	6,3
Aldolase	35,6	158000	5,2
Catalase	32,3	210000	5,3
Ferritin	28,6	440000	5,6
Thyroglobulin	25,1	669000	5,8
Inconnu	30,3	?	-



b. Soluté inconnu: $V_r = 30,3$ mL

$$\log M = -(0,06 \cdot 30,3) + 7,4 = 5,6 \quad M = 400000 \text{ Da}$$

CHAPITRE VI : CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE CPG



I. INTRODUCTION

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique très répandue, dont les premières applications sont maintenant vieilles de plus d'un siècle. Son développement qui n'a cessé depuis, est dû à son extrême sensibilité, à sa polyvalence, à la rapidité de mise au point des analyses nouvelles et aux possibilités d'automatisation, qui augmentent encore plus son intérêt.

II. PRINCIPE

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode de séparation dont les principes généraux sont les mêmes que ceux pour la chromatographie en général, c'est-à-dire fondés sur la migration différentielle des constituants du mélange à analyser au travers d'un support choisi. La phase stationnaire liquide (C.G.L) ou parfois solide (C.G.S) placée à l'intérieure d'une colonne.

- ❖ C.G.S : La phase mobile est un gaz et la phase stationnaire est un solide qui retient les analytes par adsorption physique.
- ❖ C.G.L : C'est une chromatographie de partage, la phase mobile est un gaz et la phase stationnaire est un liquide qui est immobilisé sur la surface d'un support inerte par adhésion ou par liaison chimique.

La particularité du procédé est d'opérer en totalité sur des produits volatilisés, ce qui implique de maintenir une température minimale convenable, mais sans qu'il y ait décomposition des solutés, et de travailler en circuit étanche aux gaz.

Un grand nombre de molécules organiques peuvent ainsi être séparées directement ou après transformation lorsqu'elles sont thermolabiles ou peu volatiles.

La très grande sensibilité des détecteurs permet de déceler des quantités de l'ordre du picogramme pour certains composés. Les applications sont très nombreuses dans tous les domaines et les développements de la chromatographie gazeuse à grande vitesse ou multidimensionnelle rendent cette technique toujours plus attractive.

III. DESCRIPTION D'UN CHROMATOGRAPHE EN PHASE GAZEUSE

III.1. Schéma d'appareillage

Un appareil de CPG comprend schématiquement 5 modules spécifiques (Fig.1): une source de gaz (1), un injecteur (2), une colonne (3) contenue dans une enceinte thermostatée (four) (4) et un détecteur (5) relié à un intégrateur ou un ordinateur sur lequel apparaît le chromatogramme.

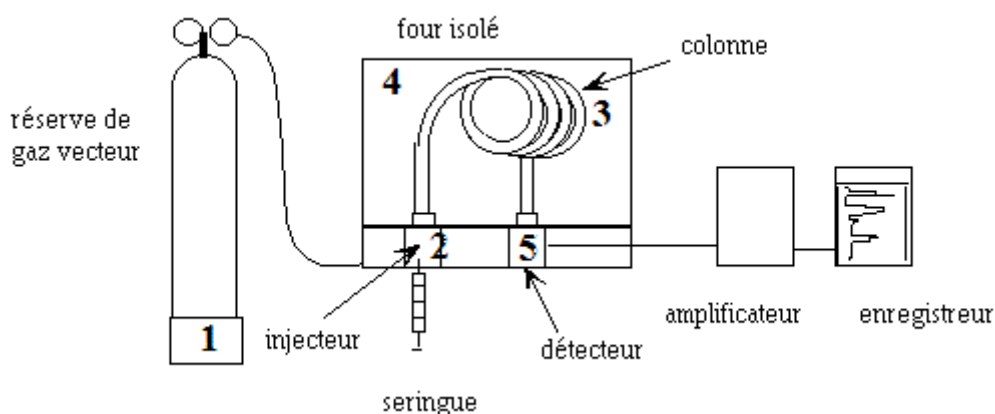


Fig.1 :Appareillage de chromatographie en phase gazeuse

III.2. Réserve de gaz vecteur

Le gaz conservé dans des bouteilles métallique (Fig.2) sous forte pression est introduit après passage par un détendeur dans le système chromatographique sous une pression allant de 1 à 4 bars.

La qualité de la chromatographie dépend du débit de ce gaz. Les gaz utilisés doivent répondre à un certain nombre d'exigences :

- ✓ Très grande pureté
- ✓ Inertie vis-à-vis des substances à chromatographier
- ✓ Très faible viscosité



Le choix du gaz vecteur dépend parfois du détecteur : exemple le catharomètre nécessite l'hélium ou l'hydrogène. Le détecteur à ionisation de flamme (D.I.F) nécessite l'emploi d'azote.

III.3. chambre d'injection

Le mélange à introduire dans un chromatographe à l'aide d'une micro seringue (1 à 10 μ l), sans interrompre le flux gazeux, peut être sous forme d'un gaz ou d'un liquide, pourvu que, dans ce dernier cas, la vaporisation totale soit assurée de façon aussi instantanée que possible.

III.3.1. Injecteur split / splitless

-Injecteur avec système de fuite- (Fig.2)

Une grande partie de l'échantillon injecté, vaporisé et mélangé au gaz vecteur est éliminée de l'injecteur par une vanne de fuite. Ainsi, une petite fraction du mélange pénètre dans la colonne. Il existe deux modes selon que l'on injecte vanne de fuite ouverte (mode split) ou vanne fermée pendant environ 1 minute après l'injection (mode splitless).

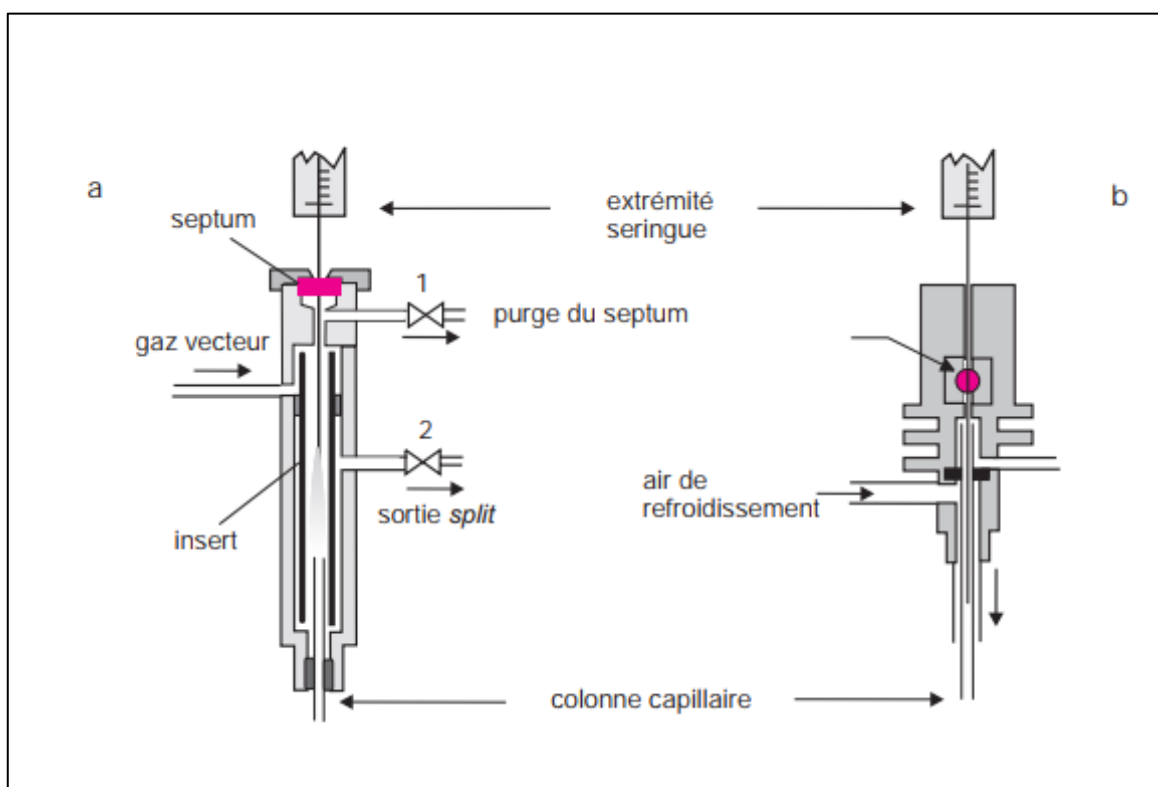


Fig. 2 : Injecteurs ; à gauche, chambre d'injection avec diviseur split et à droite *splitless*.

III.3.2. Injecteur à vaporisation directe -on column

Pour les colonnes remplies et les colonnes capillaires de gros diamètre. Tout l'échantillon introduit par la seringue est entièrement entraîné dans la colonne à froid (40° C). Les chambres de

vaporisation sont portées à une température supérieure à celle de la colonne pour que l'échantillon soit volatilisé immédiatement pour être introduit le plus rapidement possible.

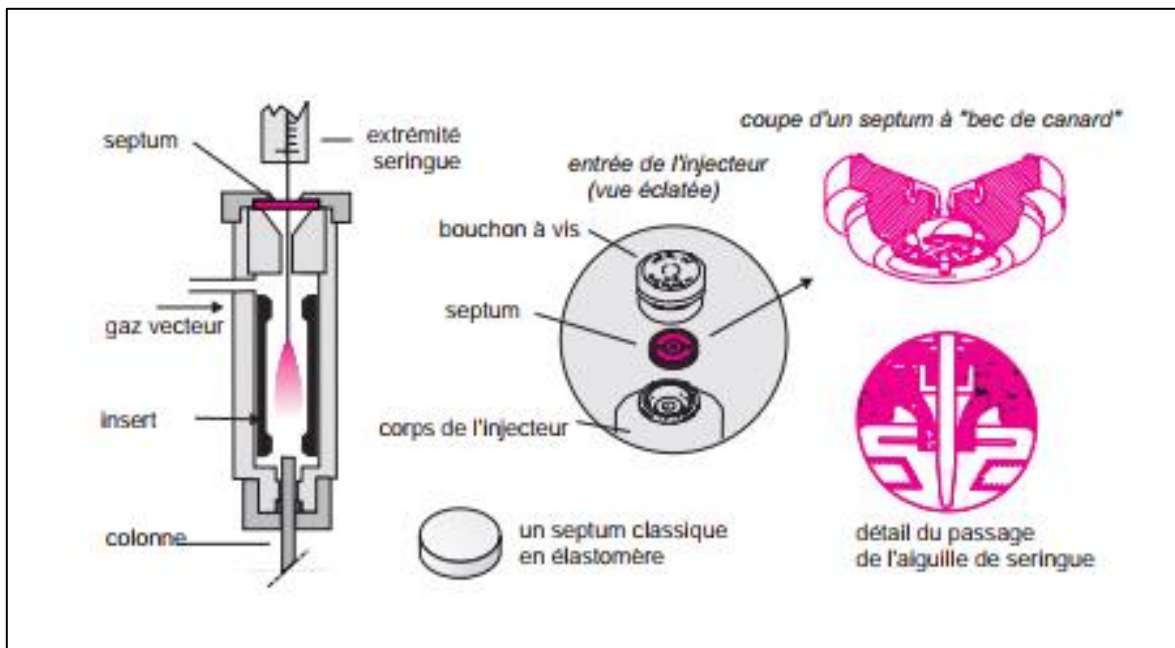


Fig. 3 : Injecteur à vaporisation directe utilisé pour colonnes remplies.

III.3.3. Injecteur à température programmable –PTV-

Programmation de la température de la chambre d'injection de 20 à 300°C en quelques dizaines de secondes : conjugue les avantages de l'injecteur split/splitless et de l'injecteur "on column" : possibilité d'injecter à froid, en mode split, avec une seringue "classique".

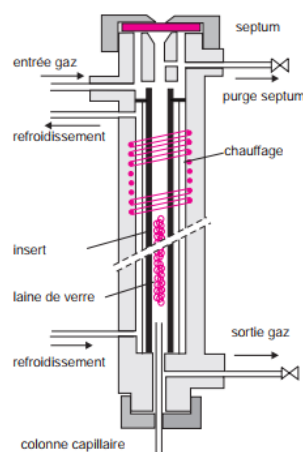


Fig.4 : Injecteur PTV, à température programmable.

III.4. Four

Les colonnes sont placées dans des enceintes chauffées appelées four dont la température peut-être réglée au 1/10^{ème} de °C près.

La température du four peut-être :

- ✓ stable et identique du début à la fin de la manipulation (= conditions isothermes)
- ✓ programmée par palier successif (= en gradients)

III.5. Colonnes

Elles contiennent la phase stationnaire. Elles se présentent sous forme de tubes fins enroulés.

Il existe deux types de colonnes :

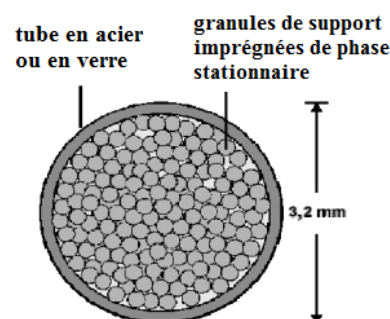


III.5.1. Les colonnes remplies

- matériau : verre, téflon, acier

- caractéristiques géométriques: d.i.=1-6 mm, L= 0,5 – 3 m, d.p.= 60 –70 μm .

- le tube est rempli d'un support : Graphite (carbopack B) - Tamis moléculaire au carbone (carbox en 1000)-Polymères- Terre de diatomées (Chromsorb P)- Silice- Alumine - Zéolithes.

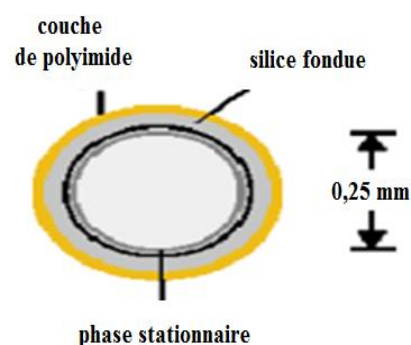


III.5.2. Les colonnes capillaires (à tube ouvert)

❖ **Colonnes tubulaires ouvertes** formées d'un tube de métal, de verre, de silice fondue ou de quartz.

d.i.=0,1 – 0,53 mm, L=5 –100 m, (25 m) enroulée en spirales de $\varnothing \approx 15$ cm.

La phase stationnaire (P. S) tapisse les parois internes, sous forme d'un film. $e_f = 0,1-5,5 \mu\text{m}$



Exemples P. S : hydrocarbures ramifiés (**Squalane**).

Les colonnes capillaires, se différencient entre elles par les caractéristiques de la phase stationnaire qui tapisse leur paroi interne : WCOT - SCOT - PLOT.

WCOT (Wall-coated open tubular column) : ou la phase stationnaire forme une pellicule liquide à l'intérieur du tube.

PLOT (Porous-layer open tubular) : la phase stationnaire solide est déposée en couche mince directement sur la paroi de la colonne.

SCOT : (Support-coated open tubular) column: le support inerte solide est déposé en couche mince et est imprégné de phase stationnaire liquide

-Les nouvelles colonnes **WCOT**, sont en silice fondue (très pure) (**FSOT** : Fused-SilicaOpen Tubularcolumn) recouvert d'une gaine extérieure en polyimide (thermiquement résistant).

Tableau 1 : Propriétés et caractéristiques de colonnes de chromatographie gazeuse

Caractéristiques	Type de colonne			
	FSOT	WCOT	SCOT	Remplie
Longueur en mètre	10-100	10-100	10-100	1-6
Diamètre interne en mm	0,1-0,3	0,25-0,75	0,5	2-4
Efficacité, plateaux/mètre	2000-4000	1000-4000	600-1200	500-1000
Taille de l'échantillon, ng	10-75	10-1000	10-1000	10-106
Vitesse relative	rapide	rapiderapide		lente
Inertie chimique	La meilleure			la moins bonne

❖ La phase stationnaire liquide

- En chromatographie gaz liquide C.G.L, la phase stationnaire liquide est immobilisée dans une colonne. Elle doit présenter les propriétés suivantes :

- ✓ Faible tension de vapeur (idéalement, le point E_b du liquide doit être au moins à 100 °C supérieur à la T_{max} d'utilisation de la colonne).
- ✓ Stabilité thermique.
- ✓ Inertie chimique.

Quelques phases stationnaires très utilisées

Le tableau (2) fournit une liste des phases stationnaires les plus utilisées dans les colonnes remplies et capillaires en chromatographie en phase gazeuse ; elles sont classées par ordre de polarité croissante. Ces six liquides peuvent conduire à des séparations très satisfaisantes.

Cinq des liquides sont des polysiloxanes, qui ont la structure générale

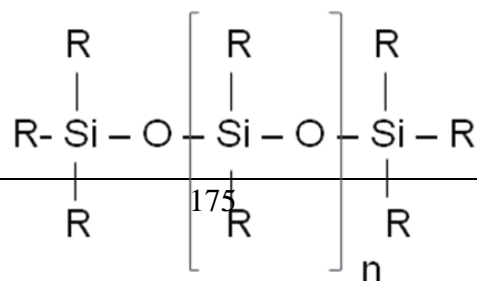


Tableau 2 : Quelques phases stationnaires liquides pour la C.G.L

Phase stationnaire	Nom commercial	T _{max} (C°)	Utilisation habituelle
polydiméthylsiloxane	OV-1,SE-30	350	phase non polaire à usage général ; hydrocarbures ; aromatiques polynucléaires ; médicaments ; stéroïdes ; PCB
5% phényl-polydiméthylsiloxane	OV-3,SE-52	350	ester méthyliques d'acides gras ; alcaloïdes ; médicaments ; composés halogénés.
50% phényl-polydiméthylsiloxane	OV-17	250	médicaments ; stéroïdes ; pesticides ; glycols
50% trifluoropropylpolydiméthylsiloxane	OV-210	200	chloroaromatiques ; nitroaromatiques ; alkylbenzène substitués.
Polyéthylène glycol	Carbowax 20M	250	acides libres ; alcools ; éthers ; huiles essentielles ; glycols.
50% cyanopropylpolydiméthylsiloxane.	OV-275	240	acides gras polyinsaturés ; acides de la colophane ; acides libres ; alcools.

III.6. Détecteurs

- ✓ Placés à l'extrémité des colonnes, les détecteurs décèlent la présence de substances dans le gaz vecteur au fur et à mesure de leur élution.
- ✓ Le choix du détecteur se fait en fonction de leur sensibilité et de leur spécificité.

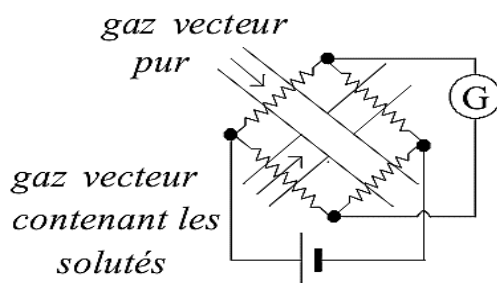
Performances du détecteur

Ils doivent de plus présenter un faible temps de réponse, une bonne reproductibilité, un domaine de linéarité étendu ; même pour des concentrations plus élevées, le signal doit être proportionnel aux quantités de substances présentes.

Il est également nécessaire qu'il puisse être porté à des températures aussi élevées que les colonnes pour éviter qu'à leur contact les vapeurs se condensent.

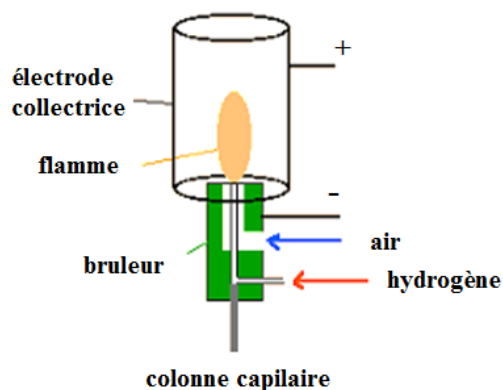
III.6.1. Détecteur à conductibilité thermique –TCD-ou Catharomètre

- ✓ Mesure des variations de la conductibilité thermique du gaz vecteur.
- ✓ La conductibilité d'un gaz vecteur est constante, en présence de molécules étrangères et en fonction de leur quantité cette conductibilité diminue.
- ✓ Universel.



III.6.2. Détecteur à ionisation de flamme : F.I.D -flamme ionisation detector-

- ✓ Le gaz vecteur arrive dans une flamme d'hydrogène brûlant dans l'air. Lorsque des molécules organiques sont présentes dans le gaz le nombre d'ions formés augmentent produisant une forte intensité de courant. Le courant d'ions proportionnels à leur nombre est recueilli par électrodes et transmis après amplification à l'enregistreur.
- ✓ C'est actuellement le détecteur le plus employé, il peut déceler pratiquement tous les composés combustibles c'est-à-dire organiques (quasi-universel).



III.6.3. Détecteur par capture d'électron -E.C.D-

Le gaz vecteur après avoir traversé la colonne arrive au détecteur où se trouve une source ionisante émettant des électrons de forte énergie, ceci provoque la formation d'électrons.

Ces électrons sont collectés par les électrodes auxquelles est appliquée une différence de potentiel. Un courant est ainsi produit.

Lorsque le gaz vecteur contient des substances électrophiles, les électrons sont captés et il se forme des ions négatifs ($AB + 1e^- \rightarrow AB^-$) le courant diminue. Ils sont spécifiques des composés halogénés, soufrés, phosphorés.

III.6.4 Couplage de la CPG à la Spectroscopie de Masse

Le spectromètre de masse est un des détecteurs les plus puissants pour la chromatographie gazeuse. On appelle aussi couplage de la chromatographie gaz à la spectroscopie de masse. Un spectromètre de masse mesure le rapport masse sur charge (m/z) des ions qui ont été produits à partir de l'échantillon par une source d'ionisation qui est assez énergétique pour briser des liaisons chimiques dans les molécules de l'échantillon et forme beaucoup de fragments ; qui sont très utiles pour identifier l'espèce moléculaire qui entre dans le spectromètre de masse à partir du spectre de fragmentation ou par comparaison avec bibliothèque de spectre.

❖ Les couplages et leurs domaines d'applications

Le domaine d'application du couplage CPG/SM est beaucoup plus restreint que les couplages LC/SM dont le domaine ne cesse de s'étendre notamment avec l'émergence d'interfaces de plus en plus performantes (récemment a été introduit sur le marché une interface ionisant grâce à des photons permettant l'ionisation de molécules plus apolaires). La CPG/SM s'adresse à des molécules dont la nature est plutôt apolaire et d'un poids moléculaire inférieur à environ 500 Daltons. Un autre phénomène restreint encore ce domaine il s'agit de la thermodénaturation que subissent certaines molécules alors même que leurs propriétés physico-chimiques permettent des analyses par CPG/SM. La CPG s'applique donc à des échantillons gazeux ou susceptibles d'être vaporisés sans décomposition dans l'injecteur, sont a priori exclues les substances polaires, les substances thermolabiles et les substances de haut poids moléculaire.

III.6.4.1 couplage CPG/SM en tandem (CPG/SM/SM)

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse en tandem est un des plus puissants outils d'identification de l'instrumentation analytique. Grâce à sa sélectivité et à sa sensibilité cette technique connaît un développement croissant La SM/SM

permet d'ajouter une troisième dimension au couplage CPG/SM (Fig. 5). Elle permet d'obtenir des spectres de masse purs.

Le couplage SM/SM en mode d'analyse des ions fils peut se comparer au couplage CPG/SM. Dans un CPG/SM la première étape correspond à l'injection du composé dans la colonne. L'étape analogue en SM/SM est l'introduction du composé dans la source d'ionisation. La seconde étape des deux schémas analytiques est la séparation d'une molécule des autres composés du mélange. Dans un CPG/SM la séparation des composés se déroule dans le temps, les molécules étant éluées de manière séquentielle selon des critères chimiques de polarité et de solubilité dans la phase stationnaire de la colonne. Dans un appareil réalisé sur la base d'un processus physique de séparation des ions selon leur rapport masse sur charge (m/z). Dans un CPG/SM la molécule séparée des autres constituants du mélange est ensuite ionisée dans la source d'ionisation du spectromètre de masse. En SM/SM l'espèce ionique séparée est transférée dans la cellule de fragmentation où elle est dissociée par collision. La dernière étape, l'identification, est réalisée par un analyseur de masse fonctionnant de manière identique dans les deux techniques, CPG/SM et SM/SM.

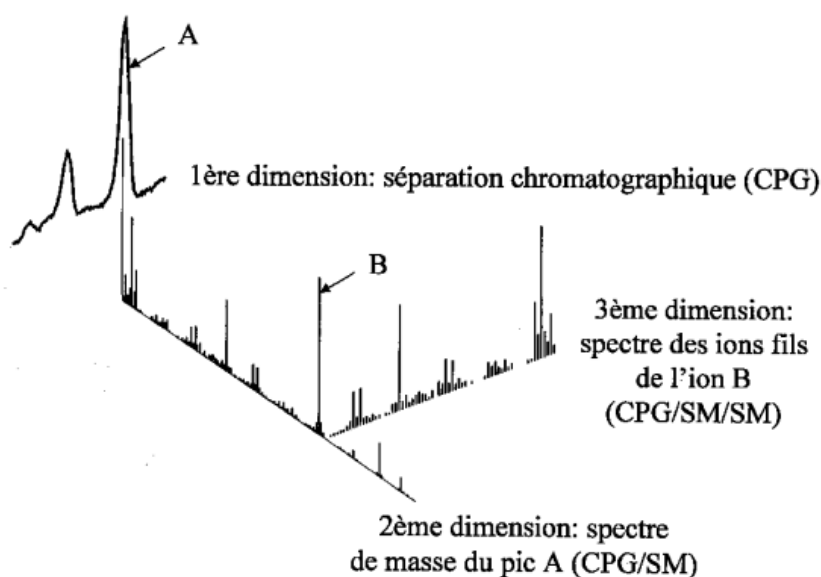


Fig.5 : Représentation schématique de la séparation et de l'identification des composés présents dans un mélange par couplage CPG/SM/SM.

Si la SM/SM offre à elle seule des capacités analytiques remarquables, son couplage avec une technique chromatographique (par exemple la CPG) permet de décupler ses possibilités en termes de sélectivité et de sensibilité. En effet, bien que les intensités absolues du signal et du bruit diminuent lorsque le nombre d'étapes analytiques augmente, la technique additionnelle

accroît la sélectivité, l'intensité du bruit chimique diminuant plus rapidement que celle du signal. Ainsi, une augmentation du nombre d'étapes analytiques résulte en une augmentation du rapport signal sur bruit et donc de la sensibilité. Associée au pouvoir séparatif de la CPG, la SM/SM permet l'identification et/ou la quantification de composés présents à l'état de traces dans des matrices complexes comme par exemple l'analyse de produits alimentaires (Fig.6). Le couplage CPG/SM/SM est ainsi particulièrement adapté à l'étude de problèmes rencontrés tant au niveau de l'assurance de qualité qu'au niveau du développement de nouveaux produits.

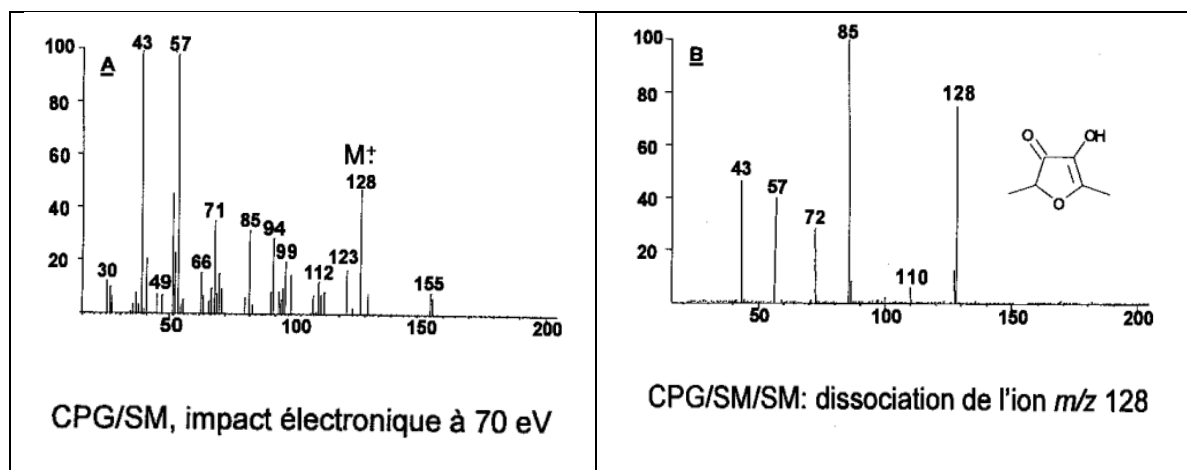


Fig.6 : Identification de la 4-hydroxy-2,5-diméthyl-3(2H)-furanone formée à partir de xylose et de glycine par CPG/SM et CPG/SM/SM. L'utilisation de la SM/SM permet d'obtenir un spectre de masse exempt de contamination.

III.6.4.2. Interface pour couplage CPG/SM

L'utilisation de colonnes capillaires en couplage chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse (CG/SM) s'est généralisée et les interfaces appropriées font partie de la configuration de base. Trois types d'interfaces pour colonnes capillaires sont généralement rencontrés :

- ❖ **Interface directe :** la totalité de l'effluent sortant de la colonne arrive dans la source d'ionisation. Une bonne sensibilité est obtenue mais le diamètre interne maximal permis pour la colonne dépend du débit de pompage. Pour la majorité des appareils le diamètre interne de la colonne capillaire doit être faible (les colonnes mégabores –Capillaires- ne peuvent généralement être utilisées). En outre, plus le diamètre interne est important, plus la résolution chromatographique est faible ;
- ✓ **l'interface « open-split » :** l'effluent sortant de la colonne chromatographique est dilué par un gaz de balayage additionnel ; une partie du mélange gazeux entre dans la chambre

d'ionisation par un tube capillaire qui fait office de restricteur ; le reste du mélange est aspiré par la pompe ;

- ✓ **le séparateur à jet** : la plus grande partie du gaz vecteur est éliminée ; il en résulte un enrichissement relatif de l'effluent en molécules à analyser.

L'interface la plus simple et la plus courante est l'interface directe. L'interface « open-split » et le séparateur à jet sont habituellement utilisés pour les colonnes de type mégabore.

❖ Ionisation

L'interface est indépendante de la chambre d'ionisation, dans laquelle les molécules sont ionisées par ionisation électronique (IE), ionisation chimique.

❖ Séparation des ions

Les spectromètres quadripolaires sont les plus courants et les moins onéreux.

III.7. Chromatographie Multidimensionnelle

En réunissant dans un montage particulier deux colonnes ayant des sélectivités différentes on peut associer des mécanismes de séparation distincts. Le dispositif permet de recueillir une fraction non résolue à l'issue de la première colonne pour la ré-injecter ensuite dans la seconde colonne. L'installation comporte donc deux détecteurs et une vanne d'introduction entre les deux colonnes (Fig.7).

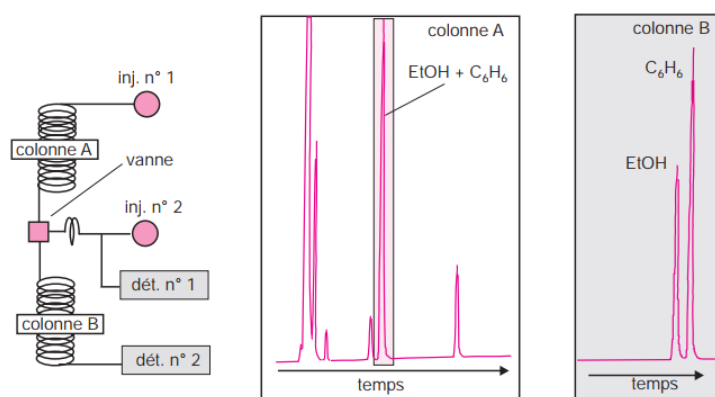


Fig.7 : Chromatographie bidimensionnelle et exemple de séparation en suivant ce procédé.

IV. CHOIX DES CONDITIONS OPERATOIRES

La bonne séparation des substances dépend essentiellement de leurs volumes ou distances de rétention et de la largeur de leurs pics.

Lorsque l'on désire améliorer une séparation, il est donc nécessaire d'agir sur ces grandeurs

V. FACTEURS INFLUENÇANT LES SEPARATIONS

V.1 Température

On peut opérer à température constante, comme on peut faire varier la température. Pour certains mélanges la séparation peut se faire en seule opération à température constante, souvent dans d'autres mélanges les distances de rétention des composés sont très différentes les uns des autres, dans ce cas la programmation de température permet d'obtenir de bonnes séparations. La chromatographie est commencée à une température suffisamment basse pour séparer correctement les composés les moins retenus, puis s'élève progressivement pour permettre l'élution des autres substances dans des temps plus rapides et sous forme de pics étroits.

V.2. Vitesse de la phase mobile

Nous avons montré lors de l'étude de la théorie cinétique, que la courbe de Van-Deemter permet de définir la valeur optimale de la vitesse d'écoulement de la phase mobile. Pour cette valeur optimale, la H.E.P.T est la plus basse et la colonne présente le plus grand nombre de plateaux théoriques.

V.3. Caractéristiques de la colonne

La colonne intervient dans les séparations par sa longueur et sa composition.

- ✓ longueur de la colonne : toutes les conditions précédentes, de température et de vitesse d'écoulement de la phase mobile étant considérés comme optimales, le nombre de plateaux théoriques est évidemment fonction de la longueur de la colonne. Par conséquent toute augmentation se traduit par un nombre de plateaux N supérieur.
- ✓ Composition de la colonne : la phase stationnaire doit être bien choisie pour prétendre à une bonne séparation.

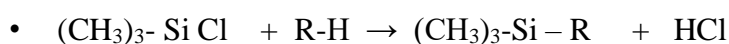
V.4. Formation de dérivés

L'injection directe dans le chromatographe de certains solutés ne permet pas toujours d'obtenir des séparations satisfaisantes quelles que soient les modifications tentées sur les facteurs précédents.

- ✓ Aussi est-il nécessaire de recourir à la transformation de substances, afin d'obtenir des dérivés beaucoup plus facilement séparables. Ce procédé est utilisé dans plusieurs cas :

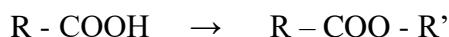
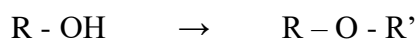
-
- ✓ Lorsque le point d'ébullition des substances est trop élevé : la formation d'ester ou d'amide facilite ainsi la chromatographie de dérivés carboxyliques peu volatils tels les acides aminés.
 - ✓ Pour modifier la polarité de composés trop polaires qui traînent sur les colonnes rendant toute interprétation quantitative impossible, dérivés hydroxylés, sucres etc.....
 - ✓ Pour augmenter la stabilité de composés fragiles aux températures nécessaire à leur séparation : hormones stéroïdiennes.
 - ✓ Pour améliorer la sensibilité et spécificité de la détection : formation de dérivés halogénés permettant la détection par capture d'électrons.
 - ✓ Les méthodes généralement mise en œuvre relèvent le plus souvent de trois types : La silylation, l'alcoylation et l'acylation.
 - **Silylation** : sous ce terme général, on regroupe un certain nombre de réactions ayant pour but de fixer un groupe triméthylsilyl $(\text{CH}_3)_3\text{Si-}$ T.M.S sur une molécule en le substituant à un hydrogène mobile ; cette substitution en empêchant la formation de liaisons hydrogène diminue la polarité des molécules, donc leur possibilité d'association, et augmente ainsi leur volatilité.

- Réactifs utilisés : se sont des dérivés du triméthyl silane $(\text{CH}_3)_3\text{Si-H}$ triméthylchloro silane T.M.C.S $(\text{CH}_3)_3\text{Si-Cl}$

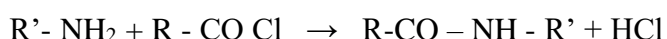
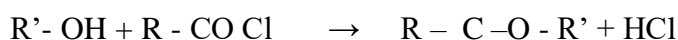


- R - H est un composé à hydrogène mobile : alcool, phénol, amine. Cette réaction s'effectue en milieu pyridiné ou en présence de diméthylformamide pour neutraliser HCl formé.

- **Alcoylation** : cette réaction a pour objet le remplacement d'un hydrogène mobile par un radical alcoyle et la transformation des alcools en éthers et des acides en esters.



- **Acylation** : les acides et surtout leurs précurseurs chlorures d'acide ou anhydrides d'acide donnent naissance au cation acylium R-C^+ qui réagit avec les alcools et les amines en les transformant en esters ou amides.



VI. APPLICATION

La chromatographie en phase gazeuse est une méthode :

- ✓ D'analyse qualitative par les t_r et V_r .
- ✓ D'analyse quantitative par exploitation de la surface des pics

Les applications sont nombreuses, en particulier dans le domaine pharmaceutique :

- ❖ Contrôle des matières premières: recherche des impuretés en particulier les solvants résiduels utilisés dans les étapes de purification de matières premières.
- ❖ Contrôle des préparations pharmaceutiques ou produit finis: identification et dosage du principe actif.
- ❖ Etude de la stabilité des matières premières et du produit fini avec la recherche d'éventuels produits de dégradation.
- ❖ Contrôle des gaz médicaux (O_2 , N_2O , N_2).

VII. GRANDEURS ELEMENTAIRES DE LA CPG

Il existe un certain nombre de termes fréquemment utilisés pour décrire diverses caractéristiques, comportements et conditions de chromatographie et de colonne. Il est utile de comprendre ces termes pour comparer les performances, la qualité des colonnes, détecter et résoudre les anomalies et interpréter les résultats. Pour cela les mêmes grandeurs comme CLHP sont utilisés en CPG.

VIII. INDICES DE KOVATS

L'identification d'une substance peut être facilitée par la connaissance de son indice de Kovats qui pour une phase stationnaire déterminée repose sur la comparaison de son temps de rétention et ceux de deux alcanes linéaires et ceci quelles que soient les conditions opératoires. Le pic du soluté i est encadré entre les pics de deux hydrocarbures normaux à n et $n+1$ atomes de carbone. On injecte sur la colonne à une température et à une pression d'entrée données, les alcanes linéaires de formule C_nH_{2n+2} avec $n \geq 5$. On repère les temps de rétention réduits de ces alcanes $t'_r(n)$ et $t'_r(n+1)$ et celui du produit considéré $t'_r(i)$

Si un soluté est élué entre les deux alcanes (n) et ($n+1$), son indice de rétention I_i est donné par la formule suivante: A chaque produit (i) est associé un indice de rétention $I(i)$, cet indice est basé sur un système d'étalonnage par des hydrocarbures linéaires.

✓ **En isotherme**

$$I_i = 100. \left(\frac{\log t'_r(i) - \log t'_r(n)}{\log t'_r(n+1) - \log t'_r(n)} \right) + 100. n$$

✓ **En programmation de température**

$$I_i = 100. \left(\frac{t_r(i) - t_r(n)}{t_r(n+1) - t_r(n)} \right) + 100. n$$

IX. ANALYSE QUANTITATIVE

La CPG permet de calculer les proportions ou les quantités de chacun de ces constituants dans l'échantillon. Elle donne des résultats quantitatifs d'une très grande précision et on peut déterminer des concentrations à l'état de traces. L'analyse quantitative en CPG est basée sur la réponse du détecteur au composé à analyser. D'une manière générale la réponse du détecteur est fonction de la quantité de matière qui le traverse.

Cette réponse se traduit par un pic et est proportionnelle à la surface de ce pic.

Réponse = K_x Surface du pic = f (masse du composé)

Dans le domaine de linéarité de la réponse du détecteur, pour un composé A on peut écrire:

$$M_A = |\text{concentration}|_A = K_A \cdot S_A$$

M_A : masse du composé à doser

K_A : facteur de réponse du détecteur au composé A

S_A : surface du pic A

La concentration (ou la masse M_A) du composé A est proportionnelle à la surface du pic.

Pour des solutions très diluées ou trop concentrées, l'analyse quantitative devient assez délicate.

Pour déterminer les aires des pics, on utilise les fonctions spécialement prévues

des logiciels de chromatographie, qui assurent non seulement le pilotage du chromatographe, mais qui peuvent, en plus de l'acquisition des chromatogrammes, analyser et traiter les données et fournir un rapport d'analyse.

EXERCICES CORRIGES

Exercice 1 :

Au cours de la séparation d'un mélange d'hydrocarbures, les temps de rétention mesurés sont :

Propane	2,23 min
Isobutane	5,71 min
Butane	6,67 min

Quel est l'indice de Kovats pour chaque composé ?

Solution :

$$I_{\text{Propane}} = 300$$

$$I_{\text{Butane}} = 400$$

L'indice de Kovats est donné par

$$I_i = 100 \cdot \left(\frac{t_r(i) - t_r(n)}{t_r(n+1) - t_r(n)} \right) + 100 \cdot n$$

$$I_{\text{Isobutane}} = 386$$

Exercice 2 :

La méthode la plus connue d'estimation du temps mort t_M consiste à mesurer le temps de rétention d'un composé non retenu (couramment le méthane en CPG). On propose ici une autre méthode faisant appel à la relation utilisée dans l'établissement des indices de rétention, à savoir que dans une série homologue de composés organiques on peut écrire, si la température de la colonne ne varie pas :

$$\log(t_r - t_m) = a \cdot n + b$$

t_r représente le temps de rétention du composé à n atomes de carbone, a et b sont des constantes qui dépendent de la classe des solutés et de la phase stationnaire choisie.

Calculer

t_m à partir de l'expérience suivante : on injecte un mélange d'alcane linéaires à 6, 7 et 8 atomes de carbone. Les temps de rétention sont respectivement 271, 311 et 399 s en régime isotherme à 80 °C.

Solution :

$$C6 : 271 \text{ s } \log(271) = 6 a + b$$

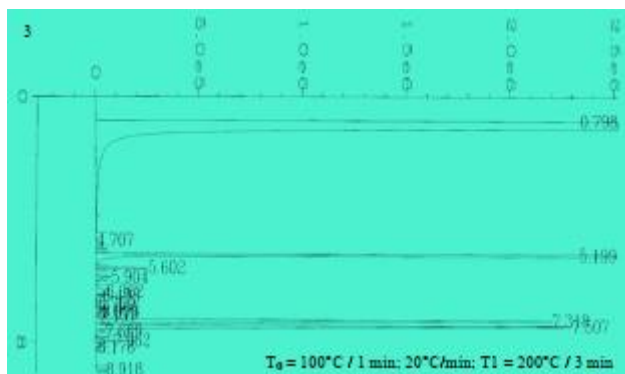
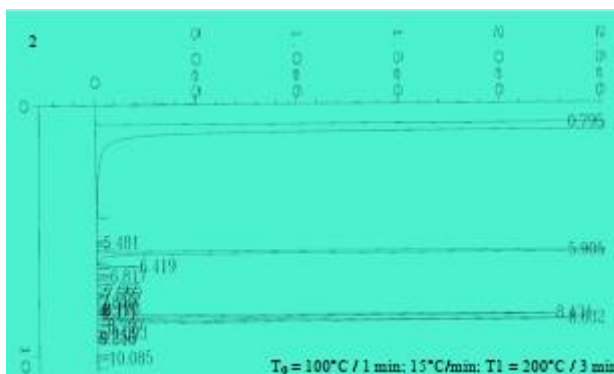
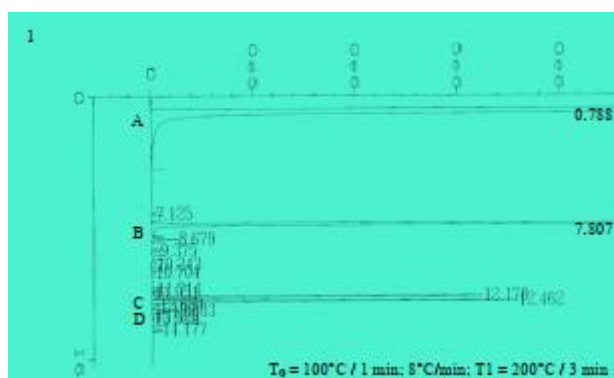
$$C7 : 311 \text{ s } \log(311) = 7 a + b$$

$$C8 : 399 \text{ s } \log(399) = 8 a + b$$

Soit $t_m = 237 \text{ s}$

Exercice 3:

Le méthyl 2,5-dihydro-2,5-diméthoxy-2-furancarboxylate est le produit d'électrolyse du méthyl-2-furoate dans le méthanol. Dans le cadre d'une étude de cette réaction, on veut identifier les signaux chromatographiques correspondant à ces composés. Une solution contenant ces deux produits commerciaux est analysée par chromatographie en phase gazeuse, dans une colonne Carbowax (polyéthylenglycol). Les chromatogrammes suivants correspondent à différents programmes de température.



- Identifier les principaux pics
- Pour chaque chromatogramme, calculer les temps de rétentions nets de chaque composé, ainsi que les facteurs de séparation entre B et C et entre C et D.

c. Expliquer l'influence de la rampe de température sur la séparation.

d. Ces mesures permettent-elles de déterminer le point d'ébullition des composés

Solution :

a. A: méthanol, B: méthyl-2-furoate, C et D: méthyl 2,5-dihydro-2,5-dimethoxy-2 furanecarboxylate (2 configurations spatiales possibles)

b. $t_m = t_{rn} - t_m$ $k' = t_{rn}/t_m$ $\alpha_{2/1} = k'_2/k'_1 = t_{rn,1}/t_{rn,2}$

	$t_{rn,B}$	$t_{rn,C}$	$t_{rn,D}$	C,B	D, C
1	7,019	11,390	11,674	1,62	1,02
2	5,110	7,639	7,837	1,49	1,03
3	4,401	6,520	6,709	1,48	1,03
4	3,546	5,598	5,786	1,58	1,03

c. Rampe plus lente meilleure séparation

d. Non car les composés ont différentes affinités pour la phase stationnaire

Exercice 4 :

On donne ci-après un tableau des valeurs du facteur de capacité k' (*en italique*) pour quatre gaz de raffinerie, étudiés à trois température différente sur une même colonne capillaire ($L_c=30m$, diamètre interne I.D.= 250 μm) dont la phase stationnaire est du type SE-30. Le chromatographe est muni d'un accessoire cryogénique.

		Température de la colonne (°C)		
Composé	Temp.Eb. (°C)	- 35	25	40
Ethylène	-104	0,249	0,102	0,0833
Ethane	-89	0,408	0,148	0,117
Propène	-47	1,899	0,432	0,324
Propane	-42	2,123	0,481	0,352

a. D'après l'ordre d'élution, dire si la phase SE-30 est polaire ou non.

b. Calculer le facteur de sélectivité pour le couple propène-propane aux trois températures indiquées.

c. Pourquoi k' diminue-t-il lorsque la température croît, pour un même composé ?

d. Quel est le nombre de plateaux théoriques de la colonne pour le propane à 40°C, sachant qu'à cette température le facteur de résolution pour le couple propène-propane est égal à 2 ? Calculer la HETP correspondante.

Solution :

a. L'ordre d'élution suit celui des points d'ébullition croissants. Les alcènes sont plus polaire que les alcanes correspondants.

Alcènes moins retenus Phase NON POLAIRE

b. $\alpha = k'_{\text{propane}}/k'_{\text{propène}}$

D'où,

$$\alpha = 1,09 \text{ à } 40^\circ\text{C}$$

$$\alpha = 1,11 \text{ à } 25^\circ\text{C}$$

$$\alpha = 1,12 \text{ à } 35^\circ\text{C}$$

c. Le temps de rétention diminue par suite de la diminution du coefficient de partage avec la température. (cf. Thermodynamique : énergie Gibbs...)

d. $N = 138 = 489$

$$H = 0,217 \text{ mm}$$

Exercice 5 :

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.

a. Calculer le volume mort V_M de la colonne, et les volumes de rétention V_A et V_B ?

b. Calculer les volumes réduits V'_A et V'_B ?

c. Calculer les coefficients de rétention k'_A et k'_B ?

d. Quelles sont les largeurs à la base des pics A et B ?

e. Quelle est la valeur de H pour cette colonne ?

f. Déterminer la valeur de la sélectivité α de cette séparation ?

- Calculer la résolution R de la séparation ?

- Commenter brièvement les valeurs de k' et de R ?

Solution :

a. Formule $V_i = t_i \cdot D$

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

b. Formule $V'_i = t'_i \cdot D$ soit $V'_i = V_i - V_M$

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

$$V'_A = 4,5 \cdot 15 = 67,5 \text{ ml et } V'_B = 11,5 \cdot 15 = 172,5 \text{ ml}$$

Ou $V'_A = 75 - 7,5 = 67,5 \text{ ml et } V'_B = 180 - 7,5 = 172,5 \text{ ml}$

c. Formule $t_r = t_m(k'+1)$ ou $k' = t'_m/t_m$

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

d. Formule $N = 16 (t_r/\omega)^2$ donc $\omega = 4 \cdot t_r/\sqrt{N}$

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

e. Formule $H = L/N$

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

f. Formule $\alpha = t'_B/t'_A = k'_B/k'_A$

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

- Formule $R = 2 (t_B - t_A)/(\omega_B + \omega_A)$

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

- Pour k' les valeurs sont élevées. Composés retenus donc temps de rétention long et sûrement élargissement des pics. Valeur de R 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 6

Un mélange de six iodures d'alkyle est séparé par chromatographie gazeuse à l'aide d'une colonne remplie de poudre de brique réfractaire enrobée d'huile de silicone (longueur $L = 365$ cm). La colonne est chauffée de telle sorte que sa température croisse linéairement durant toute l'opération. Le tableau donne les résultats relevés.

Pic	Identité	T_r (min)	ω (min)	Température (°C)	Surface (cm ²)
1	Air	$T_m = 0,5$	Petite	55	Petite
2	CH ₃ I	6,60	0,55	100	13,0
3	C ₂ H ₅ I	9,82	1,00	127	12,0
4	Iso-C ₃ H ₇ I	11,90	1,04	139	10,0
5	<i>n</i> -C ₃ H ₇ I	13,04	1,08	148	7,2
6	CH ₂ I ₂	19,10	1,60	193	2,0

a. Calculer la résolution entre les pics 2-3, 3-4, 4-5, 5-6 ?

b. la séparation vous convient-elle ?

c. Quelle longueur de colonne aurait-il fallu pour que la résolution des pics 4 et 5 ait été de $R' = 1,5$?

Solution :

a. Formule $R = 2 (t_B - t_A)/(\omega_B + \omega_A)$

$$R_{2-3} = 2 (9,82 - 6,6)/(0,55 + 1) = 4,15$$

$$R_{3-4} = 2 (11,9 - 9,82)/(1 + 1,04) = 2,04$$

$$R_{4-5} = 2 (13,04 - 11,9)/(1,04 + 1,08) = 1,08$$

$$R_{5-6} = 2 (19,1 - 13,04)/(1,6 + 1,08) = 4,52$$

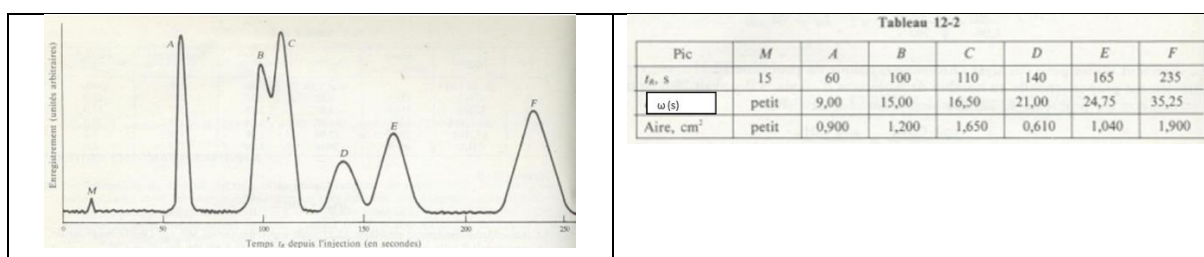
b. Les pics 4 et 5 sont mal résolus.

c. Comme R est proportionnel à \sqrt{L} , alors, $R'/R = \sqrt{(L'/L)}$

$$\text{Ainsi, } (1,5/1,08) = \sqrt{(L'/365)} \quad L' = 365 \cdot (1,5/1,08)^2 = 704 \text{ cm}$$

Exercice 7

Le chromatogramme suivant a été obtenu pour un mélange de chaînes droites d'hydrocarbures : C_nH_{2n+2} . Le pic M est dû à un corps non absorbé ; le pic A est celui de C_3H_8 ; le pic F est celui de $C_{20}H_{42}$. La colonne mesure 120 cm de longueur et est utilisée à température constante avec un débit de gaz de $50,0 \text{ cm}^3/\text{min}$. On trouve les données concernant les temps de rétention et la largeur des pics dans le tableau 12-2.



a. Trouver le nombre de plateaux théoriques N_A en se basant sur le pic A ?

b. Calculer la résolution entre les pics B-C, D-E ?

c. Quelle longueur de colonne aurait-il fallu pour que la résolution des pics B et C ait été de $R' = 1,5$?

d. En déduire la nouvelle résolution des pics D et E ?

e. Déterminer le t_r de F sur une colonne de longueur déterminée au (d) et conclure ?

Solution :

a. Formule $N = 16 (t_r/\omega)^2$

$$N_A = 16 (60/9)^2 = 711 \text{ plateaux}$$

b. Formule $R = 2 (t_B - t_A)/(\omega_B + \omega_A)$

$$R_{B-C} = 2 (110-100)/(15+16,5) = 0,63 \text{ mal résolus.}$$

$$R_{D-E} = 2 (165-140)/(21+24,75) = 1,09 \text{ mal résolus.}$$

c. Comme R est proportionnel à \sqrt{L} , alors, $R'/R = \sqrt{(L'/L)}$

$$\text{Ainsi, } (1,5/0,63) = \sqrt{(L'/120)} \quad L' = 120 \cdot (1,5/0,63)^2 = 680 \text{ cm}$$

d. On peut déduire R_{D-E} avec une colonne de 680 cm

$$\text{Ainsi, } (R'/1,09) = \sqrt{(680/120)} \quad R' = 2,6$$

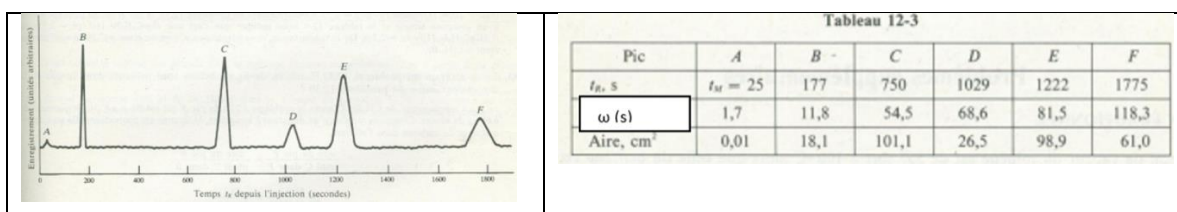
f. On a $t_r = 235 \text{ sec} = 3,9 \text{ min}$ sur une colonne de 120 cm

Ainsi, sur une colonne de 680 cm, $t_r = 235 \cdot (680/120) = 1331,7 \text{ sec}$ $t_r = 22,2 \text{ min}$

Trop long donc peut être changée la nature de la colonne.

Exercice 8

Un mélange d'alkyles de bromes est séparé par CPG. Les paramètres de la colonne sont : $L = 150$ cm, $T = 140^\circ\text{C}$, gaz vecteur He, débit = $20\text{ cm}^3/\text{min}$, détection FID. Le chromatogramme a été obtenu avec un mélange de composition inconnue, néanmoins, on sait que le pic F est dû à du $n\text{-C}_5\text{H}_{11}\text{Br}$. Le tableau résume les données pour les différents pics.



- Quelle peut être la longueur de la colonne minimale pour que les pics D et E puissent être résolus avec moins de 1% de recouvrement ?
- Déterminer le nombre de plateaux théoriques N , pour les pics B, C, D, E et F ?
- Commenter la valeur de N_C ?

Solution :

- a. Formule $R = 2(t_B - t_A)/(\omega_B + \omega_A)$

$$R_{D-E} = 2(1222 - 1029)/(68,6 + 81,5) = 2,57$$

Or R est proportionnel à \sqrt{L} et une séparation avec un recouvrement de 1 % correspond à une

$$R = 1,5$$

$$\text{Alors, } (1,5/2,57) = \sqrt{(L/150)} \quad L = 51 \text{ cm}$$

- b. Formule $N = 16(t_r/\omega)^2$

$$N_B = 16(177/11,8)^2 = 3600 \text{ plateaux et } N_C = 3030 ; N_D = 3600 ; N_E = 3600 ; N_F = 3600$$

- c. Le pic C a la plus petite valeur de N . Il est probable qu'il corresponde à un mélange non séparé de deux alkyles de brome ou plus (un pic non résolu doit avoir une valeur plus grande de ω et un N plus faible).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A. Primer ;Fondamental of modern UV-visible spectroscopy ; 1996; Hewlett-Packard® Company12-5965-5123^E.
 - M. Hesse ; H. Meier et B. Zeeh ; Méthodes spectroscopiques pour la chimie organique ; 1997, Masson2-225-83050-9.
 - Francis Rouessac, Annick Rouessac ; Techniques instrumentales d'analyse chimique ; 2011; Dunod.
 - M. Hesse ;H. Meier, Bernd Zeeh ; Méthodes spectroscopiques pour la chimie organique ; 1997 ; Masson.
 - J.Buzon ; J-C. Roussel ; Spectrométrie d'absorption dans l'infrarouge Méthodes ; Techniques de l'ingénieur ; 10 janvier 1981 ;Réf. : P2855 V1.
 - B.Malingrey ;Spectrométrie d'absorption dans l'infrarouge Appareils ; Techniques de l'ingénieur ;10 juillet 1984 ; Réf. : P2845 V2.
 - M.Dalibart ; L. Servant ; Spectroscopie dans l'infrarouge ;Techniques de l'ingénieur ; 10 décembre 2000 ; Réf. : P2845 V3.
 - P. Richard Dahoo ;A.Lakhlifi ; Spectroscopie infrarouge de molécules diatomiques pour l'observation spatiale ; Publications ; Collections Encyclopédie Sciences Revues OpenScience Collection : Ondes ; Série : La spectroscopie infrarouge ; Mars 2018.
 - G. Bouchoux ; M. Sablier ; Spectrométrie de masse - Principe et appareillage ; Techniques de l'ingénieur ; 10 juin 2005 ; Réf. : P2645 V1.
 - G. Bouchoux ; M. Sablier ; Spectrométrie de masse – Applications ; Techniques de l'ingénieur ; 10 juin 2005 ; Réf. : P2646 V1.
 - S. Bouchonnet ;La spectrométrie de masse en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse ; 2009 ;Lavoisier.
 - E. de Hoffmann, V.Stroobant ; Mass Spectrometry:Principles and Applications ; 2007 ; 3^{eme} Edition ; Wiley.
 - H. Nair ; W. Clarke ;Mass Spectrometry for the ClinicalLaboratory ; 2016 ; Elsevier.
 - R.M. Silverstein, F.X Webster ; David J Kiemle ; Identification spectrométrique de composés organiques ; 2016 ; 3^{eme} Edition ; De boeck.
 - N. Younan ; Méthodes de Séparation ; 2011.
- Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications.

-
- G. Burgot ; J-L.Burgot;Méthodes chromatographiques, électrophorèses et méthodes spectrales; 2002 ; Technique & documentation.
 - A-S. Bernard et al. ; Techniques expérimentales en Chimie ;Dunod, 2012.
 - Haleem J. Issaq ; A Century of Separation Science ; 2020 ;1^{er} Edition ;CRC Press.
 - M.Caude ; A.Jardy ; Chromatographie en phase liquide - Théorie et méthodes de séparation ; 10 octobre 1994 ; Réf. : P1455 V2.
 - M.caude,AlainJardy ; Chromatographieenphaseliquide-Appareillageetapplications ;Techniques de l'ingénieur ; 10 avril 1995 ; Réf. : P1456 V1.
 - J-L.Veuthey ;Chromatographie en phase liquide – Introduction ; Techniques de l'ingénieur ; mars 2020 ; Réf. : P1454 V1.
 - S. Duckett, B. Gilbert, M.Cockett ; Les fondements de la détermination des structures moléculaires ; 2017;EDP sciences.
 - R.P.W. Scott ; LiquidChromatography Detectors, Volume 33;1986 ; 2^{eme} Edition ; Ebook.
 - R. Rosset, M. Caude et A. Jardy ;Chromatographie en phase liquide et supercritique 1991, Masson2.225.82308.1.
 - Z. Kabouche ; Cours et exercices de Chromatographie ; 2010 ; OPU Constantine.
 - J de Graeve, F. Berthou, M. Prost, 1986 ; Méthodes chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse ; Masson2.225.80627.6.
 - J-L. Cuq ; Chromatographie liquide ; université Montpellier ; 2007.
 - A. Ensminger ; Analisis magazine, Spectromètres de masse quadripolairespour le couplage avec la chromatographie gazeuse et la chromatographie liquide : principaux appareils disponibles sur le marché français1998, 26, N° 2.
 - M. Harold M. Nair, James M. Miller and al. ; Basic Gas Chromatography, Third Edition ; 2019 ;3^{eme} Edition ; John Wiley& Sons.
 - E. F. Barry ; Robert L. Grob ; Columns for Gas Chromatography: Performance and Selection ; 2007 ; John Wiley & Sons.
 - Vincent Dalmeyda , Claudine David. Exercices dirigés de spectrométrie de Masse; VDCD09/2000.