

**République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère
de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

Université 20 Aout 1955 Skikda



Faculté des Sciences

Département de Sciences de la Nature et de la Vie

Polycopié

Techniques d'Analyse Biologique

**Dédié aux étudiants de Licence et Master de toutes les spécialités du domaine
Sciences biologiques**

**Présenté par : Mr. BASLI Abdelkader
2021/2022**

Avant-propos

Ce polycopié a été conçu comme un outil pédagogique pour aider les étudiants appréhender les concepts fondamentaux de la biochimie analytique sur la base des méthodes physiques de séparation.

Le polycopié est présenté en quatre chapitres. Le chapitre 1 intitulé Chromatographie, est consacré sur toutes les techniques pouvant être mises en œuvre de manière analytique ou de manière préparative, pour la production de molécules purifiées. Dans le chapitre 2, une présentation détaillée de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) qui correspond à une évolution de la chromatographie sur colonne (pour améliorer les performances de celle-ci). Cette méthode d'investigation est le point de départ du progrès des connaissances dans le domaine de séparation. Le chapitre 3 définit la chromatographie en phase gazeuse (CPG) qui s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Elle est de plus en plus utilisée dans les principaux domaines de la chimie. Le chapitre 4 parle sur une autre technique séparative : Electrophorèse. Elle est utilisée le plus souvent dans un but analytique mais également parfois pour purifier des molécules solubles. Le chapitre 5 décrit clairement les principales méthodes spectrophotométriques utilisées en analyse pharmaceutique, biologique et alimentaire ; l'utilisation des spectres moléculaires ; les données essentielles sur les méthodes optiques non spectrales - : les spectrométries de résonance magnétique, la spectrométrie de masse et la spectroscopie d'absorption atomique.

Chaque chapitre débute par un rappel théorique synthétique, sous forme de fiches, accompagné de schémas et d'exemples didactiques destinés à faciliter la compréhension des données et leur mémorisation.

Un découpage est nécessairement arbitraire, c'est pourquoi dans chaque chapitre présentant une notion précise, de multiples renvois permettent au lecteur de se référer rapidement aux données associées à la question traitée.

Cet ouvrage est destiné aux étudiants de licence en Biochimie Appliquée, Microbiologie appliquée et en toxicologie ainsi que ceux en master en Biochimie fondamentale du département des Sciences de la Nature et de la Vie. Il pourra aussi être consulté avantageusement par tous ceux qui ressentent le besoin de mettre à jour leurs connaissances dans un domaine en perpétuelle évolution, et qui est devenu indispensable à la compréhension de ces procédés analytiques.

SOMMAIRE

Avant-propos

Chapitre 1 : Chromatographie

I.	La chromatographie.....	1
1.1.	Historique.....	1
1.2.	Principe.....	2
1.3.	Définitions et classifications	2
A.	Classification selon la nature des phases.....	2
B.	Classification selon la nature des mécanismes moléculaires.....	3
	1. chromatographie d'adsorption	
	2. Chromatographie de partage	
	3. Chromatographie d'échange d'ions	
	4. Chromatographie d'exclusion moléculaire	
	5. Chromatographie d'affinité	
C/	Classification selon la nature des technologies appliquées... ..	17

Chapitre2 : La chromatographie liquide haute performance (HPLC)

I.	Principe.....	21
II.	Description de l'appareillage.....	22
III.	Théorie de base – Grandeurs Fondamentales.....	28
IV.	Les différents modes de séparation	34
V.	Chromatographie chirale	35
VI.	Application de la chromatographie à l'analyse.....	37
VII.	Domaine d'application	39
VIII.	Couplage HPLC- MS	40

Chapitre 3 : La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

I.	Principe.....	41
II.	Description de l'appareillage	43
III.	Facteurs dont dépend la séparation	48
IV.	Analyse qualitative	51
V.	Séparation chirale en CPG	53
VI.	Applications	53

Chapitre 4 : Electrophorèse

I.	Historique	55
II.	Principe.....	56
III.	Techniques électrophorétiques	56
	3.1. L'électrophorèse en veine liquide	56
	3.2. Electrophorèse de zone	57
	3.3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide ou PAGE (Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis).....	60
	3.4. Electrofocalisation.....	62
	3.5. Électrophorèse bidimensionnelle.....	63
	3.6. Electrophorèse de l'ADN.....	64
	3.7. Immunoélectrophorèse	65
	3.8. Electrophorèse sur agarose	69
	3.9. Electrophorèse en champs pulsés	71
	3.10. Electrophorèse capillaire	74

Chapitre 5 : Spectroscopie

I.	Spectroscopie UV-visible.....	79
II.	Spectroscopie infra-rouge.....	83
III.	Spectroscopie de masse.....	86
IV.	Résonance magnétique nucléaire.....	89
V.	Spectroscopie d'absorption atomique.....	95

Chapitre 1 : CHROMATOGRAPHIE

Les méthodes physiques de séparation sont très nombreuses. On peut les classer en deux grands groupes : chromatographie et électrophorèse. Dans les deux cas, les molécules séparées sont ensuite repérées par une de leurs propriétés: affinité pour un colorant spécifique, activité enzymatique ou immunologique, mesure de radioactivité,... L'avantage de ces méthodes par rapport au dosage isolé des molécules individuelles est de fournir en une seule analyse une vue d'ensemble du "profil" d'une classe de molécules. Par calibration, elles permettent une quantification fiable. Ces deux groupes de techniques peuvent être mis en œuvre de manière analytique ou de manière préparative, pour la production de molécules purifiées. Les principes sont les mêmes dans les deux cas; seuls les procédés analytiques seront évoqués. un certain nombre de techniques "mixtes", couplant chromatographie ou électrophorèse à une autre technique: en chromatographie, le couplage consiste à la mise en œuvre aux méthodes de spectrométrie de masse, ou aux méthodes de résonance magnétique nucléaire, mais en électrophorèse, le couplage tiens compte aux techniques immunologiques. Ces couplages augmentent le nombre, la diversité et la puissance des techniques analytiques.

I. La chromatographie:

1.1. Historique :

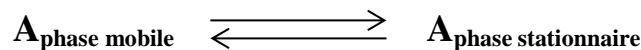
La chromatographie est une science très ancienne. Ainsi on trouve la première référence d'un processus chromatographique dans l'Ancien Testament qui fait mention de propriétés adsorptives de certaine variété de bois pour adoucir de l'eau amère. Ce sont les tanins hydrophobes qui constituaient une phase stationnaire apolaire (chromatographie d'adsorption).

Aristote décrit les propriétés que possèdent certaines terres pour purifier l'eau de mer. Les phénomènes mis en jeu relèvent ici de l'échange d'ions. Au XVIème siècle, le strasbourgeois BRUNSWIG purifiait de l'éthanol en faisant passer la vapeur à travers une éponge imprégnée d'huile d'olive et réalisait une expérience de chromatographie gaz-liquide 400 ans avant la "découverte" de cette technique. Toutefois, ce n'est qu'au début du XXème siècle, plus précisément le 21 mars 1903, que naquit la chromatographie. Ce jour-là TSWETT, botaniste d'origine russe, présenta à Varsovie son premier article sur une nouvelle sorte de phénomène d'adsorption et son application à l'analyse biochimique. Il y décrivait la formation de zone colorée lors de l'élution par l'éther de pétrole de pigments végétaux dans une colonne remplie de carbonate de calcium. L'origine du mot

chromatographie vient peut-être de cette séparation de composés colorés puisque CHROMA (Krwma) en grec, signifie couleur. Puis les travaux de TSWETT tombèrent dans l'oubli pendant une vingtaine d'années et il faudra attendre 1931 la publication de KUHN et LEDERER sur la séparation des isomères du carotène et de la xanthophylle pour assister au développement de la chromatographie en tant qu'outil analytique. A partir de cette date, la chromatographie prit son véritable essor.

1.2.Principe

Le principe repose sur l'équilibre de concentrations des composés présents entre deux phases en contact : la phase stationnaire et la phase mobile (liquide ou gaz) qui se déplace. La séparation est basée sur l'entraînement différentiel des constituants du mélange. Ces derniers parcourent la phase stationnaire avec des temps proportionnels à leurs propriétés intrinsèques (taille, structure,...) ou à leur affinité avec la phase stationnaire (polarité,...).



$$K = C_S / C_M$$

avec K : Coefficient de distribution
 C_S : Concentration de l'analyte dans la phase stationnaire
 C_M : Concentration de l'analyte dans la phase mobile

1.3.définitions et classifications

La chromatographie est une méthode de séparation de composés fondée sur l'entraînement de ces composés par une phase mobile, appelée éluant ou solvant, ces composés étant séparés les uns des autres par des interactions plus ou moins forte avec une phase dite fixe ou stationnaire. En fin de chromatographie, on obtient un chromatogramme ou profil chromatographique ou profil d'éluion du mélange. Selon la nature des molécules séparées, on parle de protéinogramme pour les protéines, de lipidogramme pour les lipoprotéines...

On peut classer les méthodes chromatographiques selon trois critères : en fonction de la nature des phases, en fonction des mécanismes mis en jeu au niveau moléculaire, en fonction des technologies pratiques mises en œuvre, Ces classifications sont complémentaires et permettent de décrire complètement un procédé.

A/ Classification selon la nature des phases

On reconnaît différents types de chromatographie, selon la nature des phases mises en jeu: la phase mobile est liquide ou gazeuse ; la phase fixe est liquide ou solide. On distingue ainsi les chromatographies liquide-solide ou liquide - liquide et les chromatographies gaz - liquide ou gaz - solide. Dans les chromatographies liquides, on améliore la qualité des séparations en jouant sur la nature de la phase mobile :

- la composition de l'éluant peut être constante, identique pendant toute la chromatographie : chromatographie isocratique ;
- la composition de l'éluant change au cours de la chromatographie : on réalise un gradient d'éluant. Le gradient peut être réalisé de deux façons :

+ gradient discontinu : changement de composition par paliers brusques.

+ gradient continu : changement progressif dans la composition de la phase. Les gradients continus peuvent être linéaires ou non linéaires (convexes ou concaves). Les systèmes actuels pilotés par informatique permettent de réaliser des programmations complexes de gradients en forme et en composition de solvants (binaires, ternaires, quaternaires).

B. Classification selon la nature des mécanismes moléculaires

1. chromatographie d'adsorption

C'est la première chromatographie réalisée : séparation des pigments végétaux par adsorption sur de la craie (Tswett 1906). Ce mode de chromatographie met en jeu un mécanisme d'adsorption du soluté sur la phase stationnaire solide et un mécanisme d'éluant (désorption) par la phase mobile liquide ou gazeuse (éluant). Son Principe est basé sur :

- L'adsorption est la fixation plus ou moins énergétique d'un gaz, d'un liquide ou d'un soluté sur une surface solide ; elle met en jeu des liaisons à faible énergie (liaisons hydrogène, interactions électrostatiques, interactions de Van der Waals...). Pour être utilisable à des fins séparatives, l'adsorption doit être réversible.
- L'éluant ou désorption consiste à extraire le soluté adsorbé à l'aide d'un solvant appelé éluant.
- 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 : (Fig 1).

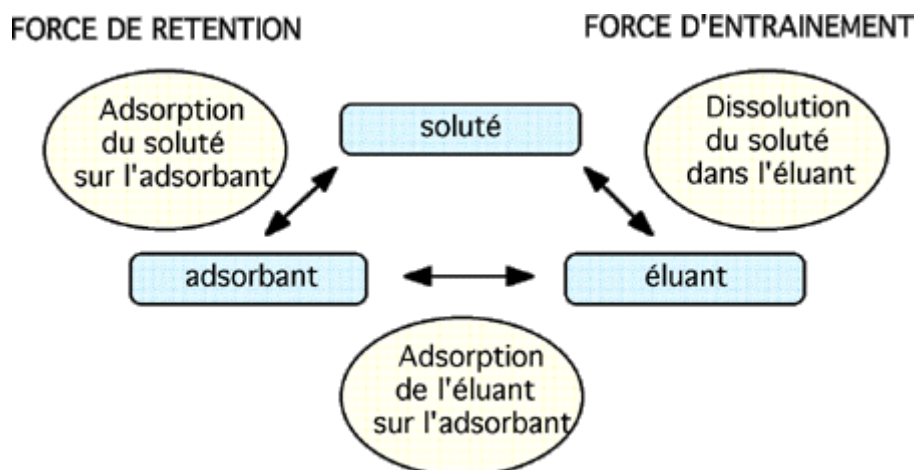


Fig 1 : Mécanisme d'interactions entre le soluté, le solide adsorbant et l'éluant



Fig 2 : Principe d'adsorption

L'adsorption est un phénomène de surface lié à la polarité des molécules. Lors du passage du soluté, des interactions polaires s'effectuent entre celui-ci et la silice tandis que l'éther de pétrole (apolaire) passe sans éluer la molécule du soluté (Fig 2).

Les adsorbants utilisés doivent être insolubles dans le solvant et chimiquement inertes vis-à-vis du solvant et des solutés. Leur granulométrie varie entre 5 et 100 μm et leur surface spécifique de 50 à 1000 m^2/g . L'activité d'un adsorbant dépend de sa nature et de sa teneur en eau. La capacité d'adsorption peut être faible (carbonate de calcium...) ou forte (silice, alumine, charbon...). La polarité peut être faible (charbon...) ou forte (silice SiO_2 , utilisée sous forme hydratée : gel de silice, qui présente des fonctions « silanol » : Si-OH , alumine $\text{Al}_2\text{O}_3, n \text{H}_2\text{O}...$)

Les solvants utilisés sont généralement des mélanges de solvants, de polarité voisine de celle des solutés à séparer (ceux-ci doivent être solubles dans l'éluant !). On classe les différents solvants selon leur « force éluante » qui traduit leur polarité :

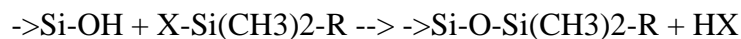
Série éluotrope sur alumine de quelques solvants, classés par ordre de polarité croissante :

solvant	force éluante	solvant	force éluante
Ether de pétrole	0,01	Acétone	0,56
Hexane	0,01	Dioxane	0,56
Cyclohexane	0,04	Butanol	0,56
Tétrachlorure de carbone	0,18	Acétate d'éthyle	0,58
Ether isopropylique	0,28	Acétonitrile	0,65
Toluène	0,29	Pyridine	0,71
Benzène	0,32	Diméthylsulfoxyde	0,75
Ether éthylique	0,38	Isopropanol	0,82
Chloroforme	0,40	Ethanol	0,88
Chlorure de méthylène	0,42	Méthanol	0,95
Dichloroéthane	0,49	Eau	> 0,95
		Acide acétique	> 0,95

Dans les mélanges contenant plus de deux solvants, les derniers sont présents dans de très faibles proportions (< 2%) et correspondent à des solvants de forte polarité (eau, acide) destinés à améliorer la symétrie des pics. Le choix du solvant doit obéir à certaines contraintes : comme la **miscibilité** des composantes élémentaires.

L'autre, liquide ou gaz en déplacement, constitue la phase mobile. Le facteur principal qui intervient est le coefficient de partage entre chaque phase. On peut séparer des solutés dont les coefficients de partage entre les deux phases sont différents. Les plus solubles dans la phase mobile se déplacent plus facilement que ceux qui le sont moins.

Un autre facteur qui intervient est la polarité de la phase: ainsi en HPLC on peut utiliser des phases stationnaires peu ou non polaires, la phase mobile étant polaire (eau ou mélange eau - méthanol): on parlera alors de chromatographie de partage à polarité de phase inversée. 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) : (Fig 3).



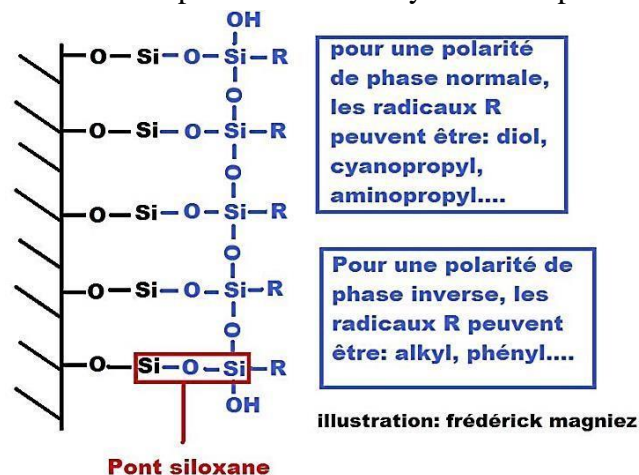
Selon la nature des radicaux R, on distinguera :

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

En première approximation, l'ordre d'éluion des composés est inversé entre les deux modes, les composés polaires étant élués en premier dans les systèmes en phase réverse.



La silanisation

Fig. 3 : Le greffage réalisé par silanisation créant ainsi des ponts siloxane (Si-O-Si)

3. Chromatographie échangeuse d'ions :

Dans la chromatographie échangeuse d'ions, le paramètre qui va permettre la séparation des différents constituants est la **charge nette**. Pour cela, on utilise des résines chargées positivement (chromatographie échangeuse d'anions) ou négativement (chromatographie échangeuse de cations) (Fig.4. A et B)

Si on prend l'exemple de la chromatographie échangeuse d'anions, la résine étant chargée positivement seules les molécules chargées négativement vont se fixer sur celle-ci. Les molécules neutres ou chargées positivement ne vont pas s'accrocher et vont donc être éluées immédiatement (non-fixé). Il convient que la résine soit la plus neutre possible pour éviter tout autre type d'interaction avec les molécules (hormis les interactions électrostatiques). Il peut s'agir de CM-cellulose, de dextran, d'agarose, de copolymères polystyrène/divinyl benzène, etc...

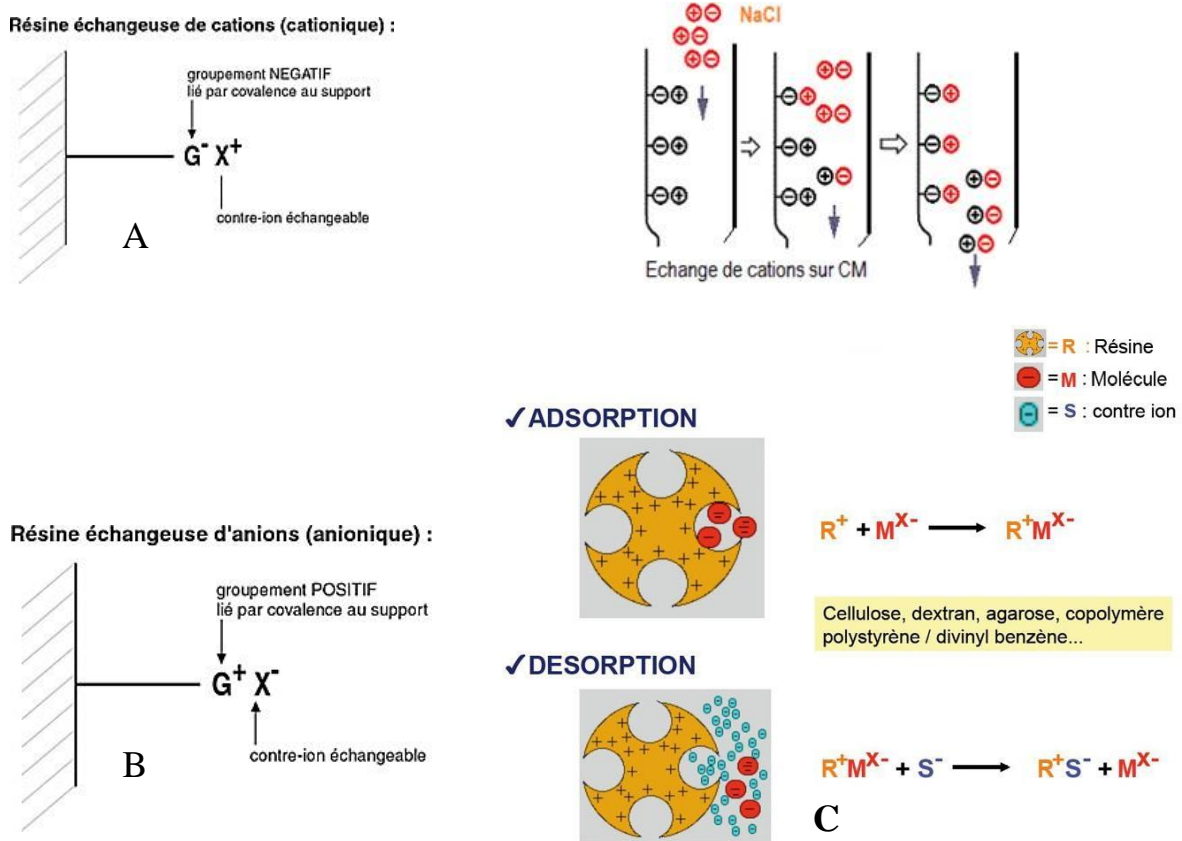






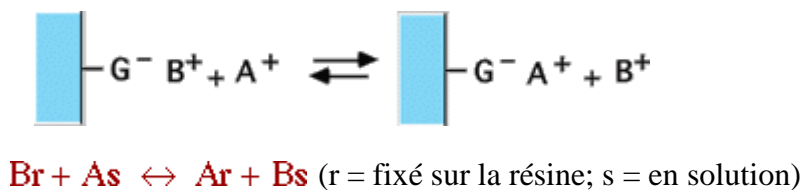


Fig. 4 : schéma du principe de séparation de la chromatographie échangeuse d'ions

La phase stationnaire est constituée d'un support insoluble dans l'eau, sur lequel sont greffés des groupements fonctionnels ionisables. la phase mobile est généralement constituée d'une phase aqueuse. Les **groupements fonctionnels** sont fixés par des liaisons covalentes sur la matrice; ils sont de deux types :

ECHANGEURS DE CATIONS	ECHANGEURS D'ANIONS
FORTS	
 SO_3^- résine sulfonique	 N^+ <div style="display: flex; justify-content: center; gap: 5px;"> <div style="text-align: center;">CH_3</div> <div style="text-align: center;">CH_3</div> <div style="text-align: center;">CH_3</div> </div> ammonium quaternaire
FAIBLES	
 CO_2^- résine carboxylique	 NH_3^+ amine primaire
 CH_2CO_2^- carboxyméthyl-cellulose	 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}^+$ <div style="display: flex; justify-content: center; gap: 5px;"> <div style="text-align: center;">CH_2CH_3</div> <div style="text-align: center;">CH_2CH_3</div> </div> diéthylaminoéthyl cellulose

L'échange d'ions est un procédé dans lequel les ions d'une certaine charge contenus dans une solution sont éliminés de cette solution par adsorption sur un matériau solide (l'échangeur d'ions), pour être remplacés par une quantité équivalente d'autres ions de même charge émis par le solide. Les ions de charge opposée ne sont pas affectés (Fig. 4. C). Les réactions d'échange d'ions sont réversibles et sélectives. La réaction d'échange d'ions s'écrit comme suit :



L'éluion des molécules fixées peut alors être réalisée de différentes manières. On peut utiliser un tampon d'éluion contenant des ions négatifs qui vont entrer en compétition avec les molécules fixées pour les charges positives portées par la résine. On peut soit utiliser directement un tampon contenant une forte concentration en ions (pour éluer toutes les molécules d'un coup) ou au contraire augmenter progressivement la concentration ionique (on parle de gradient) ce qui permet de décrocher successivement les différentes molécules en fonction de la force de leurs interactions électrostatiques. Pratiquement dans ce dernier cas de figure, on utilise deux solutions tampon, l'une de faible concentration ionique et l'autre de

forte concentration ionique. Deux pompes pilotées aspirent et mélangent ces deux solutions selon un rapport qui varie avec le temps (la proportion de solution de forte concentration ionique augmentant progressivement). Le produit de ce mélange est utilisé dans la colonne.

Un autre moyen consiste à modifier la charge de la ou des molécules fixées. L'un des moyens classiques pour obtenir un tel effet est de modifier le pH. En effet, de nombreux groupes ionisables sont sensibles au pH. En baissant le pH, on favorise l'ionisation des groupements basiques (chargés positivement) et on défavorise l'ionisation des groupements acides (chargés négativement). En baissant le pH, on favorise donc l'apparition d'une charge nette positive pour les molécules portant des groupes ionisables sensibles au pH. La transition entre une charge nette négative et une charge nette positive se fait à la valeur du pHi. Encore une fois, on peut choisir d'appliquer directement un tampon au pH très bas, ou d'utiliser un gradient de pH. Dans les deux cas, chaque espèce moléculaire se détache de la résine lorsque le pH de la solution devient égal ou inférieur au pHi de la molécule (Fig. 5). Pratiquement pour appliquer un gradient de pH on procède de la même manière que pour appliquer un gradient de concentration ionique (mélange variables de deux solutions, l'une basique et l'autre acide). Le principe est exactement le même pour la chromatographie échangeuse de cations, à ceci près que les espèces moléculaires retenues étant celles qui sont positives, il faut augmenter le pH pour les décrocher.

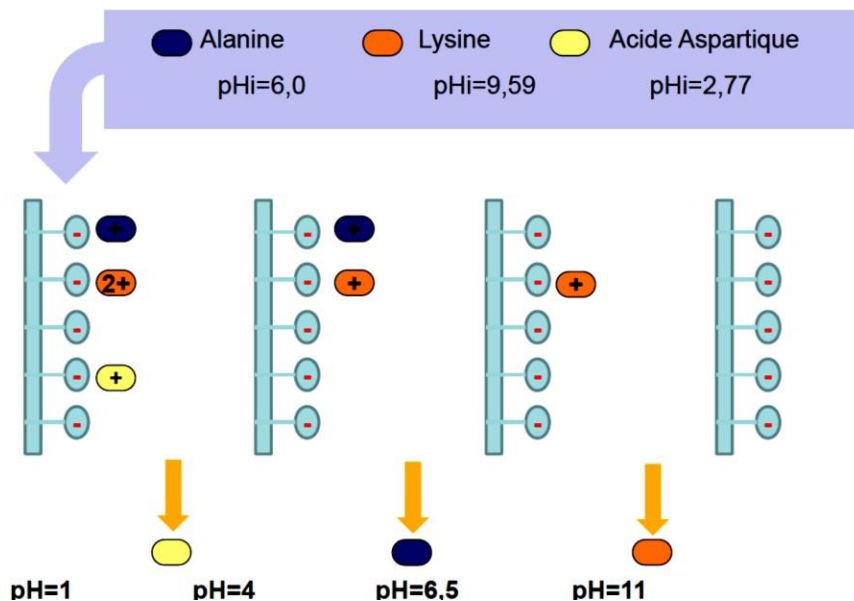
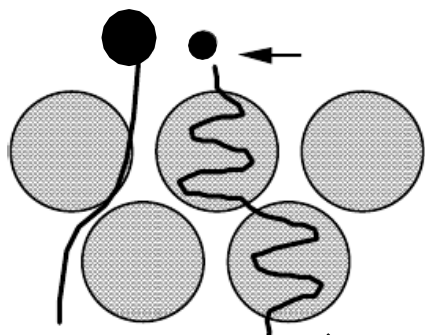


Fig. 5 : Séparation d'un mélange d'acides aminés sur colonne d'échange de cations par modification du pH.

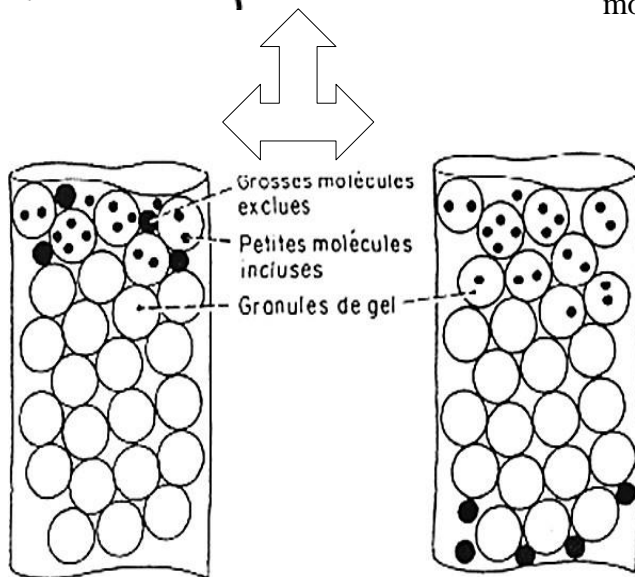
Cette technique est utilisée pour séparer des **molécules ionisables**, quelle que soit leur taille comme des ions minéraux, acides aminés, peptides, protéines, nucléotides, acides nucléiques, glucides ionisés et lipides ionisés.

4. Chromatographie d'exclusion

La chromatographie d'exclusion permet la séparation des molécules à travers un gel poreux en fonction de la taille, la forme et du poids moléculaire de l'échantillon à séparer. La phase stationnaire est constituée de billes de polysaccharide, la phase mobile est constituée d'un éluant (eau, tampon pH), qui sert à entraîner les molécules du mélange. Dans cette technique il n'y a pas d'interactions entre la phase mobile liquide et la phase stationnaire. Les molécules restent donc en solution tout au long de leur séparation. Le principe de base de cette technique est très simple: les billes poreuses constituant le gel forment un réseau tridimensionnel dont l'accessibilité est déterminée par la taille des pores. L'encombrement stérique des molécules et les mailles du réseau déterminent donc leur exclusion. Les molécules exclues traversent la colonne directement entre les billes alors que les autres sont retardées par leur passage à l'intérieur des billes (Fig. 6). Un système de détection, placé en ligne permet de repérer le passage des différentes molécules (fractions). Le type du support (dextran, acrylamide ou support mixte par exemple) et le diamètre des pores, qui sont variable en fonction du diamètre des billes, déterminent la fourchette des tailles de molécules pour lesquelles la séparation est effective: c'est la gamme de fractionnement.



- ❖ La séparation est donc fondée ici, non sur des interactions physicochimiques avec la phase stationnaire, mais sur la dimension des molécules en solution



- ❖ Les grosses molécules sont éluées en premier car leur volume est supérieur à celui du volume des billes.
- ❖ Les petites molécules sont exclus en dernier de par leur petit volume, elles subissent des frottements, leur migration est freinée

Fig. 6 : Chromatographie d'exclusion. Schéma de "trajet " d'un soluté de masse molaire élevée (S) et d'un soluté de masse molaire faible (s).

Définition du comportement d'une molécule dans un gel particulier : coefficient de partage (K_{av}) :

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$$

V_e : volume d'élution de la molécule considérée

V_o : volume mort de la colonne = volume accessible entre les billes

V_t : volume total accessible à l'intérieur et à l'extérieur des billes

Les représentations de V_o , V_t et $V_t - V_o$ sont schématisées sur la Fig. 7.

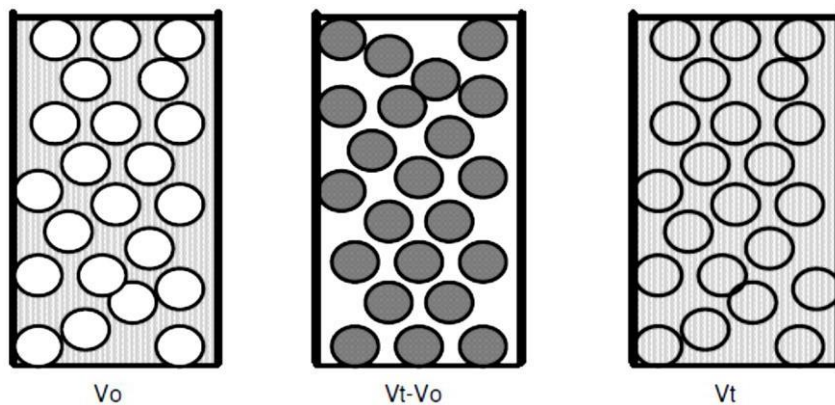


Fig. 7 : Diagramme représentatif de V_t et V_o

Le volume de rétention V_R des molécules X est égal à:

$$V_R = V_o + K \cdot F \cdot V_i$$

- V_o = volume total de la phase mobile ou volume mort, $V_i = V_t - V_o - V_{\text{matrice du gel}}$
- V_i = volume total de la phase stationnaire
- F est la fraction du volume poreux de la phase stationnaire accessible aux molécules X. F est compris entre 0 et 1.
- K coefficient de distribution des molécules X $K = C_s / C_M$, C_s et C_M étant les concentrations respectives de X dans la phase stationnaire et dans la phase mobile.

En chromatographie d'exclusion pure K est égal à 1 et on a : $V_R = V_o + F \cdot V_i$

Il y a 2 cas limites importants :

- 1) $F = 0$. Les molécules sont totalement exclues de la phase stationnaire et on a $V_R = V_o$. Toutes ces molécules émergent ensemble de la colonne après le passage d'un volume de phase mobile égal au volume interstitiel de la colonne.
- 2) $F = 1$. Tous les pores de la phase stationnaire sont accessibles aux molécules considérées et on a $V_R = V_o + V_i$.

Entre les deux limites, V_R varie linéairement en fonction de la fraction du volume poreux accessible. Ainsi, à chaque valeur de V_R correspond théoriquement une taille de molécule elle-même proportionnelle à la masse molaire (Fig. 8).

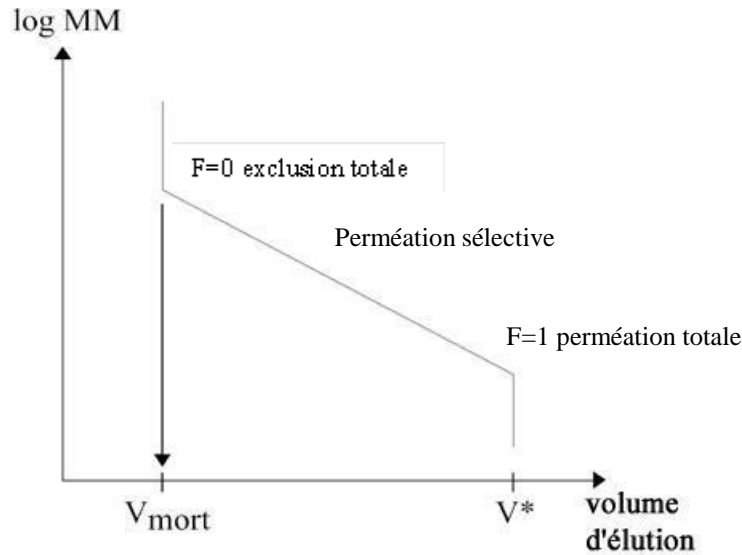


Fig. 8: Relation entre la taille ou la masse molaire et le volume de rétention.
 $V_{mort} = V_0$ et $V^* = V_0 + V_i$

Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et sont donc éluées les premières, au niveau du volume mort (V_M ou V_0).

Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses dans le gel, leur migration est freinée.

Une molécule totalement incluse sera éluée avec un volume d'élution $V^* = V_0 + V_i$, où V_i est le volume d'eau interne aux granules de gel.

Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires (voir figure ci-dessous).

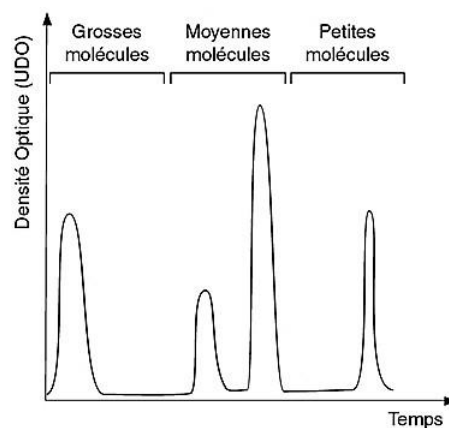


Fig. 9 : Elution des solutés dans l'ordre inverse des masses moléculaires

Un soluté est distribué dans l'eau interne et l'eau externe selon un coefficient de distribution (de partage) : **K**

- 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 $K = 1$, valeur théorique correspondant à une inclusion totale d'un composé dans le gel.
- si $K > 1$, le soluté est inclus et adsorbé.

La figure suivante démontre la distribution un mélange de deux solutés A et B.

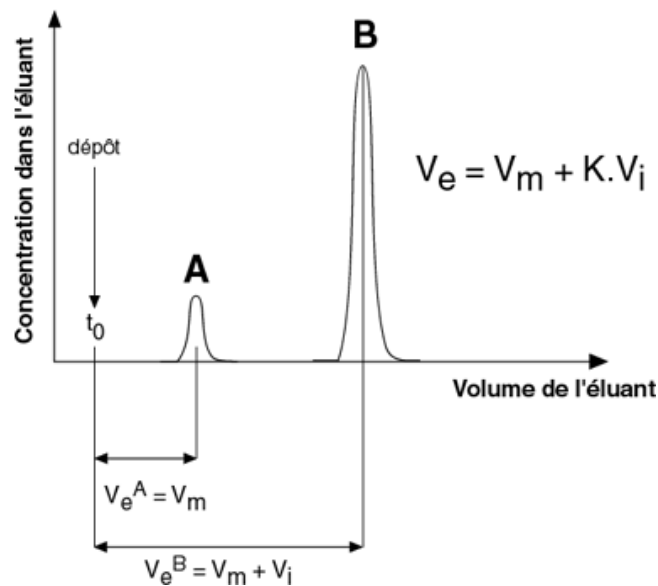


Fig. 10 : Diagramme d'éluion des substances A et B

Pour une chromatographie d'exclusion, trois types de gel sont utilisé :

1. gel mou: dextrane
2. gel semi rigide: polystyrène, polyvinyle
3. gel rigide : silices poreuses ou des verres poreux conçus pour colonnes HPLC type TSK

Cette technique est très utilisée pour la séparation ou l'élimination de sels ou de petites molécules dans les solutions protéiques : dessalage, échange de tampon ...

Cette technique est également appliquée au fractionnement de mélange de macromolécules et à la détermination (approximative) de la masse molaire des protéines. Dans ce dernier cas, il faut d'abord étalonner la colonne avec des protéines de masse molaire connue (standard), tracer la courbe $V_e = f(\log MM)$, puis effectuer une détermination graphique (Fig. 11).

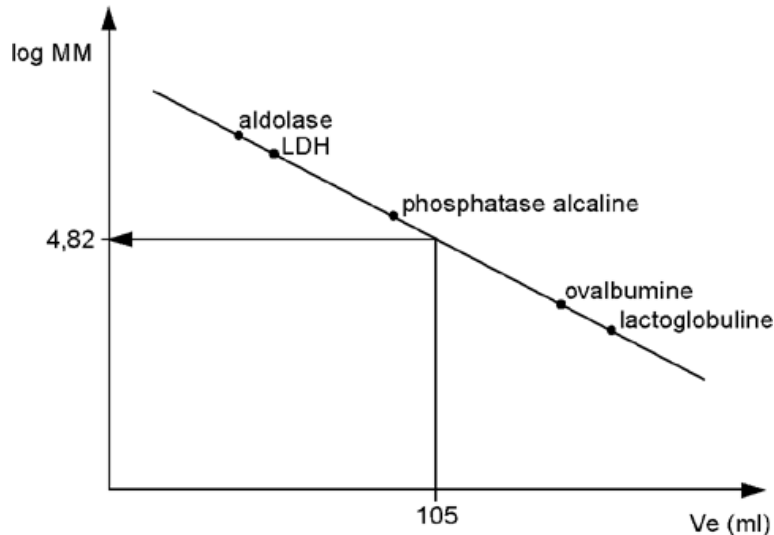


Fig. 11 : Courbe d'étalonnage pour la chromatographie d'exclusion

Par étalonnage, on peut estimer le poids moléculaire apparent en solution d'une molécule inconnue (Fig. 11). Il y a cependant des anomalies :

- dues à la forme de la molécule : l'étalonnage n'est valable que pour des molécules sphériques. Des molécules elliptiques ou très allongées auront une masse apparente supérieure à leur masse réelle, car elles ne peuvent diffuser dans le gel que si elles sont convenablement orientées ;
- dues à des interactions plus ou moins spécifiques et intenses entre les molécules à séparer et le gel: interactions ioniques, hydrophobes ou reposant sur l'affinité.

5. Chromatographie d'affinité :

Aussi appelée la Bio-chromatographie ou de chromatographie de bio-reconnaissance. C'est une chromatographie d'adsorption: adsorption spécifique de la molécule à purifier. Contrairement aux autres types de chromatographie où le support est polyvalent, la chromatographie d'affinité nécessite la préparation d'un support spécifique de la molécule à purifier: une phase stationnaire constituée d'un support macromoléculaire chimique inerte et poreux (dérivés de la carboxyméthyl-cellulose; gel de polyacrylamide; silice; agarose,...) sur lequel on a greffé (par covalence) une molécule organique (un effecteur) qui présente une affinité sélective pour certains constituants de l'échantillon à analyser. Seule la molécule intéressante sera fixée puis éluée :

- soit de manière non spécifique, par des changements de pH ou de force ionique, qui modifient les interactions entre la molécule et l'effecteur;
- soit de manière spécifique, par l'utilisation d'une autre molécule ayant une affinité pour la molécule à purifier et entrant en compétition avec l'effecteur.

Le bras éloignant le ligand du support facilite l'interaction des molécules avec le ligand. L'utilisation d'une force ionique élevée limite l'intervention des facteurs non spécifiques dans la fixation au ligand.

Dans ce type de chromatographie, la phase stationnaire est un support macromoléculaire chimiquement inerte sur lequel est greffé un effecteur qui présente une affinité biologique pour un soluté de l'échantillon à analyser.

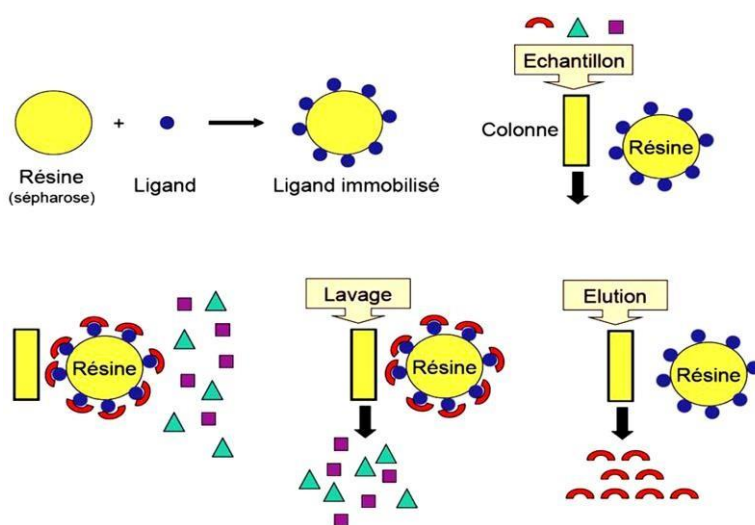
Trois types d'affinités sont utilisés :

- affinité enzyme-substrat
- affinité ligand-récepteur
- affinité antigène-anticorps

Très souvent, la molécule fixée sera le substrat, le ligand, ou bien l'anticorps. Ceci permettra de purifier l'enzyme, le récepteur ou l'antigène, respectivement. La nature de la molécule fixée sur le bras, pourrait spécifiquement purifier la molécule correspondante. Le tableau ci-dessous résume l'ensemble des ligands séparés par une chromatographie d'affinité :

Nature des ligands	substance sélective
enzyme	substrat, analogue, inhibiteur, coenzymes
anticorps	Ag, virus, bactérie, cellule
lectine	glycoprotéine, récepteur cellulaire de surface
acide nucléique	histones, polymérase
hormone, vitamines cellule	récepteur, protéine porteuse protéines de surface

Les étapes de purifications par chromatographie d'affinité sont représentées sur la figure ci-dessous :



Un ligand qui lie spécifiquement la protéine d'intérêt, est fixé de manière covalente à une matrice poreuse et inerte (ligand immobilisé) Quand une solution protéique non purifiée traverse la colonne, la protéine désirée se lie à l'effecteur, tandis que les autres composants sont élués. La récupération de la protéine désirée est ensuite obtenue par des modifications de la phase mobile. Ces modifications concernent le tampon pH, le tampon de force ionique ou l'ajout d'un compétiteur.

Fig. 12 : Les trois étapes d'une chromatographie d'affinité.

- La matrice utilisée pour la chromatographie d'affinité doit être:
 - chimiquement inerte
 - avoir une grande porosité
 - présenter de nombreux groupes fonctionnels capables de former des liens covalents avec les ligands

• l'agarose est le polymère le plus fréquemment utilisé

- la liaison par lien de covalence du ligand sur la matrice d'agarose se fait en deux temps:

1) réaction de l'agarose avec du bromure de cyanogène, qui produit un intermédiaire "activé" et stable

2) le ligand réagit avec l'agarose activé pour donner un produit lié par covalence

- cependant, plusieurs protéines sont incapables de se lier à leur ligand couplé au bromure de cyanogène à cause d'interférence stérique avec la matrice d'agarose
- pour éviter ce problème, un bras "espaceur" souple est ajouté entre la matrice et le ligand

La chromatographie d'affinité possède le grand avantage d'exploiter les propriétés biochimiques uniques de la protéine d'intérêt, au lieu d'utiliser des propriétés physico-chimiques qui sont aussi partagées par d'autres protéines. Elle possède aussi l'avantage de pouvoir purifier la protéine d'intérêt à un très haut degré de pureté en une seule étape.

C/ Classification selon la nature des technologies appliquées

La nature de la phase mobile (liquide ou gaz) impose des technologies très différentes. Les autres paramètres technologiques pris en compte sont représentés par la nature du support et la pression de travail utilisée.

1. Selon le support

a. La chromatographie sur papier

La chromatographie sur papier est une méthode de séparation dont le principe repose surtout sur des phénomènes de partage. La phase mobile est le plus souvent un solvant organique et l'eau ; la phase stationnaire est constituée par l'eau elle-même, absorbée par la cellulose du papier ou liée chimiquement à elle. Comme en chromatographie sur couche mince, l'échantillon, mis en solution, est déposé en un point repère du papier et le solvant qui se déplace par capillarité fait migrer les composants de l'échantillon à des vitesses variables selon leur solubilité. Généralement, les composés les plus solubles dans l'eau ou ceux qui forment facilement des associations par liaisons hydrogène sont fortement retenus par la phase stationnaire et migrent donc lentement (Fig. 13).

La chromatographie sur papier est employée principalement pour l'analyse de composés très polaires, tels que les acides aminés, les sucres et les composés polyfonctionnels. Ses plus grands inconvénients par rapport à la chromatographie sur couche mince sont :

- une durée de développement beaucoup plus longue
- une séparation généralement moins bonne.

On peut employer du papier filtre ordinaire, mais il est préférable de se procurer du papier conçu pour cet usage, ayant un faible taux d'impuretés et dont les caractéristiques physiques sont uniformes c'est le cas de papier Whatman, Schleider et Schüll, Durieux, Arches.

La chromatographie sur papier est réalisée sur une feuille de papier de grande taille (50 x 50 cm) : le solvant migre par capillarité, généralement de manière descendante

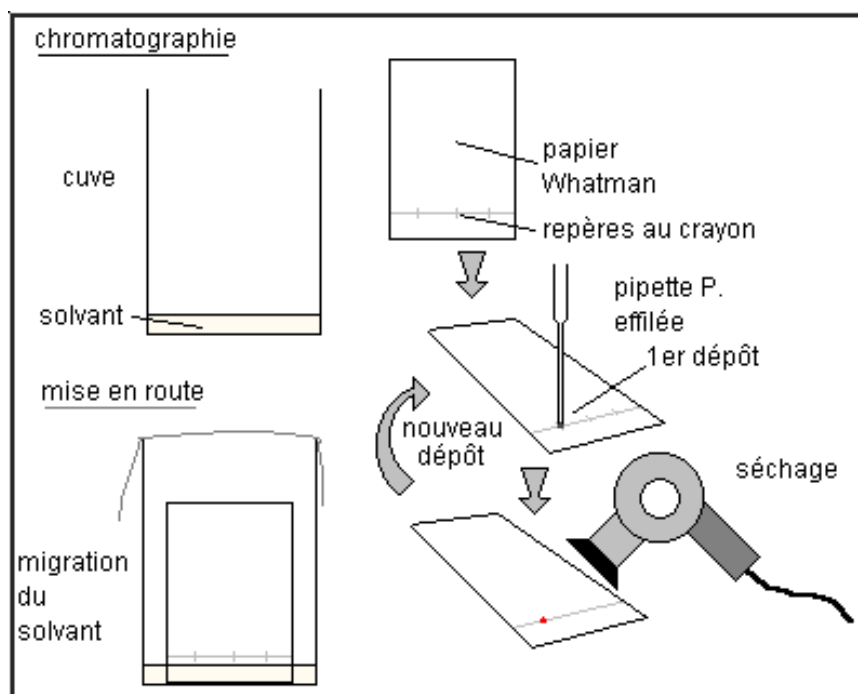


Fig. 13 : Principe de la chromatographie sur papier

b. La chromatographie sur couche mince

Dans cette technique, appelée CCM ou TLC ("thin layer chromatography"), le solvant migre par capillarité à travers le support, de manière ascendante (Fig. 14). Sur une plaque de verre, une feuille d'aluminium ou de plastique, on étale différents types de milieux (gel de silice, cellulose, gel réticulé) sous forme d'une couche mince (0,25 mm d'épaisseur). La solidité du support est renforcée par l'inclusion d'un liant tel que le plâtre. Par rapport au papier, l'existence d'un support inerte tel que le verre limite la taille des chromatogrammes, ce qui est d'ailleurs largement compensé par une meilleure résolution. Sur papier ou couche mince, la cuve de chromatographie doit être saturée par les vapeurs du solvant, afin d'éviter que

l'évaporation du solvant le plus volatil au cours de la migration ne modifie la composition de la phase mobile.

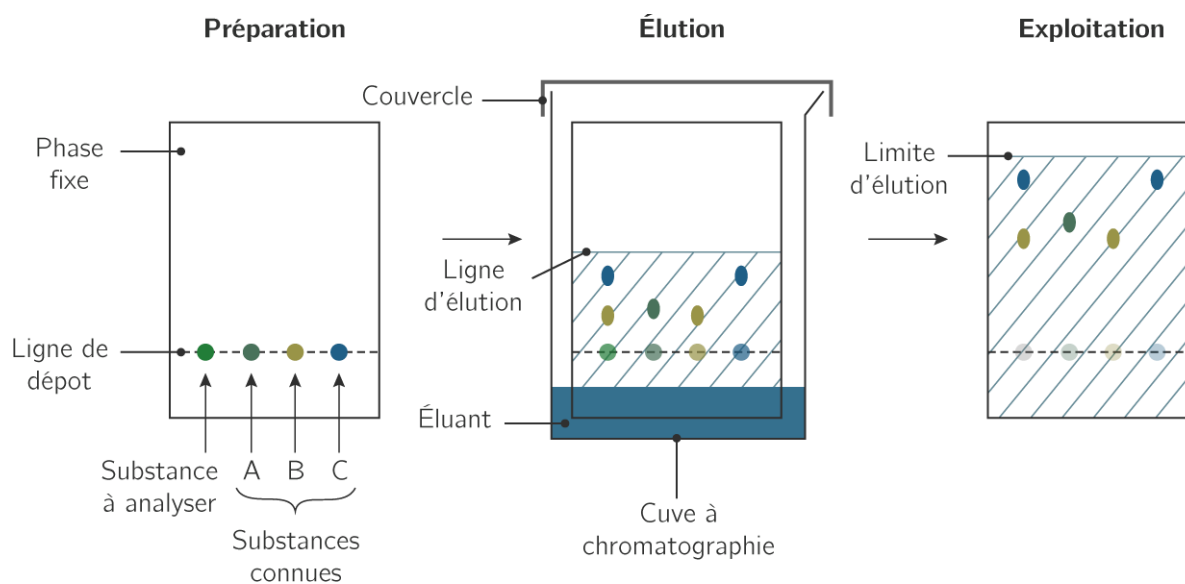


Fig. 14 : Procédure de la chromatographie sur couche mince

Le principe de la chromatographie sur couche mince repose sur la dispersion des molécules de l'échantillon sur deux phases, une phase stationnaire (fixe) et une phase mobile. Les constituants de l'échantillon se fixent sur la matière d'adsorption selon leurs forces liées essentiellement à la polarité.

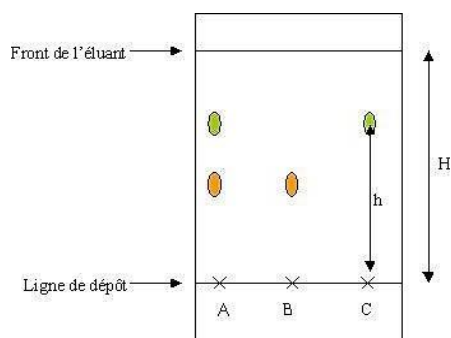
Lors de l'utilisation de solvants apolaires comme phase mobile, les constituants polaires de l'échantillon s'adsorbent sur la phase stationnaire permettant aux composés apolaires d'être détachés et séparés sur le support de migration.

En dehors du cas particulier où les composés sont visibles à l'œil nu, il existe 2 manières de visualiser les taches.

- Utilisation d'un réactif spécifique de coloration. Comme vous le verrez au cours des manipulations, il est souvent nécessaire de faire réagir après développement, les composés invisibles.
- Utilisation de plaque contenant un matériau fluorescent et visualisation à l'aide d'un éclairage ultraviolet. Les constituants de l'échantillon désactivent la fluorescence du matériau de sorte que la plaque est fluorescente partout sauf aux endroits où se trouvent les constituants. Certaines plaques de CCM contiennent un indicateur fluorescent permettant une résolution dans l'UV proche (366nm) ou lointain (254nm).

On mesure la distance de migration des composés, qui est comparée à la distance de migration du front de la phase mobile, ce qui permet de définir la référence frontale ou R_f (Fig. 15), caractéristique d'un composé dans des conditions précises de support, de solvant et de température. La chromatographie descendante permet de laisser couler le solvant dans la cuve

et le front du solvant n'est plus mesurable. On peut alors définir un Rf relatif par rapport à un composé de référence.



D'après la représentation du chromatogramme, on peut en déduire le rapport frontal :

$$R_f = h/H$$

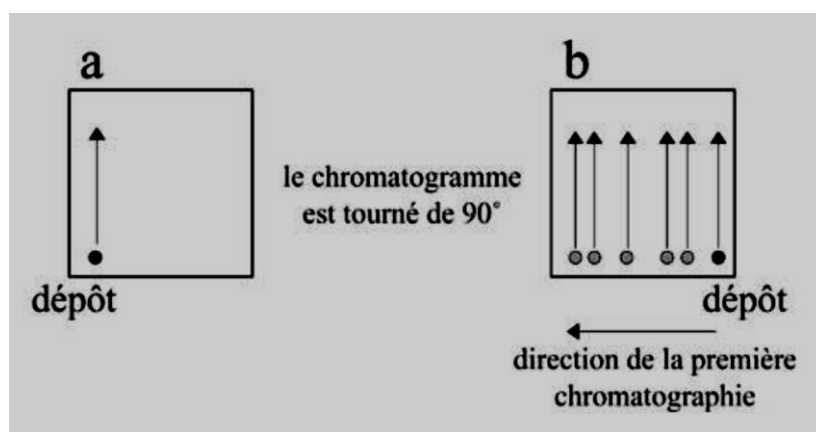
h : distance parcourue par l'échantillon

H : distance entre la ligne de dépôt et le front de l'éluant

Fig. 15 : Calcul du rapport frontal

❖ Chromatographie bidimensionnelle :

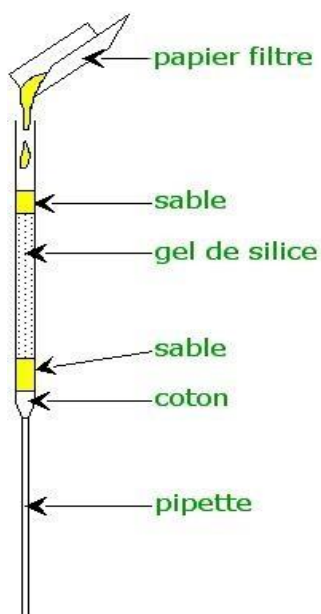
Dans le cas où le mélange contient des solutés de mobilités voisines, on peut augmenter le pouvoir séparateur en réalisant une chromatographie bidimensionnelle : sur le même support, on réalise une première chromatographie à l'aide d'un système de solvants, puis une deuxième à l'aide d'un second système de solvants, dans une direction perpendiculaire à la première.



c. La chromatographie sur colonne

La chromatographie sur colonne est basée sur le même principe que la chromatographie sur couche mince, sauf que la silice ne se trouve pas sur une plaque mais dans une colonne. Cette technique est très utilisée dans la purification en chimie organique. La séparation des composés est provoquée par l'écoulement continu d'un éluant passant dans la colonne par gravité ou sous l'effet d'une faible pression. Les composés sont entraînés par l'éluant à des vitesses différentes en fonction de leurs affinités avec la silice et avec l'éluant. Ce procédé permet de séparer les différents composants d'un produit mais aussi de purifier le produit

d'une réaction.



La « colonne » peut être n'importe quelle pipette ou tube de verre, du moment qu'une des pointes est effilée (pipette pasteur, pipette graduée, tube en verre), Fig. 16.

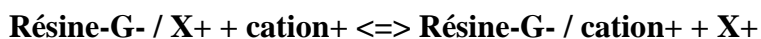
- ▶ Enfoncer délicatement à l'aide d'un agitateur (ou n'importe quel outil fin et long) un petit morceau de coton au fond de la pipette (pour faire un petit bouchon).
- ▶ Verser à l'aide d'un papier (filtre) et sur une hauteur de 1 cm environ du sable fin de Fontainebleau.
- ▶ Verser du gel de silice jusqu'aux 2/3 de la hauteur de la pipette, puis humidifier le gel de la colonne avec de l'eau distillée.
- ▶ Terminer avec environ 1 cm de sable, puis arroser délicatement d'eau. Il ne faut pas que le jet soit trop violent pour ne pas perturber votre installation.

Fig. 16 : Principe de la chromatographie sur colonne

❖ **Exemple de colonne échangeuse d'ions :**

Principe : Les échangeurs d'ions sont des macromolécules insolubles portant des groupements ionisables, qui ont la propriété d'échanger de façon réversible certains de leurs ions, au contact d'autres ions provenant d'une solution.

Résine cationique : qui échange réversiblement des cations. Une résine cationique est chargée négativement



Résine anionique : qui échange réversiblement des anions. Une résine anionique est chargée positivement

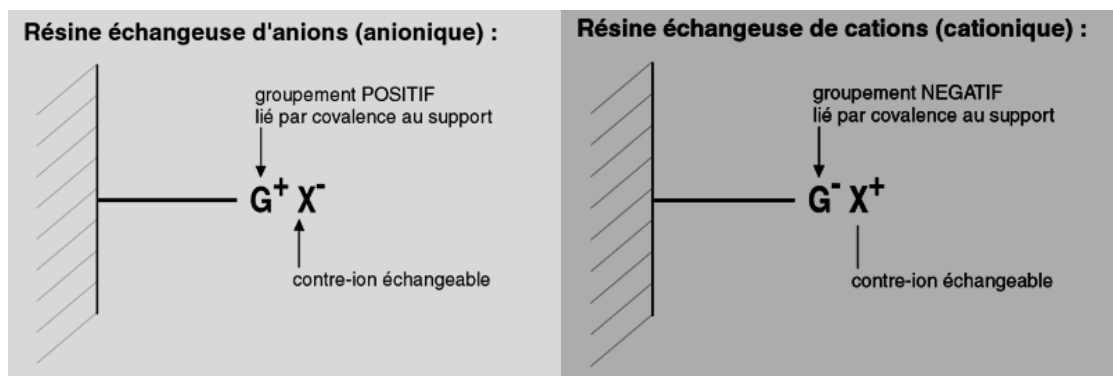
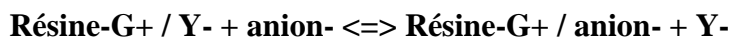


Figure 11: a-Résine échangeuse de cations (résine cationique). b- Résine échangeuse d'anions (résine anionique).

Chapitre 2 : CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

La chromatographie liquide haute performance (CHLP en français, HPLC: High Performance Liquid Chromatography en anglais) est une technique analytique très générale d'emploi. Elle correspond à une évolution de la chromatographie sur colonne. Pour améliorer les performances de celle-ci (en particulier l'efficacité de la résolution), il faut diminuer la taille des particules utilisées pour constituer la phase stationnaire; mais plus les grains sont petits, plus la durée de l'élution et de la séparation est grande. Il faut donc utiliser des pompes très performantes pour maintenir un débit d'éluant suffisant et constant à travers la colonne. Des pressions de plusieurs centaines de bars sont nécessaires pour assurer des débits raisonnables avec les nouveaux supports dont la taille des particules est comprise entre 3 et 10 μ m.

I. Principe

HPLC est une technique d'analyse qui consiste à séparer les espèces contenues dans un échantillon par partage entre une phase mobile (liquide) et une phase stationnaire (liquide ou solide). Chaque soluté injecté sur la colonne est soumis à deux effets antagonistes :

- un effet d'entraînement par la phase mobile dans laquelle il est soluble
- un effet de rétention par la phase stationnaire avec laquelle il interagit

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

La séparation et le temps de migration des composés à séparer dépendent des différences d'affinités de ces composés pour les phases mobile et stationnaire.

II. Description de l'appareillage

L'appareillage est plus complexe et plus onéreux qu'en chromatographie liquide traditionnelle, mais la rapidité d'exécution et la résolution de la méthode sont incomparablement supérieures et compensent largement le coût.

Le schéma général de l'organisation d'un appareillage HPLC est donné dans la figure 17. Les matériaux de l'ensemble du système, et notamment celui des tubulures, doivent être capables de supporter les pressions employées. Dans les premiers appareils, la plupart des éléments étaient réalisés en acier, avec plusieurs inconvénients :

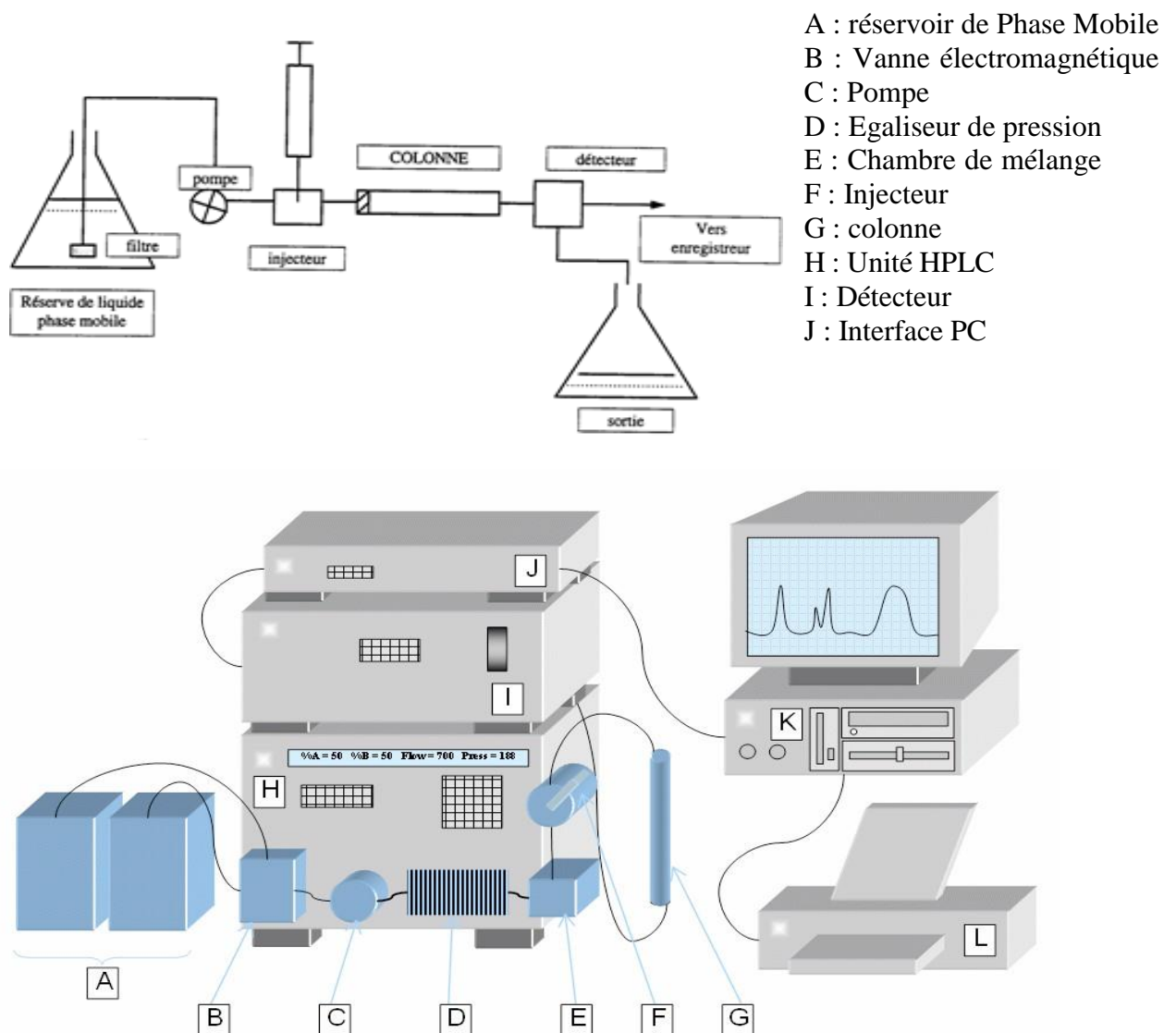


Fig. 17 : Structure d'un HPLC



Fig 18 : Image réelle d'un HPLC

L'instrumentation de la CLHP comprend un système d'introduction du solvant: réservoirs, vanne mélangeuse de solvants, pompe, amortisseur de pulsations, contrôleur de débit et une vanne d'injection dans la colonne qui permet d'introduire la phase mobile en haut de la colonne de manière continue, sans pulsations et avec un débit volumétrique et une pression connues. L'appareillage classique est composé des modules suivants:

a) Un réservoir de solvant (éluant)



b) La pompe



Pompe fonctionne / piston alternatif
→ Assure un débit constant Le système de pompage doit atteindre

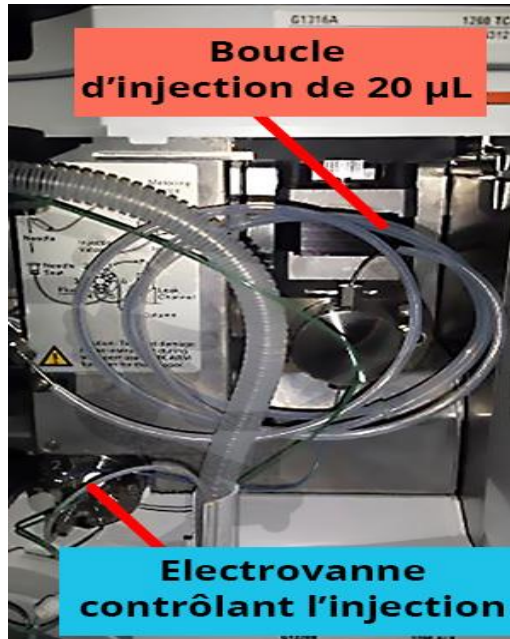
➤ Flaçon étanche (1 à 2L) :

Qui contient la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluants (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'éluant (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe doseuse. Pour éviter les bulles d'air provenant de l'O₂ dissout il est souhaitable de dégazer et filtrer les solvants.

Elle est munie d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. Elle permet de travailler:

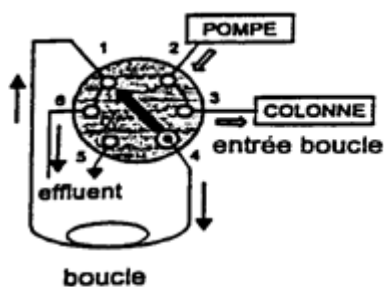
- ✓ en mode isocratique, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.
- ✓ en mode gradient, c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluants.

Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques μl à plusieurs ml/min , des pressions élevées: ~ 200 bars ($20\,000\text{kPa}$) ou plus.

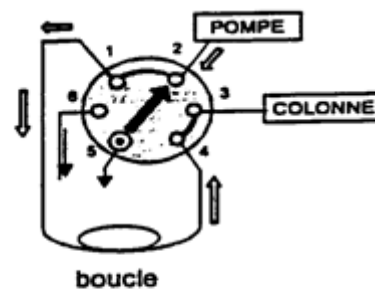


c) Vanne d'injection

- C'est un injecteur à boucles d'échantillonnage ou vanne à boucle d'échantillonnage, commandé manuellement. Pression élevée en tête de colonne donc impossible d'injecter à la seringue comme en CPG.
- Il existe des boucles de différents volumes (1 à 100µl), le choix du volume de la boucle se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser. Le système de la boucle d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, ce qui est important pour l'analyse quantitative.
- La boucle peut être mise en communication par des vannes avec le réservoir de phase mobile et la colonne



a) chargement



b) injection

Les deux phases de l'injection avec une boucle

- Remplissage de la boucle à P° atmosphérique
- Le trop plein est rejeté vers l'extérieur
- Pendant cette étape, la ϕ_m circule en permanence sur la colonne.
- Puis injection du contenu de la boucle en tournant la vanne d'injection, la ϕ_m est mise en communication avec la boucle et la colonne

d) La colonne



- Tubes droits en acier inoxydable
- 5 à 30 cm de long
- 3 à 4.6 mm de diamètre interne
- quelquefois, on place en amont une colonne de garde = petite colonne courte (1 à 2 cm) remplie avec la même ϕ_s que la colonne analytique

e) La phase stationnaire

Elle est située dans la colonne. Selon le type de chromatographie employée on peut distinguer 2 types de phase stationnaire (PS) :

1/ La phase normale: appelée encore PS imprégnées, c'est une phase solide constituée de gel de silice retenant à sa surface les composés (Fig. 18.B). Ce matériau est très polaire utilisé surtout en chromatographie d'adsorption (solide/liquide). Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête. L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations.

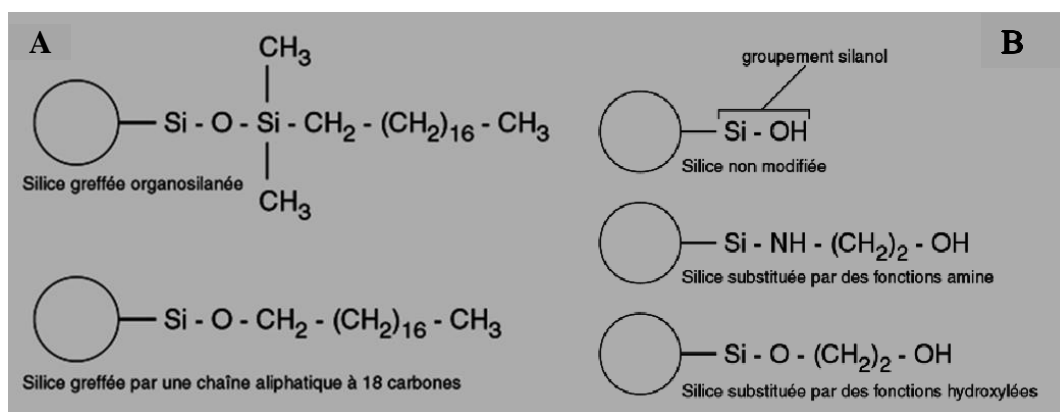


Fig. 18 : Silice non modifiée (A) et silice greffée (B)

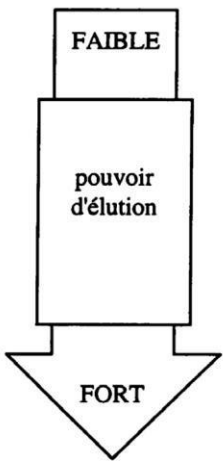

2/ La phase inverse : elle est majoritairement composée de silice greffées par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C_8 et C_{18}). Cette PS greffée est formée par des liaisons covalentes entre les groupements silanols de la silice et des molécules organiques (Fig.18.A). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (ACN, MeOH, H_2O). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante.

f) La phase mobile :

L'interaction plus ou moins forte entre la phase mobile et la phase stationnaire normale ou à polarité inversée se répercute sur les temps de rétention des solutés. La polarité de la phase stationnaire permet de distinguer deux situations de principe :

- ✓ si la phase stationnaire est polaire, on utilisera une phase mobile peu polaire la chromatographie est dite en phase normale ;
- ✓ si la phase stationnaire est très peu polaire, on choisira une phase mobile polaire (le plus souvent des mélanges de méthanol ou d'acétonitrile avec de l'eau), c'est la chromatographie en phase inverse. En modifiant la polarité de la phase mobile, on agit sur les facteurs de rétention k des composés.

Les silices greffées conduisent en général à une perte importante de polarité. Avec une phase greffée, l'ordre d'éluion est opposé à celui auquel on est habitué avec les phases normales. Ainsi avec un éluant polaire, un composé polaire migre plus vite qu'un composé apolaire. Dans ces conditions les hydrocarbures sont fortement retenus. On réalise des gradients d'éluion en diminuant au cours de la séparation la polarité de l'éluant (ex : mélange eau /acétonitrile dont la concentration en acétonitrile va en croissant au cours de l'éluion). On peut, en mélangeant plusieurs solvants, ajuster le pouvoir d'éluion de la phase mobile. Le tableau ci-dessous résume le pouvoir d'éluion de la phase mobile en HPLC.

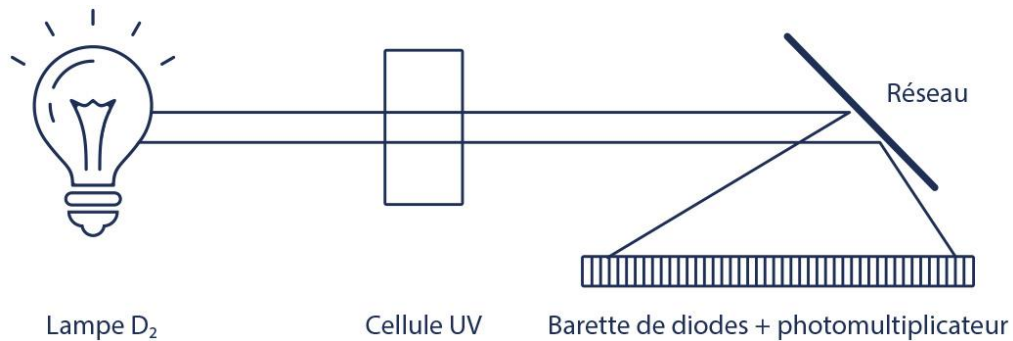
phase polaire normale	solvants classes par polarité croissante	phase à polarité inversée
	hexane toluène trichlorométhane dichlorométhane éther acétate d'éthyle acétonitrile méthanol eau	

g) Détecteurs :

Il n'existe pas de détecteur universel comme en chromatographie en phase gazeuse, en CLHP, les détecteurs sont spécifiques à chaque application. Le volume de détecteur CLHP doit être le plus faible possible afin de diminuer l'élargissement des bandes. Il existe des détecteurs de propriétés de la phase mobile qui dépendent de la présence d'un soluté: indice de réfraction, constante diélectrique, densité. Et des détecteurs de propriétés du soluté, que ne possèdent pas la phase mobile: absorbance dans l'ultraviolet, fluorescence ou courant de diffusion.

1. détecteurs à barrette de diodes.

L'utilisation du principe de la diode photoélectrique en tant que récepteur dans un spectrophotomètre est réservée au montage de type multicanal, sous forme de barrette de diodes. Une barrette de diodes de quelques mm contient plusieurs centaines de diodes, chacune reçoit le rayonnement contenu dans un petit domaine spectral. Chacun des circuits élémentaires est exploré par un système pilote : par un micro-ordinateur. Ce système permet l'acquisition du spectre de l'échantillon en temps réel, une représentation en 3 dimensions (temps, absorbance, longueur d'onde) et une caractérisation des composés par leur spectre.



2. Détecteurs d'absorption dans UV-Vis :

Cette détection est basée sur l'absorption d'une lumière monochromatique. Elle suit la loi de Beer•Lambert: $A = \epsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c$

λ = longueur d'onde dans UV-Vis;

c = concentration molaire du soluté en mol.L⁻¹ ;

A = absorbance du soluté; sans dimension ;

ϵ = coefficient d'absorption molaire du soluté (L.mol⁻¹. cm⁻¹) à λ ;

l = épaisseur (cm) de la solution traversée ou de la cellule.

La quantité minimale détectable est de l'ordre du nanogramme. Il existe plusieurs types d'appareils :

- ✓ à longueur d'onde fixe: ex: $\lambda = 254$ ou 313 ou 365 nm
- ✓ à longueur d'onde variable: 200 à 700 nm dans des spectrophotomètres à balayage utilisant une source continue et un monochromateur à réseau pour sélectionner la longueur d'onde (Fig. 19).
- ✓ à barrettes de photodiodes, qui donnent la valeur simultanée des intensités lumineuses sur tout le spectre. Les détecteurs à barrette de diodes facilitent l'identification des composés car un spectre de chaque pic est obtenu en quelques millisecondes. Les barrettes contiennent entre 70 et 512 diodes dont l'arrangement spatial conditionne la résolution. On peut ainsi générer des chromatogrammes à n'importe quelle longueur d'onde ou à plusieurs dimensions (Fig. 20). Les sensibilités se rapprochent actuellement de celles des détecteurs monochromatiques classiques.

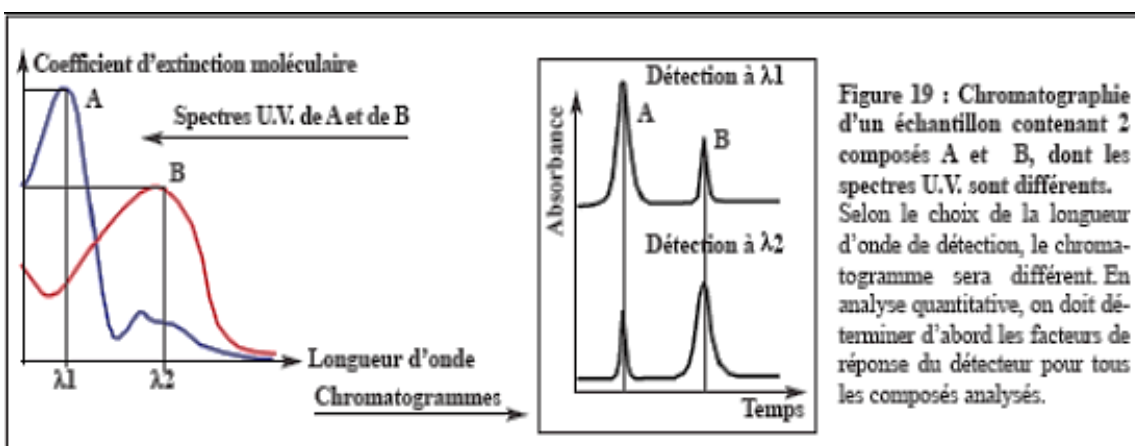
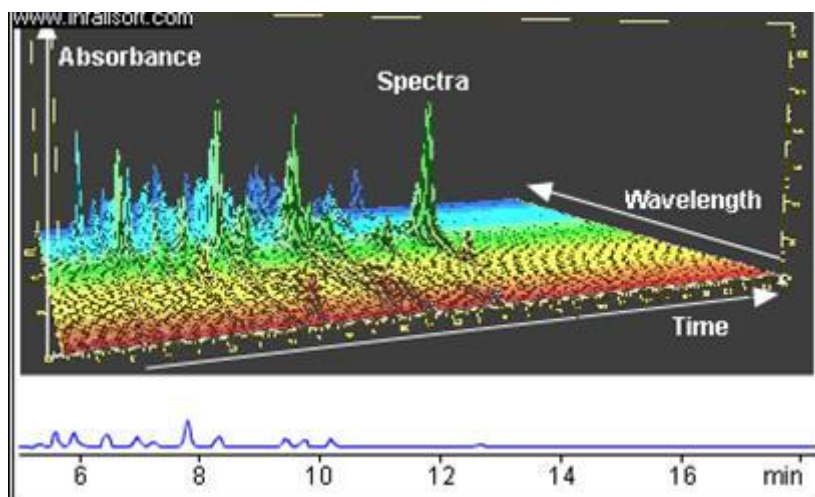


Figure 20 : Profil d'élution tridimensionnel en HPLC, obtenu grâce à un détecteur photométrique à barrette de diodes.



- Traitement informatique : Les spectres successifs des composés élués par la phase mobile sont traités par un logiciel informatique. On obtient des spectrochromatogrammes en 3 dimensions. $A = f(\lambda, t)$.

D'autres détecteurs photométriques sont possibles tels que ceux utilisant l'infrarouge, la fluorescence ou la réfractométrie par exemple.

3. Détecteurs d'absorption dans l'infrarouge :

- de 2,5 à 14,5 μm (4000 à 690 cm^{-1})
- à transformée de Fourier

Ces deux types de détecteurs ont des cellules avec fenêtres en chlorure de sodium ou fluorure de calcium. $L_{\text{cellule}} = 0,2$ à 1,0 mm $V_{\text{cellule}} = 1,5$ à 10 μL .

Toutefois les larges bandes d'absorption de l'eau et des alcools empêchent l'utilisation de ce détecteur infrarouge dans de nombreux cas.

4. Détecteurs de fluorescence :

Certains solutés sont fluorescents ou le deviennent suite à des réactions pré ou post colonne. Des détecteurs de fluorescence à laser permettent des détections de 1 à 10 pg et même en dessous.

5. Détecteurs réfractométriques :

Ils mesurent la différence d'indice de réfraction entre la phase mobile et la phase mobile avec l'échantillon. Ils nécessitent une température réglée à 0,01°C, car les indices de réfraction varient avec la température.

III. Théorie de base – Grandeurs Fondamentales

En chromatographie en phase liquide, les séparations sont basées sur la différence de distribution des espèces entre deux phases non miscibles l'une stationnaire (particules solides imprégnées ou non d'un liquide), l'autre mobile (liquide). Pour un système chromatographique donné, le coefficient de distribution K (ou coefficient de partage) est défini par:

$$K = C_s / C_m$$

C_s : concentration du soluté dans la phase stationnaire

C_m : concentration du soluté dans la phase mobile.

Si les molécules d'un mélange ont des affinités différentes pour chacune des deux phases, il apparaît des différences entre deux vitesses de migration d'où possibilité de séparation. La migration sera d'autant plus lente que l'affinité de la molécule pour la phase stationnaire sera grande. Rappelons que la solubilité d'un analyte dans une phase mobile donnée passe d'abord par la possibilité d'établissement d'échanges (liaisons). Sans échange il n'y a pas de solubilité possible et deux phases apparaissent.

Une bonne séparation en chromatographie liquide implique :

1. que les **divers constituants du mélange soient retenus** sur la colonne, donc présentent une affinité pour la phase stationnaire suffisante pour qu'ils apparaissent dans l'effluent après un volume supérieur au volume interstitiel de la colonne
2. que les **différents pics soient bien séparés**, ce qui pour deux pics successifs dépend de la distance séparant les sommets et leur largeur.
3. que l'analyse soit aussi **rapide** que possible.

3.1. Grandeurs de rétention

Si la quantité injectée est petite on obtient pour chaque composé élué un pic symétrique et gaussien (figure 20). On définit ainsi les paramètres suivants :

a) Le temps de rétention (t_r) :

C'est le temps d'élution au maximum du pic mesuré à partir de l'injection. Un chromatogramme type est schématisé, avec les paramètres principaux d'évaluation, sur la figure 20.

Un pic chromatographique est caractérisé par :

Temps mort

Le temps mort (t_m) est le temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire de la colonne, pour parcourir le trajet entre l'entrée et la sortie de la colonne (ou temps mis par la phase mobile pour traverser la colonne).

Le temps t_0 est le temps du début de l'injection.

Le temps de rétention

Le temps mis par les molécules d'un composé à analyser (soluté) pour parcourir le trajet entre l'entrée et la sortie de la colonne.

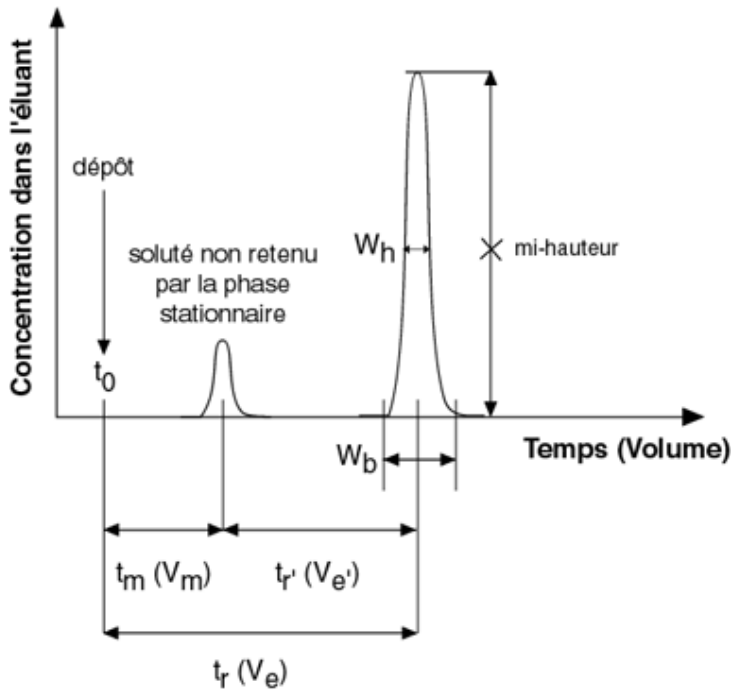
Un constituant est caractérisé par son temps de rétention t_r , temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui déterminé au maximum du pic lui correspondant sur le chromatogramme.

Le temps de rétention est indépendant de :

- la quantité injectée,
- la nature et de l'abondance des autres constituants dans le mélange.

Par contre il dépend de :

- la masse de phase stationnaire dans la colonne,
- débit de la phase mobile,
- volume mort du chromatographe (injecteur, détecteur, canalisations..),
- la nature de la phase stationnaire.



Légende :

- t_0 : début de l'injection
- V_m : volume mort de la colonne
- t_m : temps mort
- V_e : volume d'éluion (de rétention, V_r) d'un composé
- t_r : temps de rétention (d'éluion, t_e) d'un composé
- V_e' : volume d'éluion réduit ($V_e = V_e' + V_m$)
- t_r' : temps de rétention réduit ($t_r = t_r' + t_m$)
- W_b : largeur du pic à la base
- W_h ou δ : largeur du pic à mi-hauteur

Fig. 21 : Principaux paramètres d'un chromatogramme

b) Le volume de rétention (V_r)

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

$$V_r = t_r \cdot D = t_r \cdot v \cdot s \quad V_m = t_0 \cdot D$$

v : vitesse linéaire de la phase mobile ; s : section réduite de la colonne : $s = s' \cdot \varepsilon$ avec s' : section de la colonne et $\varepsilon = V_m / V_T$ (porosité)

Les espèces non retenues par la phase stationnaire apparaissent dans l'effluent après le temps t_0 correspondant à l'écoulement du volume interstitiel de la colonne ou volume de phase mobile V_m contenu dans la colonne.

Le volume de rétention V_r est relié directement au coefficient de distribution K par la relation:

$$V_r = V_m + K V_s$$

V_s : volume de la phase stationnaire (ou masse ou surface spécifique selon les unités de K)

Cette relation ne s'applique que dans le cas d'éluion linéaire c'est-à-dire quand K varie linéairement avec la concentration du composé dans chaque phase.

c) Le facteur de capacité k' (ou facteur de rétention) :

Si on considère une petite section de bandes de longueur dx le rapport des quantités du composé dans les deux phases de cette section est le facteur de capacité de la colonne k' .

Le facteur de capacité K' est le rapport de la quantité d'un soluté dans la phase stationnaire et dans la phase mobile.

$$K' = \frac{C_s \times V_s}{C_m \times V_m} = K \times \frac{V_s}{V_m}$$

V_s : volume de la phase stationnaire

V_m : volume de la phase mobile ou volume mort

K' est aussi le rapport du temps passé par un soluté dans la phase stationnaire sur le temps passé par ce même soluté dans la phase mobile.

$$K' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

De l'équation $V_r = V_m + K V_s$ on tire

$$V_s = \frac{V_r - V_m}{K}$$

$$\text{d'où : } k' = K \cdot \frac{V_r - V_m}{K \cdot V_m} = \frac{V_r - V_m}{V_m} = \frac{t_r - t_o}{t_o}$$

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

$$t_r = t_o (1 + k') \quad \text{et} \quad V_r = V_m (1 + k')$$

d) Sélectivité d'une colonne :

Pour caractériser la distance séparant les sommets de deux pics on utilise le facteur de sélectivité :

$$\alpha = \frac{t_{r2} - t_o}{t_{r1} - t_o}$$

Il s'agit du rapport des temps de rétention réduits

$$k' = \frac{t_r - t_o}{t_o}$$

$$\text{soit } t_r - t_o = k' \cdot t_o \text{ et } k' = K \cdot \frac{V_s}{V_m}$$

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{K_2}{K_1}$$

t_o et V_m ne dépendent que de la colonne

- Le coefficient de distribution

En chromatographie en phase liquide, les séparations sont basées sur la différence de distribution des espèces entre deux phases non miscibles l'une stationnaire (particules solides imprégnées ou non d'un liquide), l'autre mobile (liquide).

Pour un système chromatographique donné, le coefficient de distribution K (ou coefficient de partage) est défini par :

$$K = C_s / C_m$$

C_s : concentration du soluté dans la phase stationnaire

C_m : concentration du soluté dans la phase mobile.

- e) Efficacité d'une colonne :

La largeur d'un pic est caractéristique de l'efficacité de la séparation : plus le pic est fin plus la chromatographie est efficace. L'efficacité est mesurée par :

- le nombre de plateaux théoriques N :

Les caractéristiques géométriques de la courbe de Gauss (figure 21) permettent de calculer, pour un soluté donné, N à partir du chromatogramme.

$$N = 16.(tr/\omega)^2 = 5,54.(tr/\delta)^2$$

ω largeur du pic à la base: distance entre les points d'intersection des tangentes au point d'inflexion avec la ligne de base et δ largeur du pic à mi-hauteur.

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

- La hauteur équivalente à un plateau théorique : HEPT, qui est défini comme :

$$HEPT = \frac{L}{N}$$

L : longueur de la colonne.

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

Quels sont les facteurs d'élargissement des pics ?

- ✓ La diffusion turbulente : l'élargissement est expliqué par le fait qu'il existe différents chemins parcourus par les molécules d'un soluté. La longueur des chemins n'étant pas la même, elles ne mettent pas toutes le même temps pour traverser la colonne : le pic s'élargit. Ce phénomène est fonction des particules et de la régularité du remplissage.
- ✓ La résistance au transfert de masse : l'élargissement est expliqué par l'accumulation de phase mobile dans les anfractuosités du support. Les molécules qui y diffusent vont moins vite que celle qui n'y diffuse pas.
- ✓ La diffusion longitudinale. Ce phénomène diminue plus la vitesse de la phase mobile augmente. Dans la pratique cette diffusion est négligeable en HPLC.

En conclusion l'efficacité calculée d'une chromatographie, représentée par la HEPT, est fonction de la vitesse de la phase mobile donc du débit, et de la qualité (régularité, remplissage) de la phase stationnaire.

Ainsi la théorie cinétique conduit à l'équation de VAN DEEMTER :

$$HEPT = X + \frac{Y}{v} + Z \cdot v$$

v : vitesse réduite = vitesse linéaire de la phase mobile.

- **X** est l'influence de la diffusion turbulente due aux hétérogénéités dans l'écoulement. Il existe plusieurs chemins possibles pour la phase mobile. Cet effet sera d'autant moins prononcé que les particules seront de même forme (sphérique) et de même dimension (d'où la nécessité d'utiliser de telles phases).
 - **Y / v** est l'influence de la dispersion des molécules par diffusion longitudinale; Y / v est proportionnel au coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile DM.
$$Y = 2 \gamma DM \quad \gamma : \text{facteur de tortuosité } (> 1)$$
Y / v diminue quand v augmente. Comme DM est faible en milieu liquide, Y / v est généralement négligeable.
 - **Z.v** est l'influence de la résistance au transfert de masse. Z peut être diminué en réduisant les distances à parcourir par le soluté dans chaque phase (diminution du

diamètre des particules). Cette approche est surtout utilisée en chromatographie phase vapeur.

Au concept du nombre de plateaux théoriques, on peut associer la notion de plateaux efficaces :

$$N_{\text{eff}} = (k' / 1 + k')^2 \cdot N \quad \text{soit} \quad N_{\text{eff}} = 16 \cdot (t_r - t_0)^2 / \omega^2 \quad \text{soit encore} \quad N_{\text{eff}} = 5,54 (t_r - t_0)^2 / \delta^2$$

Ce nombre de plateaux efficaces permet d'apprécier de manière plus concrète la véritable efficacité de séparation de la colonne. En effet, si k' est petit, la séparation peut être impossible même avec N grand.

f) Résolution :

Elle quantifie la qualité de la séparation en caractérisant le fait qu'il y ait ou non chevauchement de 2 pics contigus. La résolution R_s entre deux pics est définie par la relation :

$$R_s = 2 \frac{t_{r1} - t_{r2}}{m1 + m2}$$

$R_s < 1$: mauvaise résolution

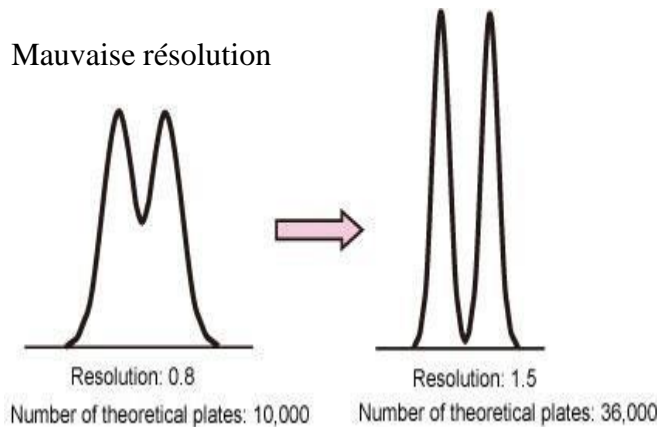
$1 < R_s < 1,4$: résolution acceptable

$1,4 < R_s < 1,6$: résolution optimale

$R_s > 1,6$: résolution trop bonne car le temps d'analyse est rallongé

Plus R_s est grand, meilleure est la séparation.

Bonne résolution



En supposant $\omega_2 = \omega_1$, on a :

$$R_s = \frac{1}{4} \cdot \left(\frac{a-1}{a} \right) \cdot \left(\frac{k^2}{1+k^2} \right) \cdot \sqrt{N}$$

g) Temps d'analyse : (Nombre de plateaux efficaces par unité de temps)

$$t_r = (1 + k') \cdot \frac{L}{v}$$

V : vitesse linéaire de la phase mobile. Comme $HEPT = L / N$ et $t_0 = L / v$

$$t_r = N \cdot (1 + k') \cdot \frac{HEPT}{v}$$

$$N_{eff} = \left(\frac{k'}{1+k} \right)^2 \cdot N$$

$$\text{d'où } \frac{N_{eff}}{t_r} = \frac{v}{HEPT} \cdot \frac{k'^2}{(1+k^2)^3}$$

h) Notion de pression :

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

Les particules de phase stationnaire sont sphériques. Si l'on divise leur diamètre par 10, on diminue leur surface d'un facteur 100 et leur volume d'un facteur 1000. On peut donc placer dans la colonne 1000 fois plus de particules et donc augmenter de 10 fois la surface en contact avec la phase mobile. La résistance à l'écoulement est donc augmentée.

En conséquence, pour maintenir le débit constant dans la colonne il faut augmenter la pression plus la granulométrie de la phase stationnaire est faible.

En HPLC on travaille, en tête de colonne, à des pressions entre 20 et 150 bars.

IV. Les différents modes de séparation

Les différents types de chromatographie dépendent des phénomènes d'interactions mises en jeu. En chromatographie en phase liquide les principales interactions qui régissent les mécanismes de rétention et d'éluion de solutés sont, en fonction de l'énergie mise en jeu, liées à des liaisons chimiques:

- soit de Van der Waals (1 à 9 kJ.mole⁻¹). Il s'agit d'interactions dipolaires liées à la présence de dipôles induits et instantanés ou permanents dans la molécule. Ces interactions existent dans pratiquement tous les systèmes chromatographiques. Leur rôle est souvent négligé en raison de leur faible énergie. Ces interactions se produisent à faible distance (0,3 à 0,6 nm) et diminuent d'intensité quand la température augmente
- soit hydrophobes (4 à 12 kJ.mole⁻¹). Dans ce cas, c'est l'attraction entre deux (ou plus) molécules d'eau séparées par une molécule ne donnant que peu ou d'interaction avec elles qui chasse cette molécule. Dans ce cas, moins la molécule est polaire (incapable de donner des interactions avec l'eau) et plus forte est la répulsion. La chaleur augmente l'agitation des molécules d'eau et augmente donc la force de répulsion. Ces interactions se produisent entre 0,2 et 0,4 nm.
- soit hydrogène (8 à 40 kJ.mole⁻¹). Il s'agit d'une interaction dans laquelle deux atomes électronégatifs dont l'un est lié à un atome d'hydrogène "partagent" inégalement cet atome. La distance de ces liaisons est d'environ 0,2 nm. Ces interactions sont données par l'eau ; elles diminuent d'intensité avec la température.
- soit polaires ionisées (électrostatiques ou de Coulomb, 40 à 85 kJ.mole⁻¹). Ces interactions entre ions dépendent, pour la plupart des groupes ionisables organiques, du pH. Ainsi par exemple les groupements carboxyles ne sont ionisés significativement qu'à des pH > pKa. L'intensité de ces liaisons de forte énergie diminue avec la température.
- soit covalentes (330 à 400 kJ.mole⁻¹). L'énergie de ces liaisons est très élevée et leur réversibilité nécessaire à leur implication en chromatographie en phase liquide n'est pas toujours accessible. Les seules liaisons covalentes réversibles utilisables en chromatographie en phase liquide sont les liaisons par pont disulfure. Ces liaisons sont peu sensibles aux variations de température dans des conditions de pH ou de potentiel d'oxydoréduction données.

Les différents systèmes chromatographiques diffèrent les uns des autres par la nature des interactions chimiques échangées entre soluté, solvant et phase stationnaire. Pour qu'une phase stationnaire soit utilisable il est donc nécessaire qu'elle donne une (ou plusieurs) interaction avec le soluté (pour le retenir), mais il est aussi nécessaire que le solvant constituant la phase mobile donne des interactions avec le soluté (pour l'éluier) et avec la phase stationnaire.

Il existe différents modes de séparation en chromatographie en phase liquide :

- l'adsorption
- le partage (80% des séparations)
- l'échange d'ions
- l'exclusion

V. Chromatographie chirale

5.1. Caractères généraux :

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

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

5.2. Principe

Pour comprendre le fonctionnement de ce type de chromatographie, il faut comprendre les grands principes de la chromatographie. La séparation chromatographique est basée sur les différences de distribution de solutés entre deux phases non miscibles (dont l'une est solide), ce qui se traduit, au niveau macroscopique, par une différence de vitesses de migration des différents constituants du mélange. Cette vitesse est déterminée par un coefficient de partage K ;

$K = \text{concentration du soluté dans la phase stationnaire} / \text{concentration du soluté dans la phase mobile.}$

La théorie thermodynamique est une des théories élaborée pour expliquer le mécanisme de la chromatographie. Pour une bonne séparation, il faut une colonne efficace (dépend du nombre de plateaux théoriques), c'est-à-dire capable de donner des pics étroits, et une bonne résolution, c'est-à-dire une bonne séparation des deux pics sur le chromatogramme, correspondant aux solutés qu'on veut séparer.

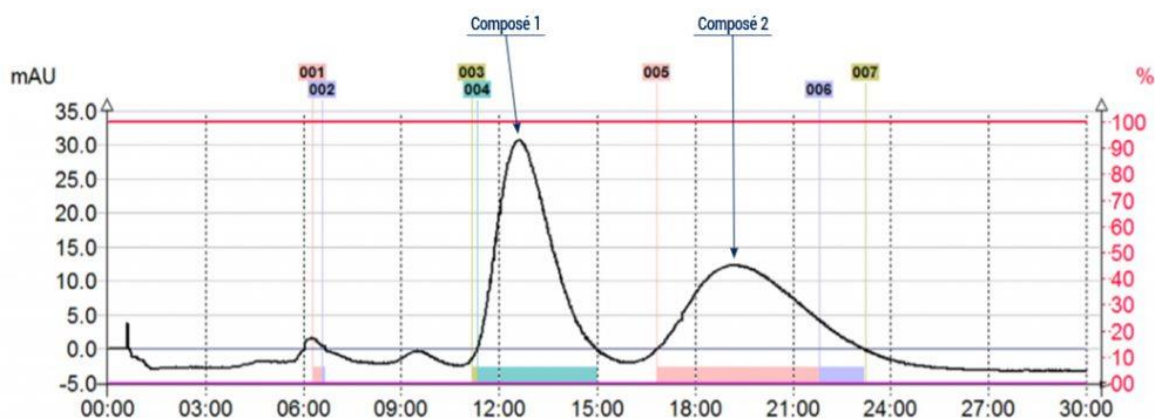
Tout cela est valable pour la chromatographie chirale, et cette dernière présente en plus des caractéristiques spécifiques. Dans cette technique, le mélange racémique à séparer est introduit et va interagir avec la phase stationnaire chirale (PSC). L'obtention de la séparation des énantiomères passe par la formation réversible de complexes diastéréoisomères dans la colonne de chromatographie (par liaison de van Der Waals entre les solutés qu'on veut séparer et le sélecteur chiral). L'intérêt est que les complexes diastéréoisomères ainsi constitués possèdent des propriétés physiques différentes ; ainsi l'un des isomères sera plus accroché que l'autre et migrera par conséquent plus lentement, donnant la possibilité de leur séparation physique. Selon la règle des trois points, pour une bonne séparation, il doit exister trois points d'attache entre la PSC et un des isomères, avec au moins un des trois dépendant de la stéréochimie.

Les cyclodextrines sont des sélecteurs chiraux particulièrement utilisés ; leur intérêt provient du caractère hydrophobe de leur cavité donnant la possibilité de l'accueil d'une molécule et par conséquent la formation d'un complexe.

Si l'échantillon est soluble, la méthode appropriée est la chromatographie en phase liquide à haute pression (HPLC). L'appareil comporte lui aussi un injecteur et un détecteur de mêmes fonctions que pour la CPG, mais également :

- des pompes ayant pour rôle d'assurer le débit du solvant d'élution qui doit être constant.
- une colonne le plus fréquemment en acier mesurant entre 15 et 30 cm de long et de diamètre interne compris entre 5 et 10 mm.

Si l'échantillon à analyser est gazeux ou susceptible d'être vaporisé, on utilise la chromatographie en phase gazeuse (CPG). La phase stationnaire est alors un liquide fixé sur un support. (Voir chapitre CPG).

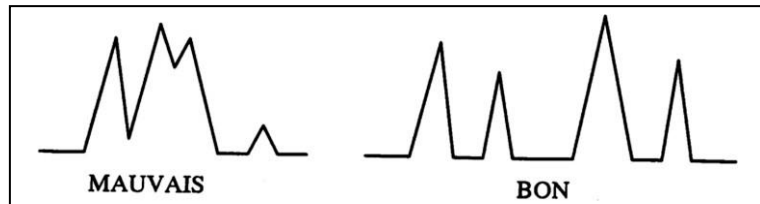


Exemple de purification chirale par chromatographie chirale ou chromatographie énantiosélective

VI. Application de la chromatographie à l'analyse

6.1. Analyse des chromatogrammes

Une bonne séparation se traduira par une séparation distincte des pics correspondant à chacun des produits



Un chromatogramme doit être parfaitement reproductible. La composition de la phase mobile est un paramètre particulier à la HPLC. Il faut donc préciser pour chaque analyse :

- ✓ le type de colonne : marque, nature, diamètre, longueur, support..
- ✓ la nature de l'éluant : solvant, si c'est un mélange préciser sa composition, débit, mode de détection λ en nm.
- ✓ la quantité injectée, le début de l'injection sur le chromatogramme, la sensibilité du détecteur, etc..

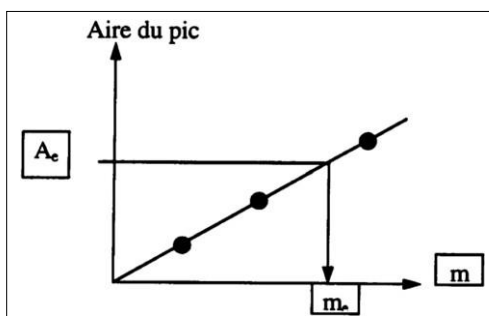
6.2. Analyse quantitative

Cette analyse est basée sur le fait que l'aire des pics chromatographiques est proportionnelle à la concentration ou à la quantité de produit analysé.

a) Méthode de l'étalonnage externe :

Il est nécessaire de disposer d'une quantité suffisante du produit afin de faire une courbe d'étalonnage $Aire = f(\text{masse ou concentration du produit})$, pour un volume injecté constant V .

L'injection ultérieure du même volume V de l'échantillon à doser permet, à l'aide de la mesure de l'aire du pic reportée sur la courbe d'étalonnage, de connaître la masse ou la concentration recherchée. Cette méthode est plus précise que celle qui consiste à ne faire qu'une mesure avec l'étalon et à utiliser une règle de trois :



$$A_e/m_e = A_{et}/m_{et}$$

A: Aire des pics

e : échantillon

et : étalon

m : masse du produit remplaçable
par la concentration

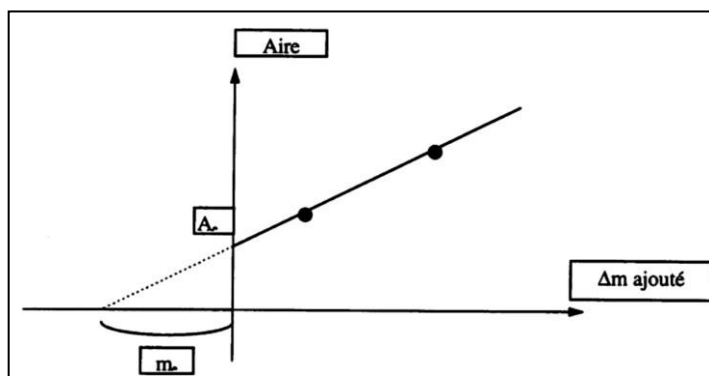
b) Méthode des ajouts :

Comme la précédente, cette méthode nécessite de posséder le produit à analyser pur; après avoir analysé l'échantillon, on ajoute à celui-ci des quantités connues Δm du produit avant de le chromatographier à nouveau (faire au minimum deux ajouts), ce qui entraîne une variation de l'aire du pic ΔA .

Si m est la masse contenue dans l'échantillon à analyser,

$$(\Delta A/\Delta m) = a/m \text{ soit } m = A^*(\Delta m/\Delta A)$$

Si le produit ajouté est en solution, il faut tenir compte des effets de dilution.



c) Méthode de l'étalon interne (utilisée essentiellement en CPG) :

On compare la réponse du ou des produits à analyser à celle d'un étalon interne, donc introduit dans le mélange à doser et convenablement choisi.

Une solution étalon est préparée avec le ou les produits que l'on veut doser. Les masses sont connues $m'1$, $m'2$, et ... m_e pur l'étalon ; à ces masses correspondent les aires $A'1$, $A'2$, ..., $A'e$, sur le chromatogramme.

Dans l'échantillon contenant les masses $m1$, $m2$, ... de solutés on ajoute m_e de l'étalon, ce qui donne les aires $A1$, $A2$, A_e .

On obtient :

$$m'_1 = \alpha_1 A'_1 \qquad m'_2 = \alpha_2 A'_2 \qquad m_e = \alpha_e A'_e$$

avec α coefficient de proportionnalité

$$\text{et } k_1 = (\alpha_1/\alpha_e) = (m'_1 A'_e / m_e A'_1)$$

d'où la valeur k_1 puisque toutes les données sont connues.

Dans l'échantillon inconnu on aura :

$$m_1 = \alpha_1 A_1 \qquad m_e = \alpha_e A_e$$

$$(m_1/m_e) = (\alpha_1 A_1/\alpha_e A_e) = k_1(A_1/A_e) \qquad m_e, k_1, A_1, A_e \text{ sont connus.}$$

VII. Domaine d'application

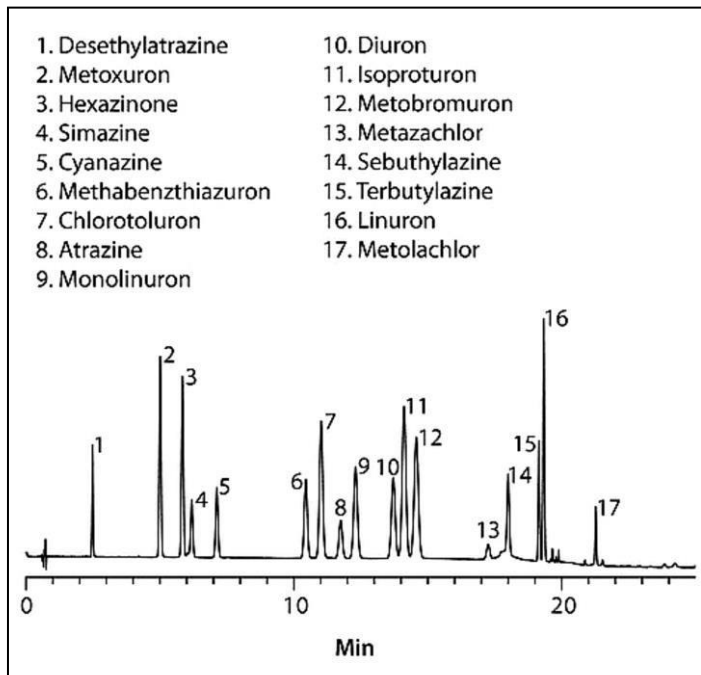
Le domaine d'application de la technique (CLHP) est très vaste.

- ✓ Industries chimiques et para chimiques ;
- ✓ Agro-alimentaires ;
- ✓ Environnement ;
- ✓ Pharmacie
- ✓ Biochimie

Il y a aussi d'autres applications récentes :

- ✓ Contrôle de la pureté optique des molécules thérapeutiques ;
- ✓ Analyses des résidus et des traces dans le domaine environnemental ;

- ✓ Suivi des concentrations des composés cytotoxiques (chimiothérapie anticancéreuse).



Exemple: Séparation des herbicides de l'eau

- Colonne C18
- Phase mobile: acetate d'ammonium (pH 6.8) /acetonitrile
- Détecteur UV 240 nm

VIII. Couplage HPLC- MS

Les analystes sont de plus en plus confrontés à des demandes nécessitant une réponse rapide, alliant sensibilité et fiabilité, en même temps qu'une information la plus complète possible sur l'échantillon. Dans ce but, les couplages de méthodes séparatives avec des détecteurs spécifiques et sensibles sont développés depuis quelques années. La chromatographie liquide haute performance (HPLC ou LC) associée à un spectromètre de masse utilisant un plasma à couplage inductif comme source d'ionisation (ICP-MS) connaît un succès croissant. Elle a pour but l'identification de la structure de la molécule.

Le principe repose sur deux aspects :

- LC: Séparation des molécules organiques
- MS: Identification de leur structure

Le principe présenté selon les étapes suivantes :

- Volatiliser: Séparer les molécules les unes des autres: on passe de l'état de matière condensée à un état gazeux.
- Ioniser: Transformer les molécules en ions
- Mesurer les rapports m/z: La masse moléculaire est calculée à partir du rapport masse (m)/nb de charges (z)

Chapitre 3 : CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

(CPG)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique très répandue, dont les premières applications sont maintenant vieilles de plus de 60 ans. 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. La chromatographie en phase gazeuse est, comme toutes les techniques de chromatographie, une technique qui permet de séparer des molécules d'un mélange éventuellement très complexe de nature très diverses. Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Elle est de plus en plus utilisée dans les principaux domaines de la chimie. L'analyse des liquides ou solides impose de pouvoir les transformer à l'état de vapeur par chauffage. C'est sans doute la principale contrainte à laquelle il faut penser avant de choisir cette technique, puisqu'elle limite son emploi à l'étude des composés moléculaires thermostables et suffisamment volatils. 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.

3.1. Principe

Le principe de la séparation par C.P.G. consiste à partager l'échantillon à analyser entre deux phases. L'une de ces phases est un liquide stationnaire uniformément réparti sous forme d'une pellicule mince sur un solide inerte de grande surface spécifique, tandis que l'autre phase est un gaz mobile qui s'écoule à travers l'ensemble stationnaire. Selon la nature de la phase stationnaire on peut distinguer deux cas :

1 - La chromatographie gaz-liquide (partage). La phase stationnaire est un liquide non volatil fixé par imbibition d'un support inerte. Le soluté se partage entre le gaz vecteur et le liquide stationnaire. Plus un soluté est soluble dans la phase stationnaire, plus le R_F (distance parcourue par le soluté / distance parcourue par la phase mobile) est petit et le temps d'émergence élevé.

2 - La chromatographie gaz-solide (adsorption). La phase stationnaire est un solide adsorbant (gel de silice, alumine...). Plus l'adsorption d'un soluté sur la phase stationnaire est élevée, plus le R_F est faible et le temps d'émergence élevé.

Dans les deux cas, le gaz vecteur est le gaz qui véhicule les solutés ; la phase mobile est constituée du gaz vecteur et des solutés gazeux.

Les échantillons liquides sont injectés dans la chambre de vaporisation à l'aide d'une microseringue. La température est telle (c'est généralement celle du four) que la vaporisation est immédiate. Les limites de sensibilité sont, selon les appareils, de l'ordre du ng et même du pg. Le traitement de l'échantillon varie selon les substances analysées. Lorsque les solutés sont directement volatilisables, les substances sont solubilisées dans un solvant et chromatographiées. Lorsque les solutés ne sont pas volatils à la température du chromatographe ou bien sont décomposés à cette température, il faut les transformer en dérivés volatils stables : les acides aminés sont ainsi estérifiés par le butanol, les acides gras estérifiés par le méthanol, les oses réduits en alditols, puis acétylés...

Les constituants du mélange sont inégalement retenus par la phase stationnaire lors de la traversée de la colonne. De ce phénomène nommé « rétention », il résulte que les constituants du mélange injecté se déplacent tous moins vite que la phase mobile et que leurs vitesses de migration respectives sont inégales. De ce fait, les constituants du mélange sortent de la colonne les uns après les autres au sein de la phase mobile. A la sortie de la colonne se trouve un détecteur relié à un enregistreur. Lorsqu'un constituant du mélange arrive au niveau du détecteur, un pic apparaît sur l'enregistreur. Le temps de sortie de chaque constituant t_R , nommé temps de rétention, caractérise de façon qualitative le constituant. L'aire du pic permet de déterminer la concentration massique de chaque soluté dans le mélange injecté. L'analyse d'un mélange peut donc être quantitative.

3- La phase mobile

La phase mobile est un gaz de faible viscosité, trois gaz sont exclusivement employés, l'azote, l'hydrogène et l'hélium.

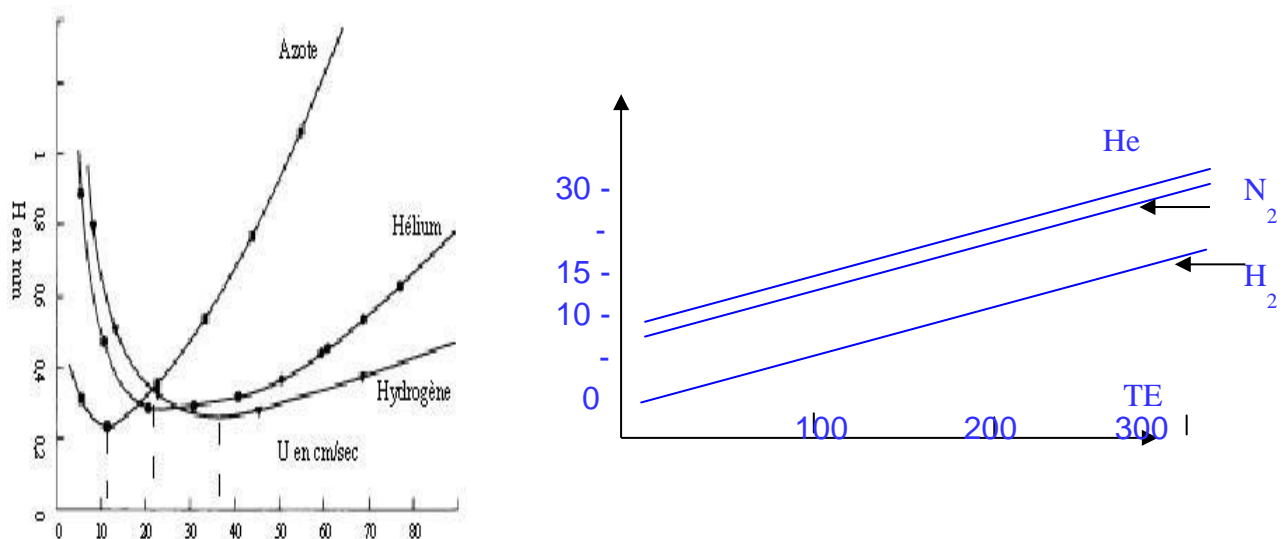


Fig. 21 : Courbes de Van Deemter pour l'azote, l'hélium et l'hydrogène

Les courbes de Van Deemter $H = f(u)$ de la figure 21 montre que la vitesse optimale de l'hydrogène est plus de 3 fois plus grande que celle de l'azote. Les analyses employant l'hydrogène pourront donc être effectuées 3 fois plus rapidement que celles utilisant l'azote (à

efficacité constante). Malheureusement l'hydrogène est un gaz dangereux présentant des risques d'explosion. Pour ces raisons de sécurité, c'est l'hélium qui en général est utilisé.

3.2. Description de l'appareillage

Le schéma ci-dessous décrit les différentes parties de l'appareil CPG ;

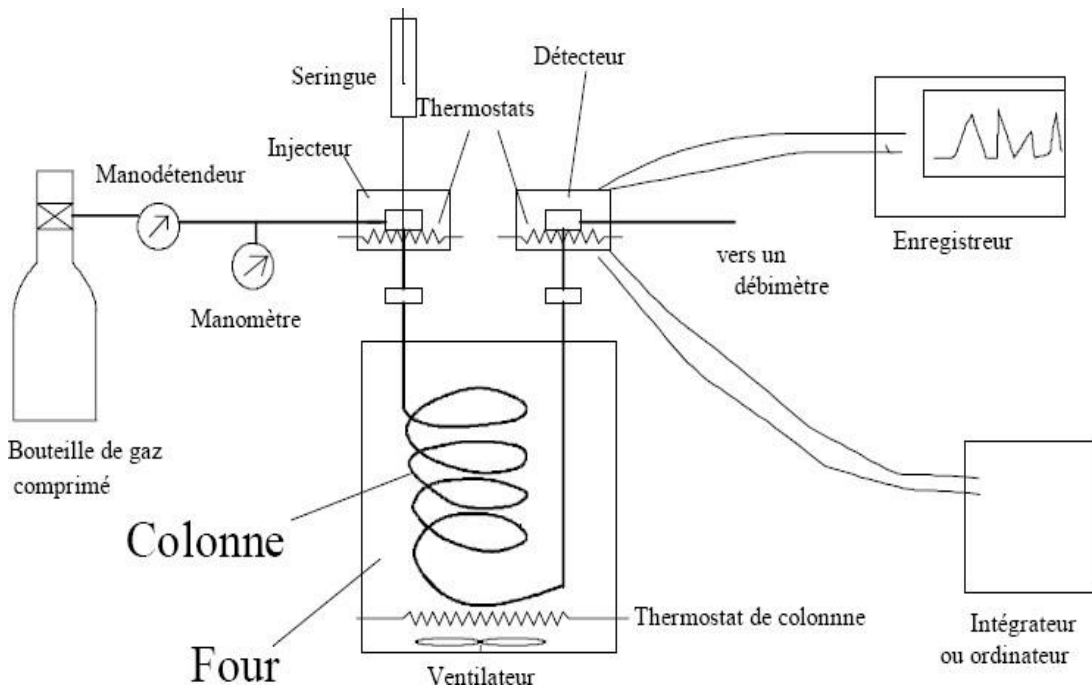


Fig. 22: Schéma simplifié du chromatographe en phase gazeuse

Un chromatographe est constitué en première approximation de trois organes essentiels :

- l'injecteur
- la colonne
- le détecteur

3.2.1. Gaz vecteur

Le choix du gaz vecteur est conditionné par l'efficacité de la séparation et la sensibilité du détecteur. Le gaz vecteur doit être pur, inerte (il ne doit pas réagir avec les constituants du mélange à séparer) et le moins miscible possible avec la phase stationnaire. Le choix du gaz vecteur est en grande partie lié à la nature du détecteur utilisé: hydrogène ou azote avec un détecteur à conductivité thermique (catharomètre), azote ou hélium avec un détecteur à ionisation de flamme, azote ou mélange argon-méthane avec un détecteur à capture d'électrons.

3.2.2. Injecteur

Le système d'injection joue plusieurs rôles, que l'échantillon se trouve sous forme solide, liquide ou gazeuse:

- rôle d'interface qui permet d'introduire l'échantillon dans le chromatographe
- rôle de système de vaporisation (dans le cas d'un échantillon liquide ou solide)
- rôle d'organe de transfert dans la colonne chromatographique

Les caractéristiques des injecteurs, ainsi que les modes d'injection, diffèrent suivant le type de colonne auxquelles ils sont reliés.

a) Injection par vaporisation directe

Le système le plus courant est l'injecteur à septum représenté ci-dessous. Il s'agit d'un tube métallique, doublé d'un chemisage de verre (insert), balayé par le gaz vecteur et chauffé à une température supérieure de 20 à 30°C au point d'ébullition du constituant le moins volatil du mélange analysé de façon à permettre une vaporisation immédiate de tous les constituants du mélange. L'une des extrémités de l'injecteur est obturée par une pastille d'élastomère siliconé nommée septum pour permettre le passage de l'aiguille de la microseringue qui contient l'échantillon à injecter et l'autre est reliée à la colonne. La totalité de l'échantillon injecté est transféré dans la colonne.

L'introduction du mélange se fait par l'intermédiaire d'une microseringue dont le volume varie généralement de 1 à 10µL et dont l'aiguille a un diamètre de l'ordre de 0,15mm.

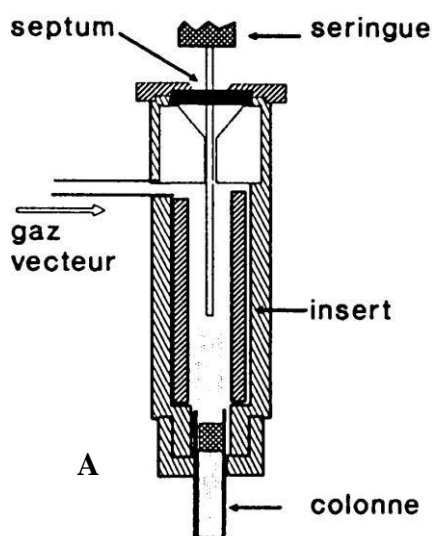
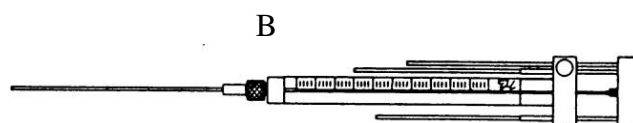


Fig. 23 : l'injecteur à septum (A) ;
Dessin d'une seringue de 10
µL(B), couramment utilisée en
CPG



Il existe des injecteurs automatiques pour liquides, automates qui répètent avec une excellente reproductibilité la séquence rinçage de la seringue, prélèvement de l'échantillon et introduction de celui-ci dans l'injecteur. La reproductibilité des volumes injectés est meilleure que 2%. Dans ce cas, un passeur automatique d'échantillons est inclus dans l'appareil.

Ce mode d'injection est utilisé pour les colonnes remplies et certaines colonnes capillaires.

b) Injection «split/splitless»

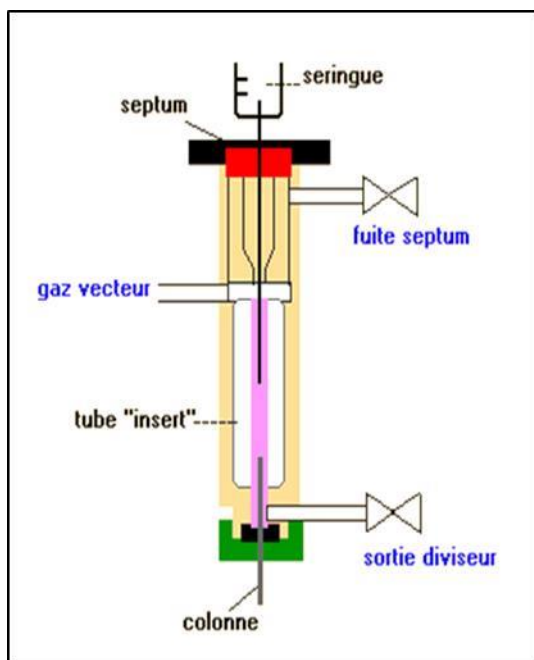


Fig. 24: Principe d'un injecteur "split-

Il s'agit d'injecteurs standard (95% des appareils en sont équipés) pouvant fonctionner suivant deux modes, avec ou sans division (encore appelés split ou splitless). C'est à dire que l'on peut ajuster la quantité de produit passant dans la colonne par rapport à la quantité injectée dans le chromatographe. Cet ajustement se fait à l'aide d'une vanne. Si on injecte un microlitre de produit (1 ml) et que seulement 0,01 ml rentre dans la colonne, on a un "split" de 100 et 0,99 ml de la solution a été évacué à l'extérieur via la vanne de "split". En mode split, le gaz vecteur arrive avec un grand débit dans la chambre de vaporisation; une vanne de fuite sépare le courant gazeux en deux parties dont la plus petite est la seule à pénétrer dans la colonne. Ce mode est utilisé dans le cas des colonnes capillaires à faible débit. Le mode splitless est réservé aux échantillons très dilués.

Le four est un élément essentiel aux chromatographes modernes car doit posséder une excellente stabilité thermique (jusqu'à 450 C). C'est une enceinte thermostatée dans lequel se trouve la colonne. La programmation de la température du four est un facteur essentiel à l'obtention d'une bonne séparation avec une durée d'analyse acceptable. L'homogénéité de la température assurée par un ventilateur qui est un programmeur de température. Il doit chauffer et refroidir très rapidement en créant un gradient de température pour pouvoir séparer en un minimum de temps des mélanges de composés peu volatils et très volatils.



Fig. 25 : Vue de l'intérieur du four avec la colonne chromatographique

3.2.4. Colonne

On distingue trois types de colonnes :

- a) Colonne à remplissage : également appelée colonne classique ou colonne remplie existant depuis les débuts de la CPG, les colonnes analytiques classiques sont le plus souvent en acier ou plus rarement en verre, de diamètre intérieur de 2 à 6 mm, ont une longueur comprise entre 1 et 3m et sont enroulées sous forme hélicoïdale. Elles sont remplies d'un support poreux (dimension des particules: 100 à 200 μ m) imprégné de 5 à 20% de phase stationnaire (chromatographie gaz-liquide) ou sont remplies d'un adsorbant (chromatographie gaz-solide).
- b) Colonne capillaire: en acier à l'origine (1970) et maintenant en verre de silice, elles ont un diamètre interne variant entre 0,05 et 0,35mm et une longueur compris entre 10 et 50 m. Pour plus de robustesse, elles sont revêtues d'une couche de polymère ou d'un film d'aluminium et sont enroulées sur un support métallique cylindrique léger, en forme de cage. Il n'y a alors pas de remplissage: la phase stationnaire ou l'adsorbant est déposé sur la paroi interne de la colonne. La faible quantité de phase stationnaire permet des analyses rapides mais impose l'injection d'une quantité très faible d'échantillon.
- c) Colonne semi-capillaire: plus récentes que les colonnes capillaires (1983), elles sont constituées d'un tube de silice de 0,53mm de diamètre interne et ont une longueur variant de 5 à 50m. Elles remplacent, à l'heure actuelle, les colonnes à remplissage sur les chromatographes anciens, tout en conservant les mêmes injecteurs et détecteurs. Elle supporte l'injection d'une quantité plus grande d'échantillon qu'une colonne capillaire mais la résolution est moins bonne (plus le diamètre d'une colonne est faible, meilleure est la résolution). La colonne, enroulée sous forme hélicoïdale, est reliée à l'injecteur à l'une de ses extrémités et au détecteur à l'autre. Elle est disposée dans un four muni d'un système de régulation de température

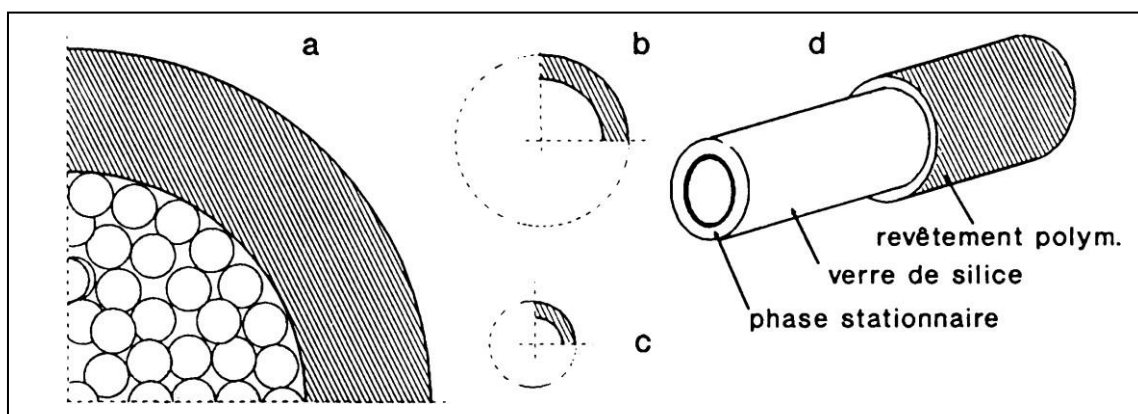


Fig. 26 : Représentation, à la même échelle, des trois types de colonnes de CPG : **a.** colonne remplie, **b.** colonne semi-capillaire, **c.** colonne capillaire et **d.** détail d'une colonne capillaire

3.2.5. Détecteur : Il existe plusieurs types de détecteurs dont deux utilisés le plus couramment.

- a) **Détecteur à conductibilité thermique (catharomètre) :** ce fut le détecteur le plus répandu aux débuts de la chromatographie en phase gazeuse. Son principe repose sur le fait que la résistance d'un métal parcouru par un courant d'intensité constante varie lorsqu'il est soumis à un gradient de température : la résistance d'un thermistor suit une loi du type $R = R_0(1 + \alpha T)$.

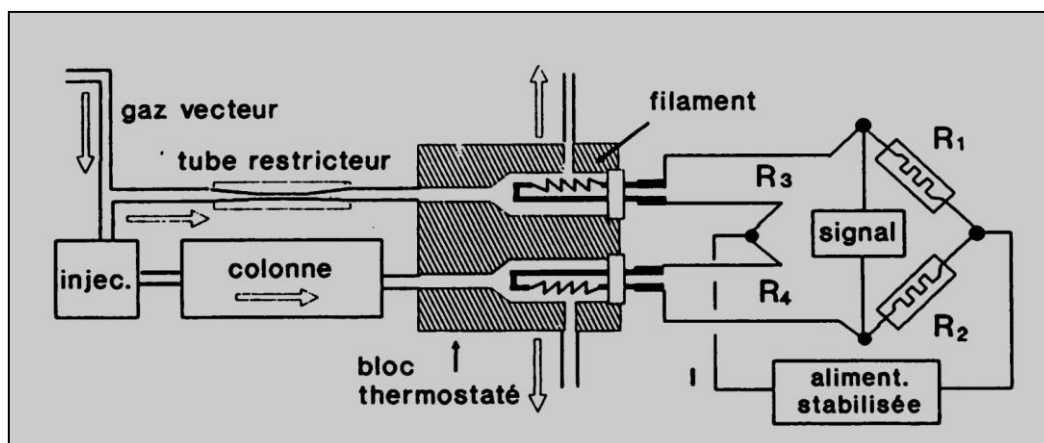


Fig. 27 : Schéma d'un bloc catharométrique classique

Le catharomètre comporte deux thermistors identiques, placés dans deux petites cavités taillées dans un bloc métallique thermostaté à une température légèrement supérieure à celle de la colonne. L'un d'eux est baigné par le gaz vecteur prélevé en amont de l'injecteur et l'autre par le gaz vecteur sortant de la colonne. En régime stationnaire, il s'établit un équilibre de température, donc de résistance, fonction de la conductibilité thermique du gaz vecteur et de l'intensité I . Lorsqu'un soluté est élué, le changement de composition de la phase mobile entraîne une variation de la conductibilité. L'équilibre thermique est alors rompu et il en résulte une variation de la résistance du filament, proportionnelle à la concentration du composé élué pour les grandes dilutions. Ces thermistors sont intégrés dans un montage type pont de Wheatstone, alimenté en tension continue. Le catharomètre présente l'avantage de ne pas détruire les substances analysées d'où son utilisation en CPG préparative. Mais son principal inconvénient provient de sa faible sensibilité (de l'ordre du microgramme).

- b) **Détecteur à ionisation de flamme : (FID) :**

C'est un détecteur beaucoup plus sensible que le catharomètre, mais moins universel, car il ne donne de réponse qu'aux composés organiques. Il a aussi l'inconvénient, contrairement au catharomètre, de détruire le soluté qui le traverse, car son principe est de brûler, dans une flamme d'hydrogène, l'effluent apporté par de l'azote (gaz). Sous l'effet d'un champ électrostatique, il se forme des ions carbone de charge positive qui sont précipités sur une électrode où ils créent un courant d'ionisation que l'on amplifie grâce à un électromètre amplificateur. Sur un enregistreur, on obtient par conséquent un signal proportionnel au débit-masse du soluté dans le détecteur.

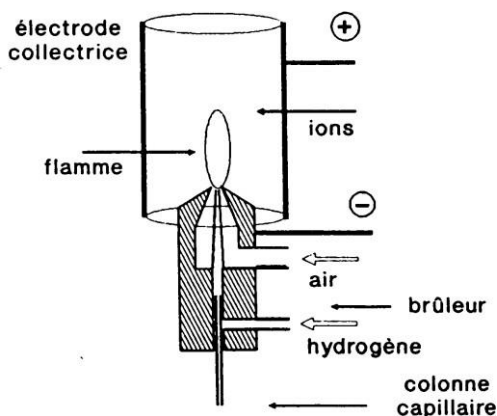
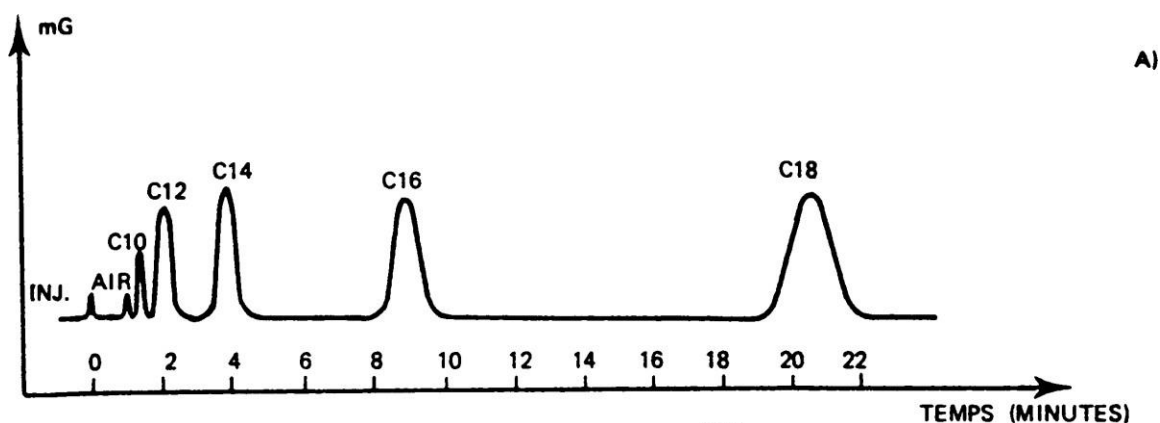


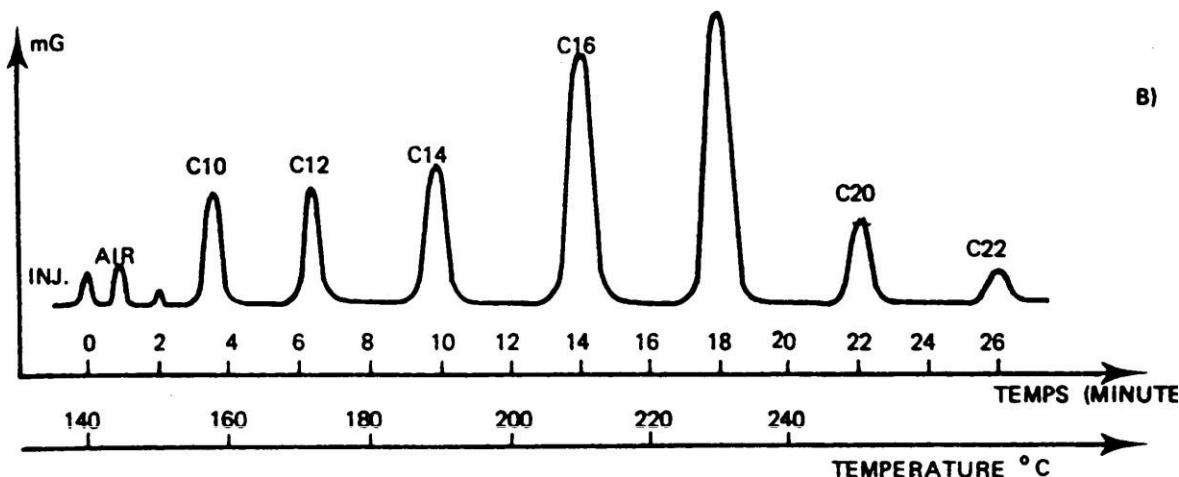
Fig. 28 : Détecteur à ionisation de flamme

Il existe d'autres types de détecteurs, comme le détecteur thermo-ionique (NPD) spécifique des composés azotés et phosphorés, celui à capture d'électrons (CED) particulièrement sensible aux composés halogénés et celui à photométrie de flamme spécifique des composés contenant du soufre et du phosphore. Habituellement, on fixe la température du détecteur sensiblement à la même valeur que celle de l'injecteur.

3.3. Facteurs dont dépend la séparation

3.3.1. La température : Généralement, si les constituants du mélange à séparer ont des polarités voisines, les composés les plus volatils sont les plus rapidement entraînés. Si la température de la colonne est trop basse, la vitesse d'échange entre la phase stationnaire et le gaz vecteur est lente, la diffusion devient importante, le temps de rétention de certains composés trop long et les pics correspondants sont dissymétriques ou déformés. Si la température de la colonne est trop élevée, l'équilibre de chaque constituant entre les deux phases mobile et stationnaire n'a pas le temps de s'établir et tous les constituants apparaissent à la sortie de la colonne en même temps. Lorsque l'écart entre les points d'ébullition des constituants du mélange à séparer est grand, il est souvent préférable d'augmenter la température du four. Un programmeur électronique, mis en route à l'injection, fait varier la température du four selon un profil choisi. Exemple : les deux chromatogrammes ci-dessous sont ceux de l'analyse d'un mélange d'esters méthyliques d'acides gras ($R-CO_2-CH_3$).





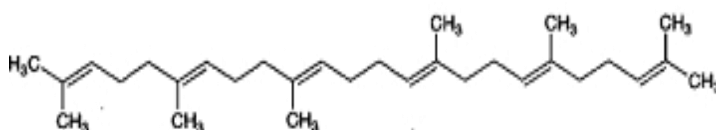
Si la température de la colonne est constante (chromatographie isotherme ; la température du four est constante, égale à 200 °C), le chromatogramme se présente comme une suite de pics de plus en plus espacés (cas A). Si on effectue une programmation de la température du four, le chromatogramme présente alors des écarts beaucoup plus faibles entre les différents pics (cas B).

3.3.2. Débit du gaz vecteur : Il doit être tel que les différents constituants du mélange puissent s'équilibrer entre les deux phases mobile et stationnaire. Si le débit est trop rapide, la séparation des pics est médiocre. S'il est trop lent, les pics perdent leur finesse par suite d'une diffusion trop importante des constituants dans le gaz vecteur. Quand le débit est bien réglé, on a intérêt à augmenter la température du four pour améliorer la finesse des pics (voir exemple ci-dessus).

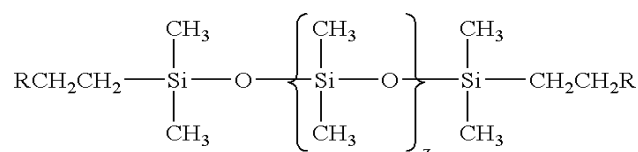
3.3.3. Longueur de la colonne : De façon générale, on accroît l'efficacité de la séparation en augmentant la longueur de la colonne mais ceci se fait au détriment de la finesse des pics. De plus, la longueur des colonnes est limitée par le fait qu'une colonne trop longue exige une trop forte pression du gaz vecteur.

3.3.4. Nature de la phase stationnaire : Le liquide qui constitue la phase stationnaire est, selon les cas, un hydrocarbure ramifié tel que le squalène de polarité nulle, un polyalkylsiloxane peu polaire, un polyéther polaire ou un polyester très polaire.

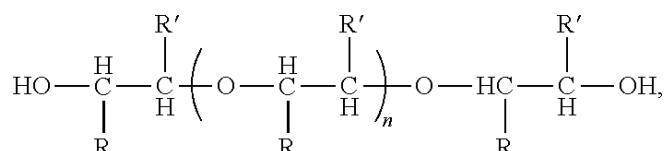
Squalene



Polydialkylsiloxane



Polyether



Ce liquide doit être chimiquement inerte vis à vis des composants du mélange à séparer. De plus, on ne doit l'utiliser que dans les limites de températures pour lequel il est prévu : si la température devient trop basse, la phase stationnaire devient visqueuse, ce qui diminue considérablement la vitesse d'échange entre le gaz vecteur et la phase stationnaire ; si la température devient trop élevée, il y a perte de la phase stationnaire par vaporisation. Le principe général qui doit servir de guide au **choix de la phase stationnaire** est le suivant : **les structures de polarités voisines ont des affinités entre elles**. Ainsi, pour séparer des substances polaires, on utilise une phase fixe polaire car ces substances sont fortement retenues par la phase fixe ; dans ce cas, l'ordre de sortie des composés d'une série homologue est l'ordre croissant de leur point d'ébullition. Si des composés peu polaires se trouvent dans le mélange analysé, ils sont peu retenus par la phase stationnaire polaire et sont élués avant les composés polaires ayant même point d'ébullition. Si la phase stationnaire est apolaire, c'est l'inverse qui se produit : les composés non polaires sont bien retenus et sont élués selon l'ordre de leur point d'ébullition croissant dans une série homologue et un composé polaire est élué avant un composé non polaire ayant même point d'ébullition.

Ordre d'éluion des constituants d'un mélange sur une phase polaire

Composé	Propan-1-ol	Butan-1-ol	Pentan-1-ol	Heptane
Teb/°C	97	117	137	98
Ordre de sortie	2	3	4	1

Ordre d'éluion des constituants d'un mélange sur une phase apolaire

Composé	Heptane	Octane	Nonane	Propan-1-ol
Teb/°C	98	126	151	97
Ordre de sortie	2	3	4	1

La polarité d'une phase est donnée par la constante de McReynolds : plus le nombre est élevé, plus la phase est polaire.

3.4. Analyse qualitative

Si on injecte un mélange de plusieurs liquides dans la colonne par l'intermédiaire de l'injecteur, ces liquides sont transformés en gaz, lesquels sont entraînés dans la colonne par le gaz vecteur. La phase stationnaire selon sa constitution, va plus ou moins retenir sélectivement chacun des produits.

3.4.1. Méthode par exaltation des pics

La chromatographie en phase gazeuse peut permettre l'identification d'un produit dans un mélange complexe. A cette fin on utilise le temps de rétention (t_r).

Dans un mélange complexe on injecte un produit pur, cela permet de déterminer le temps de rétention de ce produit en comparant le chromatogramme obtenu avec celui du mélange seul. Cette méthode est utilisée en répression des fraudes (produits alimentaires...), on contrôle la présence du produit par une autre injection sur une autre colonne avec une phase stationnaire différente.

3.4.2. Méthode des indices de rétention

Les indices de rétention ont été définis par **Kowats** en 1958. A chaque produit (i) est associé un indice de rétention $I(i)$, cet indice déduit des formules est basé sur un système d'étalonnage par des hydrocarbures linéaires.

Les indices $I(i)$ se calculent de 2 manières différentes suivant le fonctionnement en température du chromatographe.

En mode isotherme, 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 $n \geq 5$.

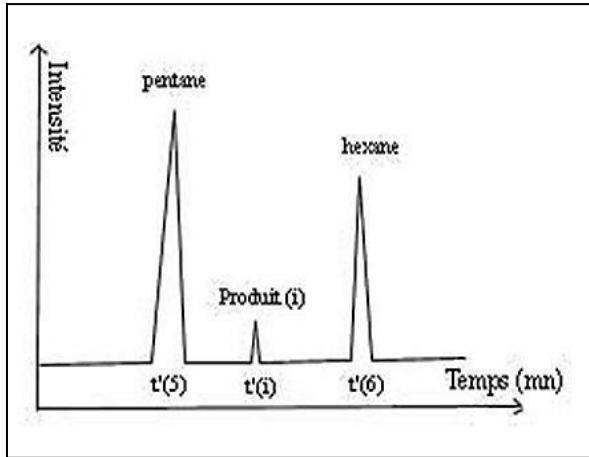
On repère les temps de rétention réduits de ces alcanes $t'_r(n)$ et $t'_r(n+1)$ et celui du produit considéré $t'_r(i)$

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

$$I_i = 100 \cdot \left(\frac{\log t'_r(i) - \log t'_r(n)}{\log t'_r(n+1) - \log t'_r(n)} \right) + 100 \cdot n \quad (1)$$

Dans la formule précédente, on peut employer indifféremment des logarithmes népériens ou des logarithmes décimaux

En mode programmation de température la formule est différente et utilise des temps de rétention "normaux" $t_r(i)$



$$I_i = 100 \cdot \left(\frac{t_r(i) - t_r(n)}{t_r(n+1) - t_r(n)} \right) + 100 \cdot n \quad (2)$$

Il résulte des formules (1) et (2) que les alcanes linéaires ont des indices multiples de 100, $I(\text{pentane}) = 500$, $I(\text{hexane}) = 600$...

Ces indices de rétention se sont avérés remarquablement reproductibles ;

- pour une phase stationnaire donnée, quelque soit le % d'imprégnation pour les colonnes remplies ou l'épaisseur du film pour les colonnes capillaires.
- ils sont relativement indépendants de la température.

Cette bonne reproductibilité a été évaluée à $\pm 0,5\%$, ceci permet de comparer et d'utiliser des résultats venant de laboratoires différents. Ils existent donc des tables répertoriant les indices de rétention de nombreux produits chimiques.

"La bonne pratique du laboratoire de chromatographie" dit qu'un produit inconnu peut être identifié si l'on obtient une bonne coïncidence pour deux phases stationnaires différentes entre les indices de rétention de la littérature et les indices expérimentaux du produit.

3.5. Séparation chirale en CPG

Si on dispose d'un mélange de 2 énantiomères (isomères optiques) il y a deux techniques pour obtenir une séparation en CPG, séparation qui doit permettre une visualisation et un dosage des 2 énantiomères.

3.5.1. Dérivatisation par un agent chiral.

Si par exemple, on dispose un mélange de 2 alcools **R-OH** énantiomères R et S, on fait réagir ces alcools avec du chlorure de 2-phényl propionyle R, pour obtenir deux esters diastéréoisomères : **C₆H₅-CH(CH₃)-COO-R** (RR et RS). Ces diastéréoisomères peuvent être séparés et dosés sur une colonne conventionnelle.

3.5.2. Utilisation d'une phase stationnaire chirale.

Dans ce cas on observe une interaction différente entre la phase stationnaire et chaque énantiomère, d'où une élution différente des 2 isomères optiques.

La phase stationnaire peut être un polymère siliconé greffé avec des groupes chiraux (dérivé du camphre par ex) ou un composé chiral comme une cyclodextrine peralkylée (OH en O-R).

3.6. Applications

➤ Avantage:

- Capacité à séparer des constituants d'un mélange complexe
- Rapidité d'exécution
- Précision dans le dosage de petits échantillons
- Possibilités d'automatisation

➤ Limite:

- composé de PM>300→non volatilisables, substances ioniques thermolabiles
- Injection directe pour les solutés volatils ou volatilisables
- Injection après dérivation (transformation chimique) quand :
 - T° d'ébullition trop élevée
 - trop polaire
 - thermolabile
 - détection peu sensible et peu sélective.

➤ Utilisation de la CPG + couplage:

- Contrôle analytique pharmaceutique en industrie :
 - Contrôle des matières premières / impuretés, solvants résiduels
 - Contrôle en cours de fabrication de l'intégrité de la molécule
 - Contrôle du produit fini / teneur
 - Etude de stabilité dans le temps / produit de dégradation
- Dosage en milieux biologiques (extraction et purification):
 - Etudes de biodisponibilité
 - Etudes métaboliques (identification /SM)
 - Suivi thérapeutique
 - Dosage biochimiques (AA, stéroïdes à plus 17 cétostéroïdes et oestrogènes)
- Dosage en toxicologie:
 - Recherche de toxique en intoxication aiguë (méthanol, EG...)
 - Dosage des drogues: amphétamines, opiacés, cannabinoïdes
 - Contrôle anti-dopage
 - Dépistage de toxicomanie

- Agroalimentaire:
 - Recherche et dosage des pesticides
 - Recherche et dosage et des nitrosamines (nitrites)
- Industrie chimique, cosmétologie:
 - analyse des essences, parfums, arômes, hydrocarbures

Chapitre 4 : **ELECTROPHORESE**

I. Historique

L'origine de cette technique a été imaginée par S.E. Linder et H. Picton en 1892. Ils se sont inspirés des études d'Hermann Von Helmholtz menées sur l'électro-osmose. Celui-ci constate qu'il est possible, sous un champ électrique, de déplacer des particules chargées vers le pôle de signe opposé à leur charge.

En 1937, Arne Wilhelm Kaurin Tiselius, met au point la première électrophorèse: l'électrophorèse libre. Cette technique lui a permis de séparer les protéines du sérum sanguin en appliquant un champ électrique. La solution est placée dans un tube en U de section carrée afin de réaliser des mesures optiques au travers du tube.

Il a pu ainsi obtenir sur le pôle + des protéines de charge très négative comme l'albumine et sur le pôle - des protéines de charge plus positive comme les globulines.

Cette technique ne permet toutefois pas de séparer totalement les protéines. Il est néanmoins possible de mettre en évidence les frontières formées par des méthodes optiques comme la fluorescence, l'absorption des UV ou l'indice de réfraction.

En 1939, P. König et D Von Klobusitzky ont séparé avec succès les composants du venin de serpent en élaborant la technique d'électrophorèse sur papier.

En 1952, Pierre Grabar élabore, en collaboration avec C.A. Williams, une méthode connue sous le nom d'analyse immuno-électrophorétique, qui permet d'analyser de manière précise des mélanges très complexes d'antigènes. Dès la première application de cette méthode à l'analyse du sérum sanguin humain, il parvient à déceler dans le sérum plus de 30 constituants indépendants, alors que l'électrophorèse en veine liquide ou sur papier ne permettait d'isoler que 5 ou 6 groupes de protéines. La méthode est rapidement utilisée dans de nombreux laboratoires médicaux pour des besoins de diagnostics.

En 1955, O. Smithies met au point la technique d'électrophorèse en gel d'amidon.

En 1957, Joachim Kohn sépare les différents phénotypes de l'hémoglobine en élaborant la technique d'électrophorèse sur membrane d'acétate de cellulose.

En 1969, Beber et Osborn introduisent l'agent dénaturant SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) pour séparer les différentes sous-unités protéiques.

II. Principe

L'électrophorèse est une technique séparative. Elle est utilisée le plus souvent dans un but analytique mais également parfois pour purifier des molécules solubles. Elle n'est donc pas adaptée à la séparation des lipides. Le principe consiste à soumettre un mélange de molécules à un champ électrique ce qui entraîne la migration des molécules chargées. En fonction de différents paramètres (charge, masse, forme, nature du support, conditions physico-chimiques) la vitesse de migration va être variable, ce qui permet la séparation des différentes molécules. A partir de ce principe général, il existe plusieurs variantes de cette technique adaptées à différentes situations. Sans prétendre à l'exhaustivité, cet article présente les principales sortes d'électrophorèse, leurs intérêt et limite.

Avantages:

- L'électrophorèse permet de traiter simultanément plusieurs échantillons en même temps.
- La séparation est fine.

➤ On peut déterminer 2 types d'électrophorèses:

L'électrophorèse dite "libre" en veine liquide (mise au point par Tisélius en 1937).

L'électrophorèse de zone sur support.

III. Techniques électrophorétiques

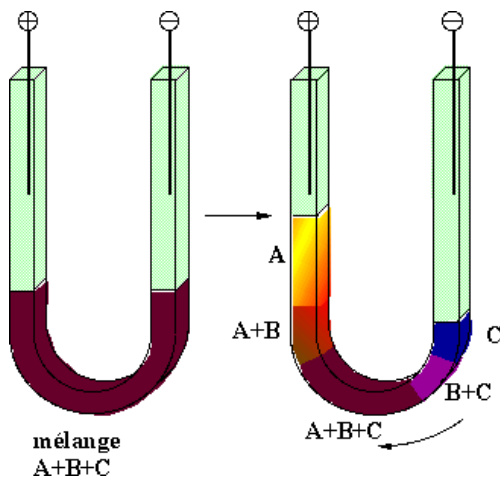
3.1.L'électrophorèse en veine liquide.

La migration dans ce type d'électrophorèse s'effectue au sein d'un liquide de composition déterminée soumis à un champ électrique de courant continu.

Avantage: Permet une bonne détermination des mobilités électrophorétiques.

Inconvénients:

- Appareillage coûteux.
- La mise en œuvre est longue et délicate.



Les particules ne se séparent pas complètement mais il se forme des frontières mise en évidence par des méthodes optiques telles que l'absorption ultra-violette pour les protéines.

Fig. 29 : Electrophorèse en veine liquide

3.2. Electrophorèse de zone

L'électrophorèse sur support ou électrophorèse de zones permet de stabiliser la phase liquide grâce à l'utilisation d'un support poreux imprégné d'un solvant tamponné.

Appareillage: Le support doit être homogène, poreux et inerte (cette dernière condition n'est jamais totalement réalisée).

On peut utiliser du papier, de l'acétate de cellulose, du gel de polyacrylamide, du gel d'agarose, du gel d'amidon, du gel de silice, ...

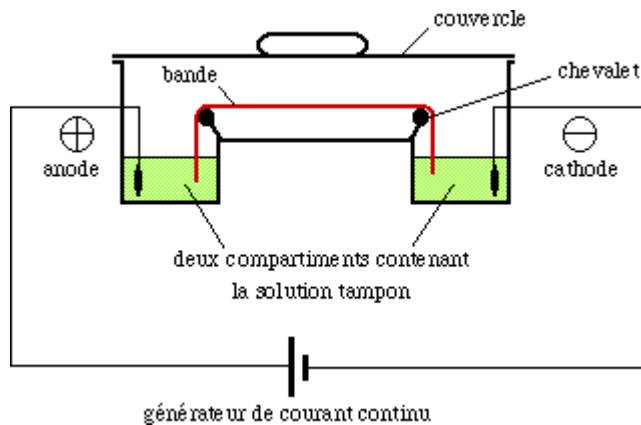


Fig. 30 : Electrophorèse de zone

Les molécules à séparer sont déposées sur un support dont chaque extrémité est en contact avec une solution tampon.

Dans chaque solution tampon se trouve une électrode. Les électrodes sont reliées à un générateur de courant

Lorsque le générateur envoie du courant, les molécules chargées se déplacent sur le support en direction de l'électrode de signe opposé à leur charge.

3.3. Electrophorèse selon le type de montage

3.3.1. Montage horizontal

Utilisé pour les supports en acétate de cellulose ou en papier. Le support se présente sous forme de longue et étroite bande.

Les extrémités du support plongent dans un tampon d'électrode, créant une mince couche d'eau à sa surface.

a) Electrophorèse sur papier et acétate de cellulose

Migration des molécules principalement en fonction de la **charge globale**, et en conditions non dénaturantes

➤ L'ÉLECTROPHORÈSE SUR PAPIER :

- Séparation des petites molécules (acides aminés ou petits peptides)
- Détermination du point isoélectrique d'un acide aminé par des mesures de mobilité => détermination de mobilité d'un acide aminé à différents pH
- $\text{mobilité} = k \cdot (\text{pH} - \text{pHI}) / \text{masse molaire}$

➤ **L'ÉLECTROPHORÈSE SUR ACÉTATE DE CELLULOSE :**

- Séparation de molécules de milieux complexes (plasma)
- Séparation de petites molécules migrant à vitesse proportionnelle à leur charge
- de + en + remplacée par les électrophorèses sur gel

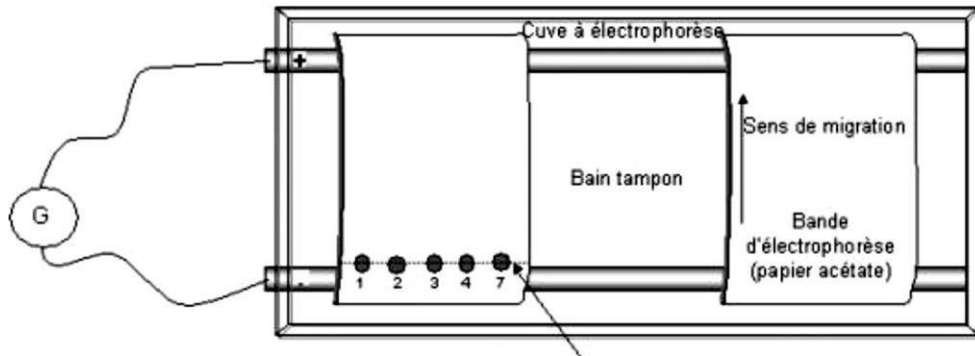


Fig. 31 : Electrophorèse sur papier

Milieu basique: protéines chargées (-)

- extrémités des bandes plongées dans tampon d'électrophorèse conducteur (pH = 9.2)
- application champ électrique
- dissolution échantillon dans solution conductrice
- migration le long de la bande

Vitesse de migration dépend : magnitude de la charge + taille molécules

- coloration des protéines (rouge Ponceau)
- Intensité coloration proportionnelle concentration protéines
- analyse densité optique des bandes

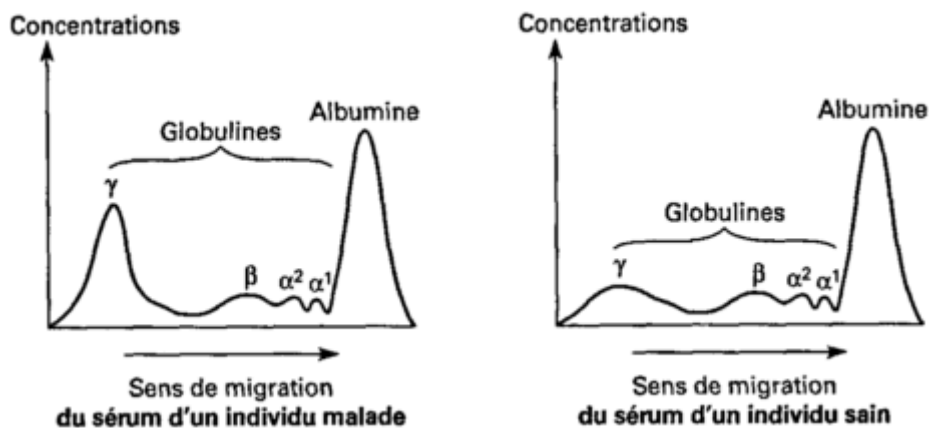


Fig 32 : Séparation des protéines plasmatique sue acétate de cellulose

3.3.2. Montage vertical:

Utilisé pour les supports en gel polyacrylamide ou, plus rarement d'agarose. Le gel est souvent préparé peu avant usage en le coulant entre 2 plaques de verre. Durant la gélification on aura pris soin de faire des puits où on déposera les échantillons. Chaque extrémité du gel est mise en contact avec un tampon contenant des électrolytes qui permettra la propagation d'un courant dans le gel.

Electrophorèse sur gel

- Séparation des molécules selon leur ratio charge / masse
- Conjugent mobilité électrophorétique + effet filtration du gel
- Les molécules chargées atteignent rapidement une vitesse

$$V = qE/f$$

q: charge particule

E: champ électrique

f: coef. frottement particule/solvant

- Théorie de l'électrophorèse :
 - ✓ Mobilité u dans un champ électrique au sein d'un gel

$$\text{Log } u = \text{Log } u_0 - KrC$$

$\text{Log } u_0$ = mobilité en milieu liquide

Kr = coef. de retardement dû au gel (fonction masse moléculaire)

C = concentration du gel

- ✓ Ainsi, la vitesse de migration dépend aussi de masse moléculaire
- 2 types de matériaux
 - ✓ Agarose :
 - colloïde naturel extrait d'algue rouge (Gracilaria)
 - Grande taille de pores => séparation très grosses molécules : Protéines >500kDa, Ac. Nucléiques >1500pb
 - ✓ Polyacrylamide :
 - De l'acrylamide $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ est mis à polymériser avec du NN' méthylène-bis-acrylamide $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$,
 - donnant des chaînes latérales linéaires

A/ Electrophorèse sur gel de polyacrylamide ou PAGE (Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis):

Cette technique est très utilisée en immunologie et dans l'étude des protéines car elle permet, après la séparation des différentes protéines, leur transfert sur une membrane de nitrocellulose ou de polyfluorure de vinylidène afin d'être identifié par le biais d'anticorps spécifiques.

Cette technique est également utilisée pour le séquençage de l'ADN (les méthodes traditionnelles de Maxam et Gilbert ou de Sanger permettent de séquencer à la paire de bases près).

La matrice de cette électrophorèse:

Le gel de polyacrylamide est constitué d'**acrylamide** (extrêmement neurotoxique par ingestion ou contact avec la peau) qui est l'unité de base et de **bisacrylamide** qui est l'agent portant. En faisant varier les taux de ces 2 substances on obtient différents maillages et donc différentes densités de gel.

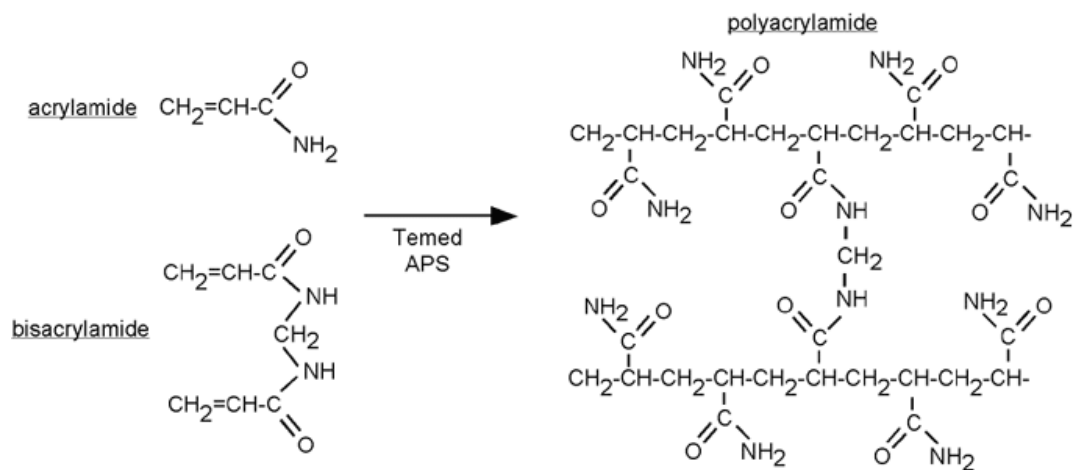


Fig. 33 : Principe de formation de la matrice du gel de polyacrylamide

La polymérisation est réalisée grâce à l'ajout de 2 réactifs: le **TEMED** (N,N,N',N' tétra-méthyl-éthylènediamine) et l'**ammonium persulfate** qui deviennent des anions hyperactifs en présence de lumière (Fig 33).

La densité typique d'un **gel de séparation** peut être à 6%; 8%; 10%; 12% ou 15%.

Plus le gel est dense meilleure sera la séparation des protéines.

Des niveaux de densité plus faibles du gel permettent de séparer des protéines de poids moléculaires proches.

La densité d'un **gel de concentration** (stacking gel) est à 5%. Ce gel est coulé en haut du gel de séparation. Il permet à l'échantillon une entrée homogène dans le gel de séparation. On utilise un "peigne" afin de créer des "puits" individuels pouvant accueillir chaque échantillon.

Le SDS-PAGE:

Une variante de cette technique consiste à utiliser du **SDS (Sodium Dodécylsulfate)** qui est un détergent anionique fort. Il a la propriété de défaire la structure spatiale en se fixant sur les protéines et de les charger de la même façon permettant ainsi de les séparer uniquement en fonction de leur masse moléculaire.

Principe de la formation SDS-Protéine

Principe de formation du complexe SDS-protéines dénaturées

SO₃⁻
|
O
|
(CH₂)_n
|
CH₃

tête chargée négativement

Combinaison d'une protéine avec SDS

Les protéines sont chargées négativement.
Elles migrent vers l'anode en fonction de leur PM

Les protéines sont dites dénaturées: elles ont perdu leur structure tridimensionnelle native. Avant de procéder à la dénaturation des protéines avec du SDS, on utilise un agent réducteur, le **β -mercaptoéthanol** qui réduit les ponts disulfures des protéines les rendant ainsi sous forme monomérique.

A. Gel d'électrophorèse des protéines en conditions dénaturantes

La technique du gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes : (SDS-PAGE) a été décrite par **Ulrich Laemmli** en **1970**

support pour couler le gel

cuve

plaques de verre pour couler le gel

peignes

PROTEIN GEL ELECTROPHORESIS METHOD

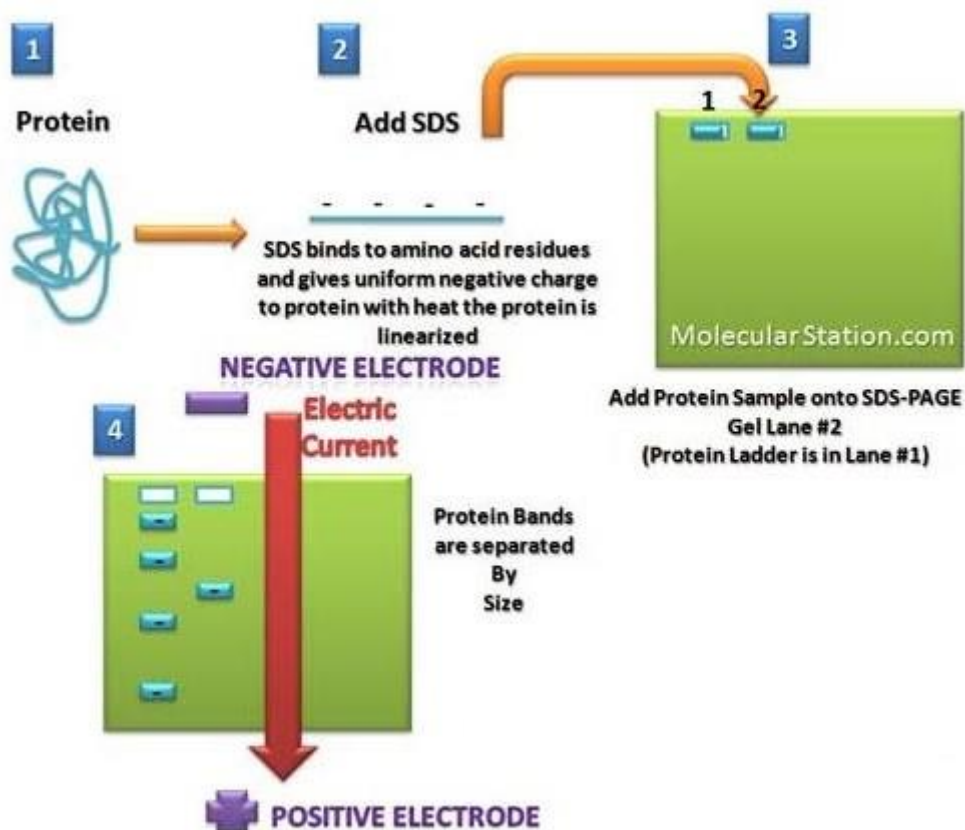


Fig 34 : Principe de l'électrophorèse PAGE-SDS

Séparation des protéines uniquement en fonction du facteur TAILLE

Évaluation des masses moléculaires des protéines séparées, on utilise des standards = mélange de protéines de masses moléculaires connues-Masse moléculaire (m) : exprimée en Dalton (Da) ; 1 Dalton = 1/12 de la masse du carbone 12. Majorité des macromolécules suffisamment grosse pour expression en kiloDalton (kDa) -Poids moléculaire (Mr): masse moléculaire relative (pas d'unité)

Rappel: des protéines séparées dans le gel : coloration au bleu de Coomassie, nitrate d'argent (+ sensible), ou nouveaux colorants fluorescents

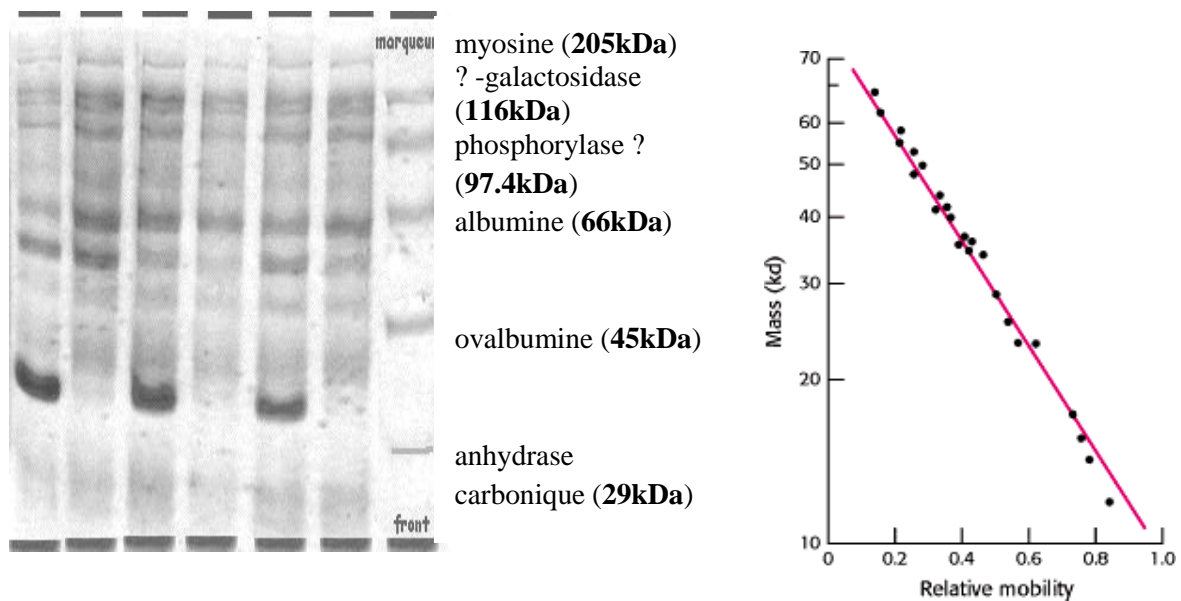
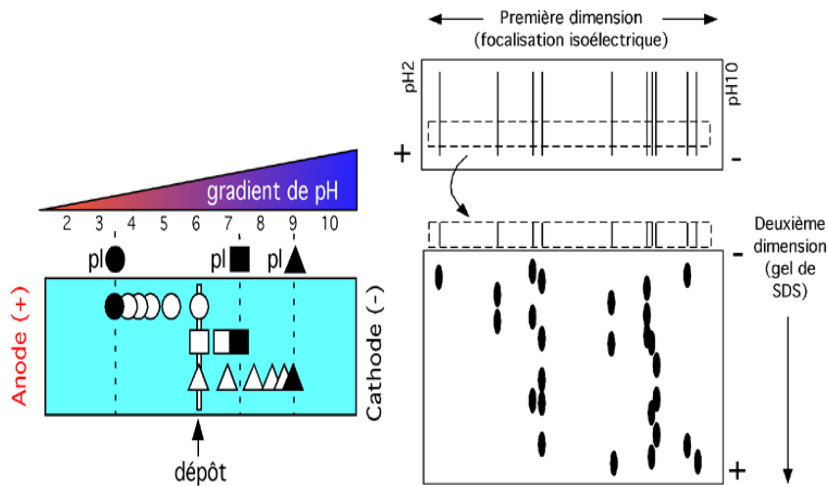


Fig. 35 : Exemple de Gel coloré au bleu de Coomassie (Standard : dernier puit) et courbe d'étalonnage pour calcul des PM

B/ Electrofocalisation (IEF — IsoElectric Focussing) :

La migration est effectuée dans un gradient de pH; chaque molécule migre jusqu'à l'endroit où le pH est égal à son pHi. On utilise un gel de forte porosité (polyacrylamide ou agarose), pour que la taille n'influence pas la migration. Le gradient de pH est généré par des ampholytes, molécules amphotères de synthèse introduites dans le gel au moment de sa fabrication : on utilise un mélange de telles molécules, possédant des pHi dans une certaine gamme (gamme large, ex. 3-9, ou ± étroite, ex. 4-5 ou 5-6,5). Ces molécules migrent rapidement dans le gel jusqu'à atteindre une zone où leur charge devient nulle. Elles ont alors une distribution statistique telle qu'elles génèrent un gradient de pH sensiblement linéaire le long du gel. Il existe de telles molécules de petit poids moléculaire et solubles (**ampholines**) et il existe également des gels à base d'acrylamide modifiée contenant des groupements acides et basiques fixés (gels d'**immobilines**).



Principe:

- création d'un gradient de pH sur un gel de polyacrylamide à l'aide d'ampholines, séparation le pHi
- Les protéines vont se focaliser à des distances différentes correspondant à leur point isoélectrique.
- Excellente résolution et détermination du pHi par comparaison avec protéines de pHi connu

Fig. 36 : Principe de l'électrofocalisation

C/ Électrophorèse bidimensionnelle

Le principe consiste : deux migrations à 90°

- Première migration en électrofocalisation
- Deuxième migration en PAGE SDS
- Les deux directions font appel à des propriétés différentes
- Il en résulte une très grande résolution
- On peut séparer au moins 1.000 protéines par cette technique

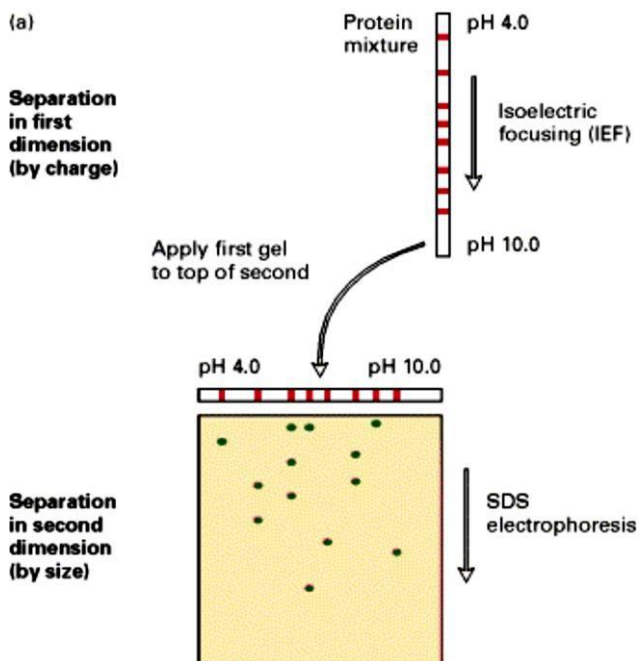


Fig. 37 : Principe de l'électrophorèse bidimensionnelle

- Première séparation en fonction de la charge (point isoélectrique)
- Deuxième séparation en fonction de
- la masse

D-/ Séparation de fragments d'ADN

3.1. Électrophorèse sur gel (agarose, acrylamides d'ADN..)

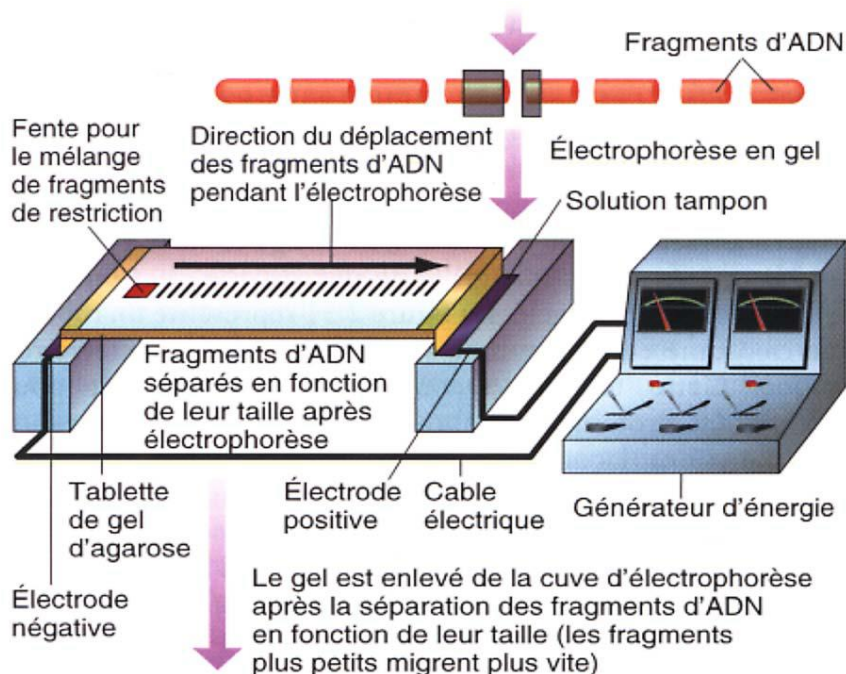
L'action d'une enzyme de restriction sur une molécule d'ADN génère des fragments de restriction. Ces fragments d'ADN peuvent être séparés suivant leur taille sur un gel d'agarose ou d'acrylamide.

1- Principe

L'électrophorèse sur gel est une méthode utilisée en biochimie et en biologie moléculaire pour séparer les acides nucléiques ou les protéines en fonction de leur poids moléculaire. Elle est basée sur la séparation de molécules chargées sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers une matrice (un gel d'agarose ou de polyacrylamide). Le gel agit à la manière d'un tamis moléculaire au travers duquel les molécules en mouvement doivent passer ; Les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures (due aux difficultés de passage à travers les mailles (pores)).

2- Applications de l'électrophorèse

- ❖ Séparation de fragments ADN digérés
- ❖ Estimation du poids moléculaire de fragment d'ADN après une digestion par des enzymes de restriction
- ❖ Analyse d'ADN après une amplification par PCR



Séparation de fragments ADN digérés

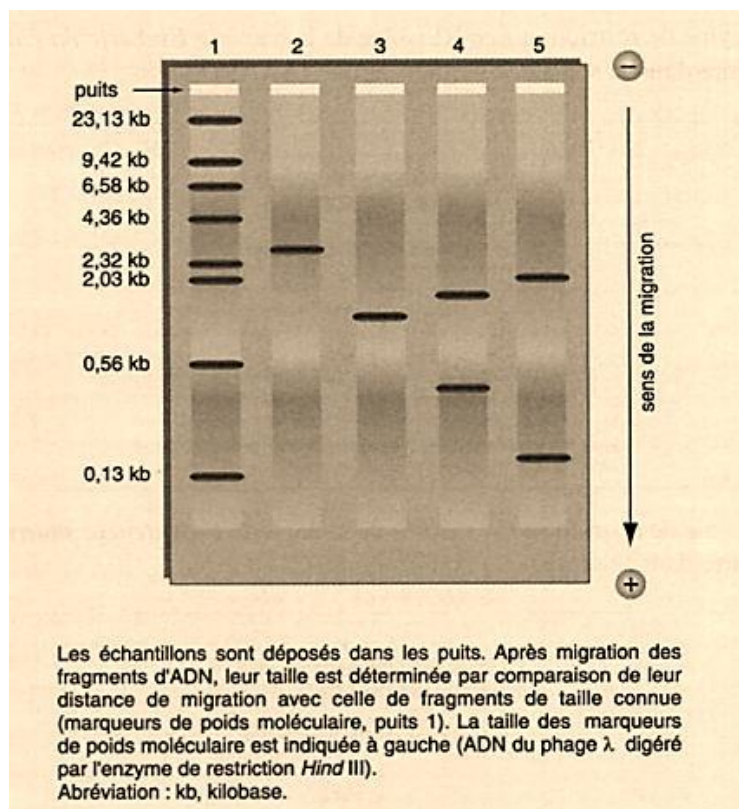
3- Electrophorèse des acides nucléiques

Le mélange contenant l'ADN coupé par l'enzyme de restriction est déposé à une extrémité du gel qui est ensuite soumis à un champ électrique.

Les molécules d'ADN (chargées négativement à pH 7~8) migrent dans le champ électrique vers l'anode (+). En passant au travers des mailles de l'agarose ou de l'acrylamide. Elles se séparent selon leur taille : les molécules les plus grandes sont retenues que les petites molécules et migrent moins vite et donc moins loin. L'électrophorèse sur gel d'agarose présente plusieurs avantages :

- ❖ Préparation du gel d'agarose est aisée, rapide, et peu coûteuse.
- ❖ L'agarose est plus ferme et moins toxique que le gel de polyacrylamide
- ❖ Les échantillons peuvent être récupérés en vue d'analyses supplémentaires (Pas de dénaturation des échantillons)

Cependant, l'acrylamide a un pouvoir séparateur plus important que l'agarose. Mais ce produit est toxique et la préparation des gels d'acrylamide est difficile.



E/ Immunoélectrophorèse :

La révélation est basée sur une réaction "antigène-anticorps". On mettra de côté l'immunoblot, qui consiste à visualiser des protéines sur un gel (la fixation d'Ac étant révélée par un second anticorps marqué). Les techniques ci-dessous utilisent le fait qu'à des concentrations adéquates, du fait de la présence de familles d'anticorps (polyclonaux) et de la bivalence de ces anticorps, il se forme des agrégats (= réaction d'immunoprécipitation). Ce précipité est ensuite coloré selon les techniques classiques.

Il existe en fait tout un ensemble de techniques qui utilisent des anticorps associés à des séparations électrophorétiques. On peut distinguer les techniques suivantes :

1- Immuno-électrophorèse de Grabar et Williams

Les protéines migrent dans un gel d'agarose, puis on les révèle par une technique de double diffusion des antigènes et des anticorps, donnant des arcs de précipitation. Avec un antisérum total, on peut par exemple distinguer 30-40 protéines dans le sérum humain. On peut bien sûr l'utiliser également avec un antisérum spécifique.

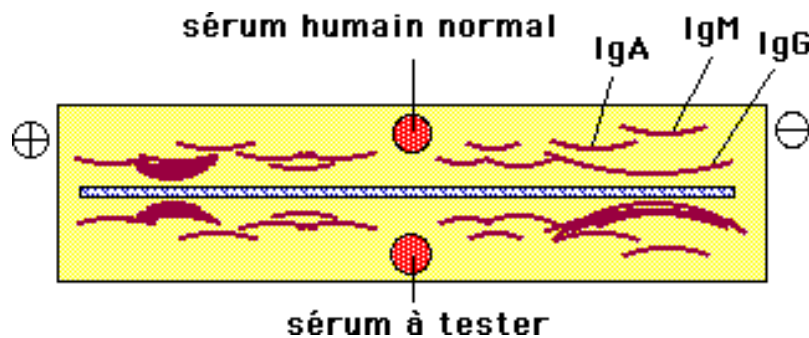


Fig 38 : Principe de l'Immuno-électrophorèse de Grabar et Williams

2- Electro-immunodiffusion double (= électrosynérèse)

Cette méthode dérive en fait de la technique d'immunodiffusion double d'Ouchterlony. Elle consiste à accélérer la diffusion par un champ électrique. Les conditions électrophorétiques sont choisies de façon à ce que les antigènes et les anticorps migrent en sens inverse (ceci est possible car le pHi des Immunoglobulines est supérieur à celui de beaucoup de protéines).

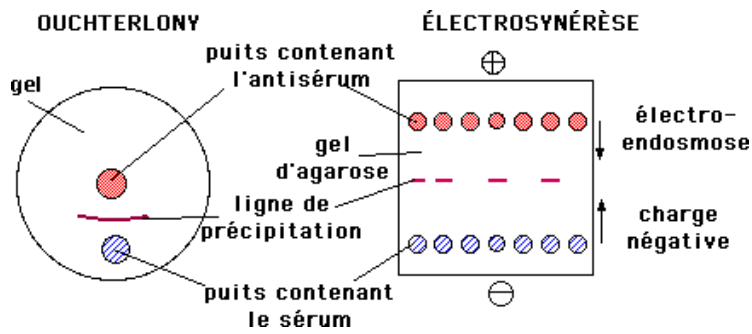


Fig 39 : Principe de l'électro-immunodiffusion double (électrosynérèse)

3- Electro-immunodiffusion monodimensionnelle (Laurell)

Les protéines sont déposées sur des gels contenant l'antisérum. On se place à pH où les Ig migrent peu. Les protéines se déplacent et rencontrent les anticorps qui forment alors des précipités en forme de fusée appelés "rockets" dont la hauteur est proportionnelle à la concentration en protéine. On utilise une partie des puits pour faire un étalonnage.

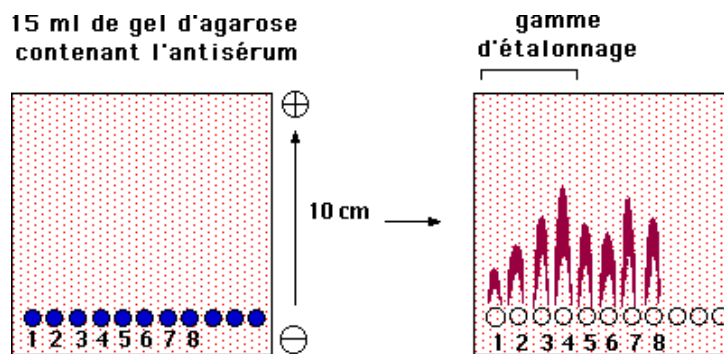
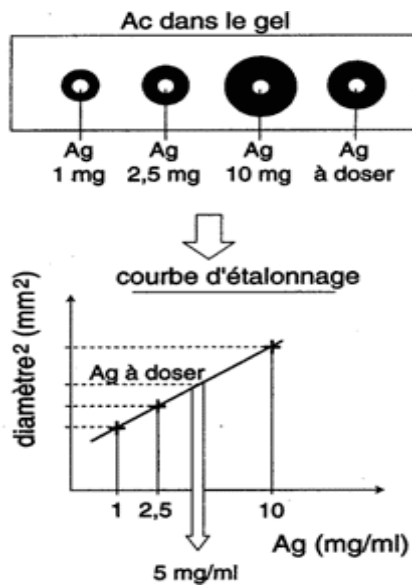


Fig. 40 : Principe de l'électro-immunodiffusion monodimensionnelle

4- Immunodiffusion radiale (technique de Mancini)



Cette méthode consiste à incorporer un antisérum spécifique dans la gélose et à déposer la solution d'Ag dans des puits. A l'équilibre il se forme un anneau de précipitation dont le carré du diamètre est proportionnel à la concentration de l'Ag. La concentration est exprimée par référence à une courbe standard avec un Ag de concentration connue.

Fig. 41 : Principe de l'immunodiffusion radiale

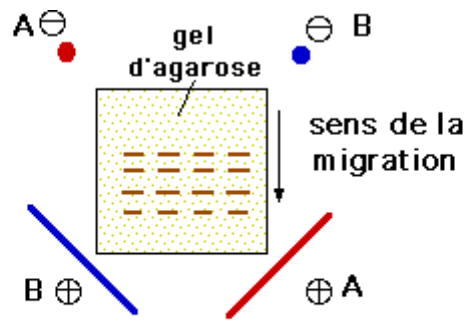
E/ Electrophorèse sur agarose

Elle est peu utilisée dans le cas des protéines, car dans ce domaine les gels de polyacrylamide donnent toute satisfaction. Cependant, des gels d'agarose sont utilisés sous forme de kits prêts à l'emploi en biologie clinique : ils sont alors destinés à des applications spécifiques pour révéler un type donné de constituant (ex. lipoprotéines) ou certaines enzymes (déshydrogénases, estérases,...), ainsi que pour les techniques de révélation par anticorps (qui peuvent plus facilement diffuser au sein du gel, voir + loin).

F/ Electrophorèse en champs pulsés

Cette technique est utilisée pour l'électrophorèse des molécules d'ADN de haut poids moléculaire (15 -100 kb). Dans cette gamme de taille (au-delà de 20 kb), les molécules ne sont plus séparées par les méthodes classiques, car la migration devient indépendante de la taille (le déplacement de ces molécules cylindriques ayant toutes le même diamètre s'effectuant par "reptation"). L'emploi de deux champs orthogonaux utilisés en alternance fait que les molécules d'ADN, qui mettent un certain temps à s'orienter dans le sens du champ électrique, ne migrent que lorsque celle-ci est réalisée. Le temps nécessaire à l'orientation est d'autant plus grand que la molécule d'ADN est longue

Il devient alors possible de séparer les molécules en fonction de leur longueur. Cette méthode s'avère très utile dans les analyses du génome des procaryotes et des eucaryotes.



Electrophorèse en champ pulsé :
on utilise en alternance les couples d'électrodes A ou B

Fig. 42 : Principe de l'électrophorèse en champs pulsés

G/ Electrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire se définit comme une technique de séparation électrophorétique effectuée dans un tube de diamètre interne $< 100 \mu\text{m}$, rempli d'un milieu électrolyte.

Cette nouvelle technique permet la séparation rapide de molécule très variée, avec une grande résolution.

- **Principe :**

La séparation des molécules se fait par leur propre mobilité électrophorétique sur laquelle vient s'ajouter le flux électro-osmotique, plus ou moins important, engendré par le capillaire de silice qui attire les charges positives de l'électrolyte. En effet, les molécules sont soumises à 2 flux :

➤ Le flux électrophorétique qui entraîne les cations vers la cathode et les anions vers l'anode : Dans une solution on a deux types de molécules : les neutres et les chargées. Les molécules neutres ne sont pas concernées par ce phénomène. En revanche, les molécules chargées lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique se déplacent à une vitesse caractéristique constante qui est fonction de leur taille et de leur charge.

➤ Le flux électro-osmotique : c'est un phénomène particulier au capillaire de silice, en effet les groupements Silanol sont très acide et donnent facilement Si-O^- , ce qui donne une charge interne négative. Dans le tampon on a des molécules chargées positivement, celles-ci vont venir s'adsorber à la paroi interne, et lorsqu'on impose un courant dans le capillaire « la gaine positive » va être entraîné vers la cathode. La somme de ces deux phénomènes va donner la vitesse caractéristique de la molécule étudiée. On a :

$$\text{Vitesse de migration} = \text{Vitesse électrophorétique} + \text{Vitesse électro-osmotique.}$$

La migration se fait dans un capillaire constitué de polymères de silicate d'un diamètre inférieur à 100 μm (ici 50 μm). Il est rempli d'une solution tampon ; on injecte à l'anode et on détecte à la cathode. On applique une tension aux bornes du capillaire et le déplacement des espèces est régi par les deux phénomènes que sont l'électromigration et l'électro-osmose.

En règle générale, la migration se fait de l'anode à la cathode quel que soit le pH.

En effet soit V_e la vitesse électrophorétique du soluté et V_0 la vitesse du flux électro-osmotique.

$V_0 > V_e$ donc la migration se fait de l'anode vers la cathode.

D'après ces 2 schémas on remarque bien que la migration du soluté se fasse de l'anode vers la cathode indépendamment du pH.

La limite à cette technique est qu'elle ne détecte pas les molécules neutres.

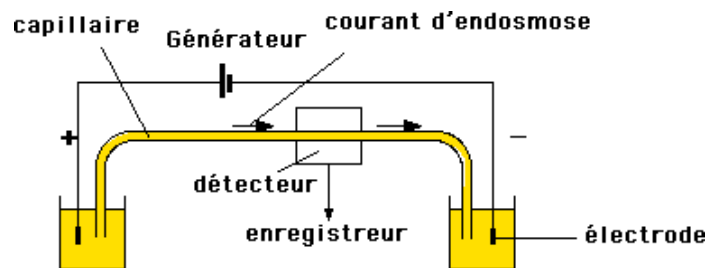


Fig. 43 : Appareillage d'une électrophorèse capillaire

Les domaines d'application sont a priori nombreux : analyse de peptides, d'acides aminés, d'oligonucléotides,... le nombre de plateaux est de l'ordre de 500000 par mètre, ce qui fournit une résolution remarquable (on peut séparer des peptides différant d'un acide aminé, des mélanges complexes d'oligonucléotides, des fragments tryptiques de peptides ; la méthode est utilisée pour tester la pureté de peptides ou d'oligonucléotides de synthèse,...). La technique peut également s'appliquer à des molécules non ionisées en présence de micelles de détergents appropriés.

Chapitre 5 : LA SPECTROSCOPIE

I. Introduction

La spectroscopie est l'ensemble des techniques qui permettent d'analyser : - la lumière émise par une source lumineuse - la lumière transmise ou réfléchiée par un corps absorbant. L'interaction de la lumière avec la matière est à l'origine de la majeure partie des phénomènes électriques, magnétiques, optiques et chimiques observés dans notre environnement proche.

II. Domaines d'application

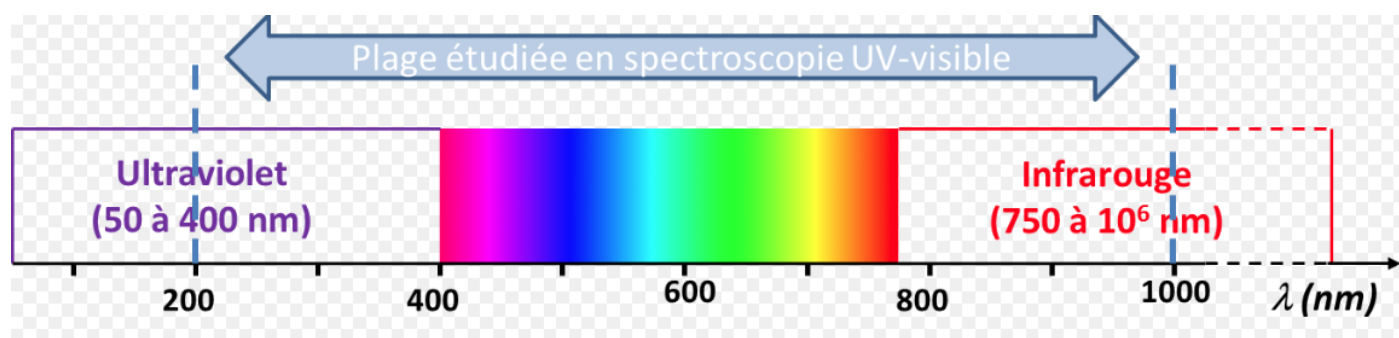
La spectrophotométrie est utilisée dans divers domaines : chimie, pharmacie, environnement, agroalimentaire, biologie etc..., aussi bien au laboratoire que sur site industriel. Exemple : Dans l'industrie pharmaceutique, de nombreux dosages de médicaments sont réalisés par spectrophotométrie d'absorption UV-VIS.

III. Spectroscopie UV-Visible

3.1. Principe

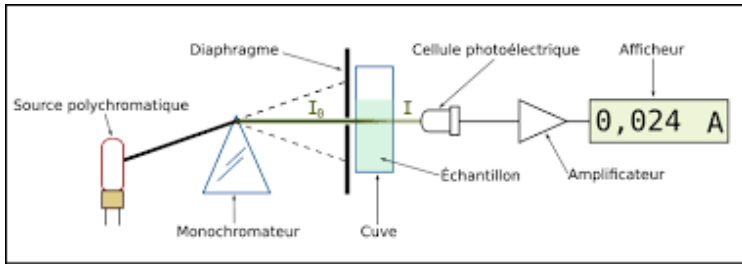
Lorsque les radiations électromagnétiques rencontrent la matière, on observe une interaction entre matière et onde électromagnétique.

On parle de spectroscopie UV-visible, lorsque ces interactions sont observées dans le domaine UV-Visible (UV: 200 à 400nm et Visible 400 à 800nm),



Le spectrophotomètre fait passer une radiation (lumière) monochromatique (une seule longueur d'onde) à travers une longueur L (longueur de la cuve) de solution et mesure l'absorbance A (grandeur liée à la quantité de lumière absorbée par la solution).

Un spectrophotomètre permet de visualiser ces bandes d'absorptions.



On trace ainsi des spectres de transmission, ou bien d'absorption.

Le spectre de transmission renseigne sur tout ce qui n'a pas été absorbé. Le spectre d'absorption se déduit directement du spectre de transmission. Il renseigne sur toutes les radiations absorbées.

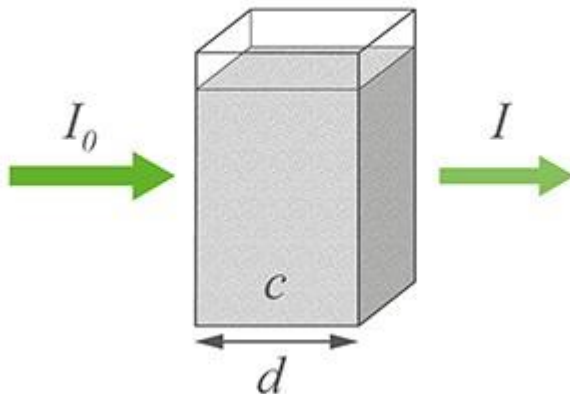
3.2. La loi de Beer-Lambert

L'absorbance dépend de la couleur de la radiation, de sa longueur d'onde λ .

Soit I_0 l'intensité de la lumière incidente et I l'intensité de la lumière transmise.

Le spectrophotomètre compare I et I_0 à travers soit la transmittance T ($T = I / I_0$) ou l'absorbance

$A = -\text{Log } T$. (les 2 mesures sont possibles)



Si l'énergie associée à la radiation de longueur d'onde λ_1 n'est pas du tout absorbée par la solution étudiée alors $A(\lambda_1) = 0$. L'énergie est transmise à $100 / 100 = 1 = 10^0 = T$.

Si l'énergie associée à la radiation de longueur d'onde λ_2 est absorbée à 99 % par la solution étudiée alors $A(\lambda_2) = 2$. L'énergie est transmise à $1 / 100 = 0,01 = 10^{-2} = T$

Il faut régler le zéro en plaçant le solvant dans la cuve et l'absorbance doit être nulle.

L'absorbance A est proportionnelle à la concentration de la solution selon la Loi de **Beer-Lambert**.

$$A = \epsilon \times L \times C$$

Avec :

A : absorbance de la solution (sans unité)

L : longueur de la solution traversée par la lumière (en cm)

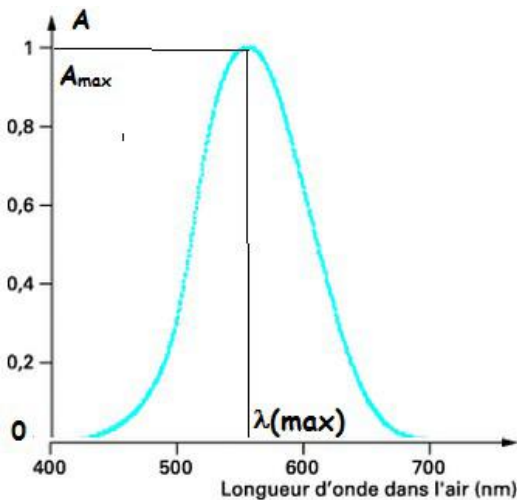
C : concentration de la solution (en mol.L⁻¹)

ϵ : coefficient d'extinction molaire (en L.mol⁻¹.cm⁻¹)

ϵ dépend de la nature de la solution et de la longueur d'onde

3.3. Couleur perçue et longueur d'onde maximale

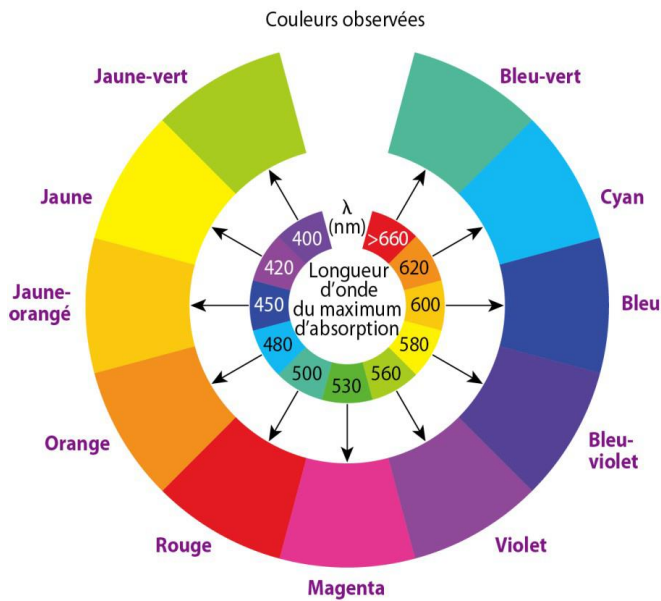
Une espèce chimique est caractérisée en spectroscopie UV-visible par la longueur d'onde λ (max) du maximum d'absorption et par la valeur du coefficient d'extinction molaire ϵ (λ max) correspondante..



On trace tout d'abord le spectre d'absorption $A = f(\lambda)$ afin de déterminer le maximum d'absorption λ max.

Cette longueur d'onde λ_{\max} est directement liée à la substance étudiée et à sa couleur éventuelle.

En effet, la radiation préférentiellement absorbée correspond à la couleur complémentaire de celle de la substance:



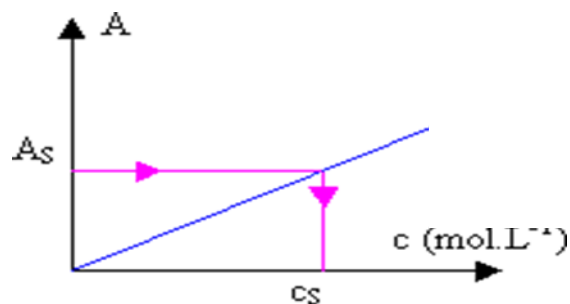
exp : $\lambda_{\max} = 650 \text{ nm}$, la solution absorbe la couleur orange, elle est alors bleue (couleur complémentaire) (voir flèche)

Remarque: une substance incolore absorbe dans l'UV : $\lambda_{\max} = 250 \text{ nm}$

Lorsqu'une espèce absorbe dans plusieurs domaines de longueurs d'onde, sa couleur résulte de la synthèse additive des couleurs complémentaires des radiations absorbées.

Exp : Le vert de bromocrésol absorbe à $\lambda_{\max} = 440 \text{ nm}$ et à $\lambda_{\max} = 615 \text{ nm}$, les couleurs complémentaires sont jaune-orange et bleu-vert, le mélange donne du vert.

3.4. Dosage par étalonnage



On peut ensuite effectuer une détermination de concentration de la substance en effectuant un dosage par étalonnage. On réalise alors plusieurs solutions de concentration connues pour lesquelles on détermine l'absorbance A à la valeur de λ_{\max} . On trace la courbe d'étalonnage, A en fonction de C .

En mesurant l'absorbance A_S d'une solution inconnue et en la reportant sur la courbe, on détermine la concentration C_S de la solution inconnue

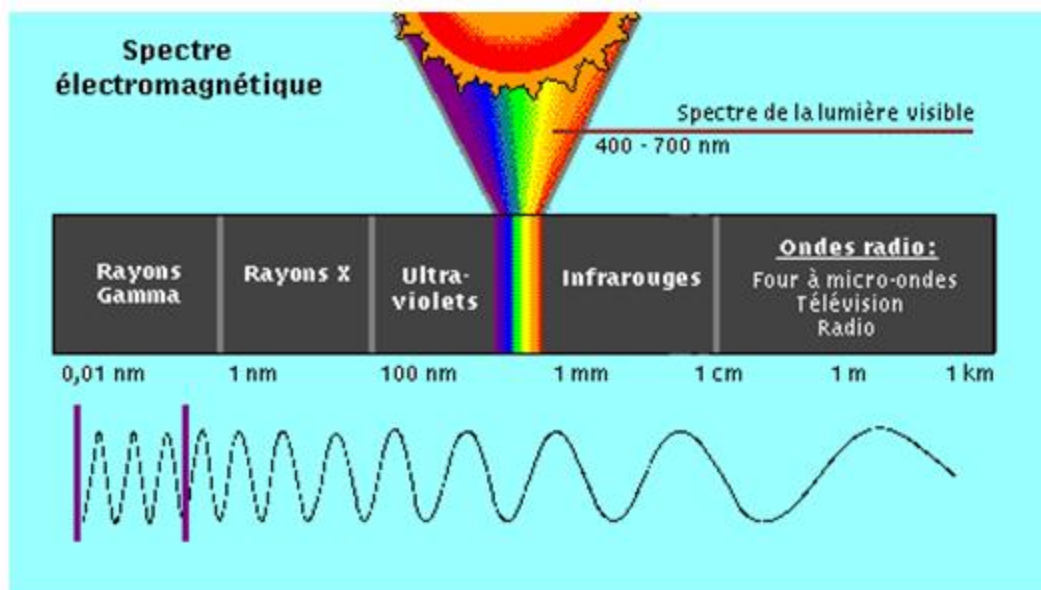
IV. Spectroscopie infra-rouge

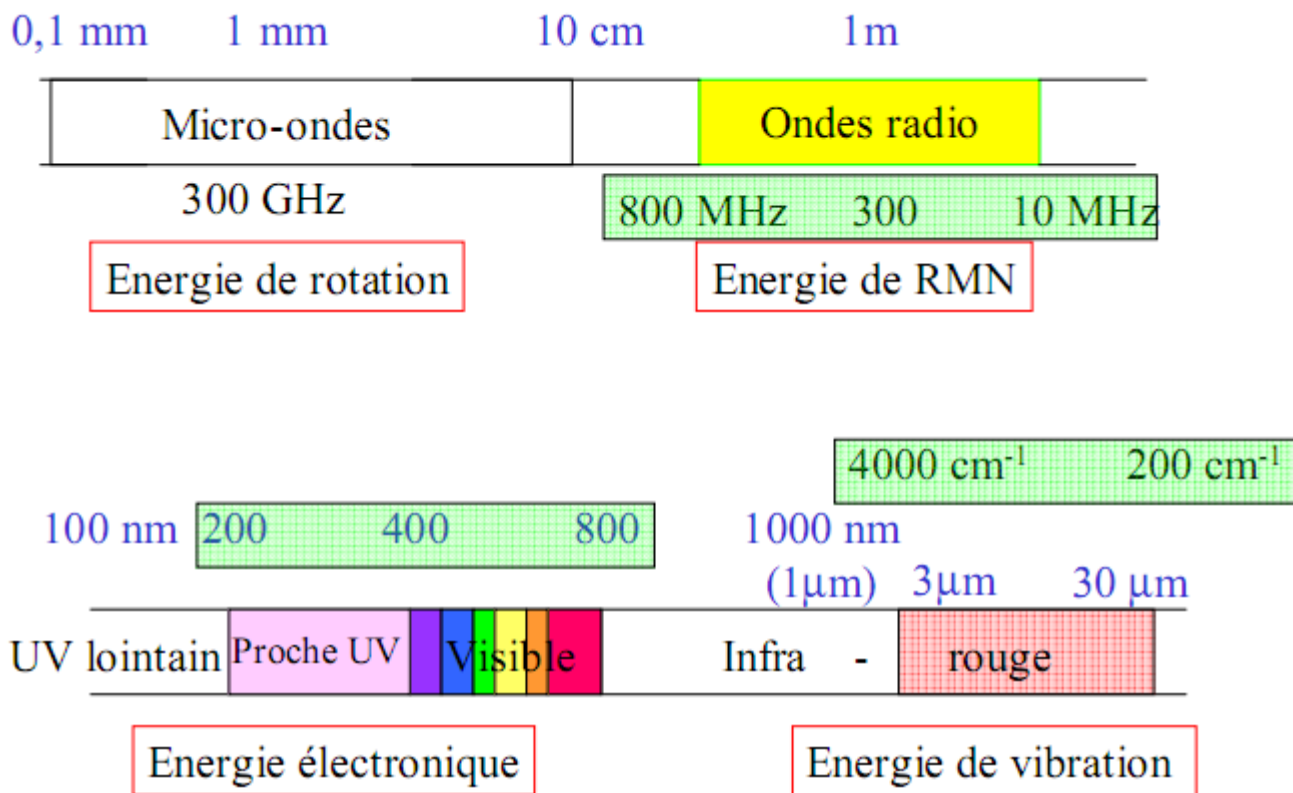
4.1. Principe

Quelque soit leur état physique, les atomes d'une molécule ne sont pas immobiles : ils subissent des vibrations d'élongation ou de déformation à une fréquence bien déterminée qui dépend des atomes mais aussi de l'environnement de la liaison.

Pour une fréquence donnée de lumière IR absorbée, ces liaisons rentrent en résonance : l'énergie apportée est alors consommée : les molécules absorbent et la transmittance T (proportion d'énergie transmise par un échantillon) diminue. Si on représente sur un graphe l'évolution de la transmittance T en fonction du nombre d'onde σ (la fréquence divisée par la vitesse de la lumière dans le milieu), on observe des variations.

La liaison atomique est fondamentalement composée de charges électroniques, combinées dans un état stable. Selon la nature des atomes la liaison peut présenter un caractère de dipôle électrique si le centre de gravité des charges négatives, (les électrons de liaisons) est différent du centre de gravité des charges positives, (les noyaux). Ceci se produit de façon permanente quand les atomes liés ont des électronégativités différentes. La liaison est alors dite polaire. Cela se produit aussi, mais de façon transitoire, notamment dans le cas de gros nuages électroniques, du fait des mouvements des électrons quand ils sont soumis à un champ électrique local intense. La liaison est alors dite polarisable.

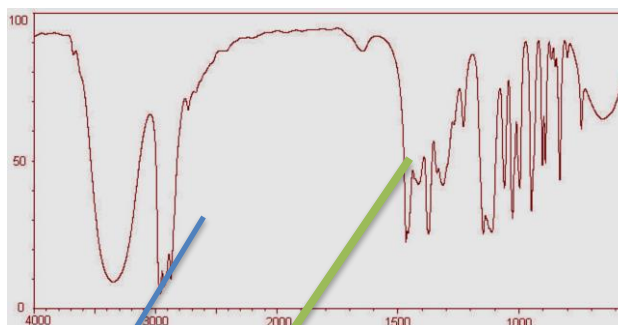




$$\sigma = 1 / \lambda \text{ (en cm}^{-1}\text{)}$$

Un spectre IR renseigne donc sur la nature des liaisons dans une molécule, sur ses groupes caractéristiques.

Une transmittance de 100% signifie que l'échantillon n'absorbe rien, d'où des bandes vers le bas en cas d'absorption



4.2. Exploitation de spectres

On distingue généralement deux zones dans un spectre IR :

Nombre d'onde σ compris entre 1500 et 4000 cm⁻¹ :

On étudie cette zone car elle permet de visualiser les bandes d'absorption des groupes caractéristiques.

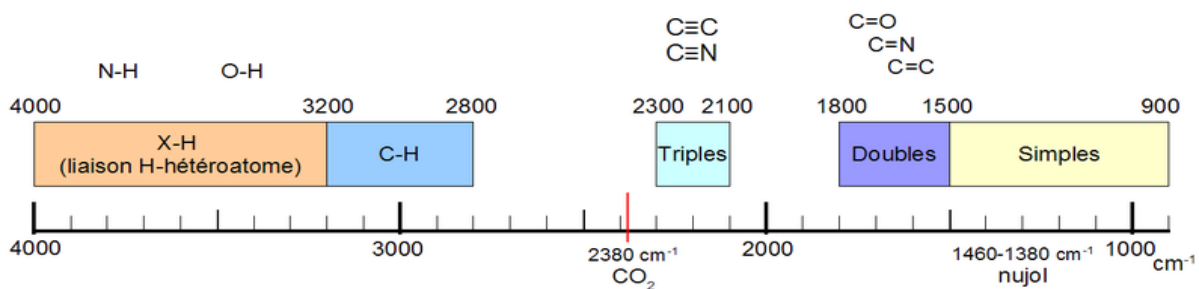
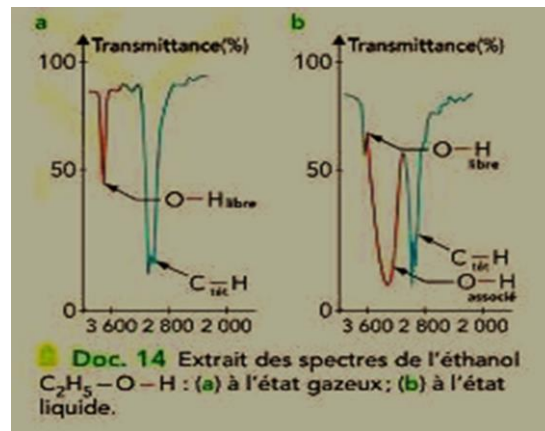
On s'intéresse aussi à la position de la bande (indiquée par son nombre d'onde), à sa largeur (bande large ou fine) et à son intensité (valeur minimale de T)

Nombre d'onde σ compris entre 400 et 1500 cm⁻¹ :

Cette zone s'appelle l'empreinte digitale de la molécule ; elle comporte beaucoup de bandes, et n'est exploitable que

par comparaison avec un spectre de référence.

Exemple :



Quelques domaines d'absorption correspondant à divers types de liaisons chimiques. Les nombres d'onde sont exprimés en cm^{-1} .

4.3. Appareillage

Dans un spectromètre infrarouge un rayon de lumière infrarouge est produit et séparé en deux faisceaux. L'un passe au travers de l'échantillon, l'autre au travers d'une référence qui est parfois le composé dans lequel l'échantillon a été dissous. Les faisceaux sont ensuite réfléchis jusqu'à un détecteur, après être passés par un séparateur qui alterne rapidement les faisceaux entrant dans le détecteur. Les deux signaux sont comparés et le spectre ainsi obtenu tracé.

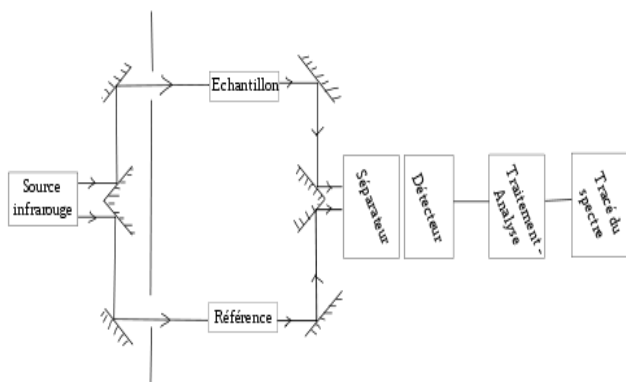


Schéma de fonctionnement d'un spectromètre infrarouge

V. Spectrométrie de masse

Mass Spectrometry ou *MS* est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de **leur masse** et de caractériser **leur structure chimique**.

5.1. Principe

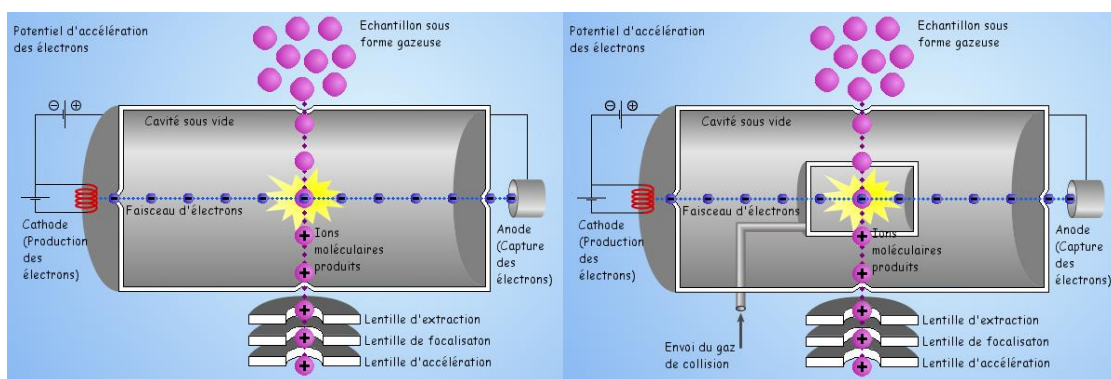
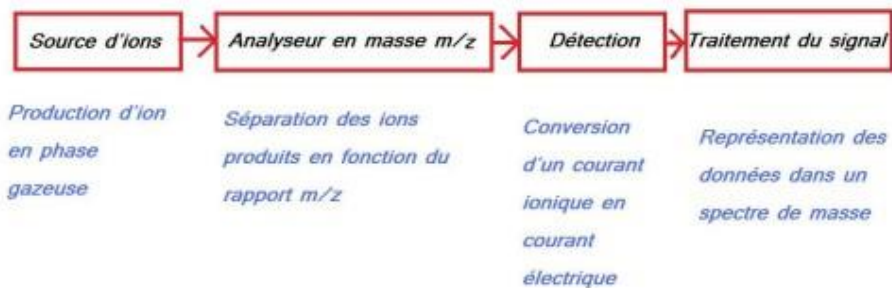
Un composé organique introduit dans le spectromètre de masse est **ionisé** par **bombardement électronique à 70eV**. L'ion ainsi obtenu, appelé **ion moléculaire**, permet la détermination de **la masse molaire** du composé. Il peut y avoir **des ruptures des liaisons chimiques** au sein de l'ion moléculaire, formant ainsi **des ions fragments** caractéristiques puisque cette dissociation éventuelle ne se fait pas au hasard mais selon des mécanismes bien déterminés. Ces ions fragments sont ensuite séparés en fonction de leur rapport masse/charge par l'application d'un champ magnétique et/ou électronique, puis collectés par un détecteur. L'ensemble de ces ions fragments constitue le spectre de masse dont la lecture permet l'identification de la structure moléculaire.

5.2. Appareillage

La composition de base d'un spectromètre de masse:

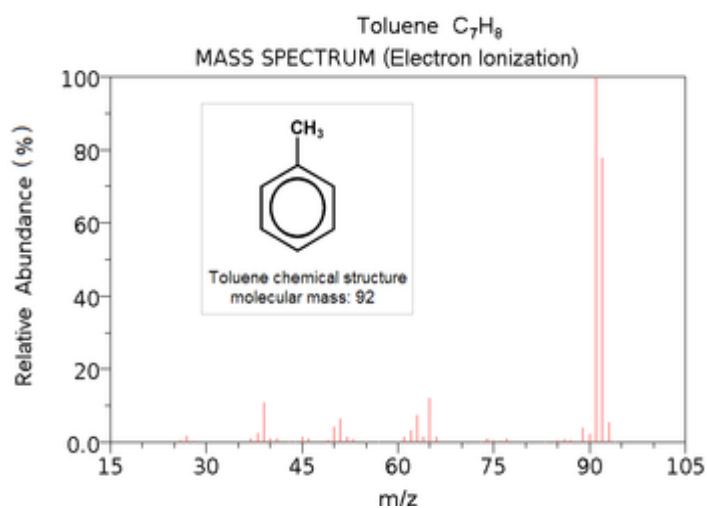
- Un système d'introduction de l'échantillon
- Une source d'ions ou chambre d'ionisation
- Un analyseur qui sépare les ions en fonction de leur masse et de leur charge
- Un détecteur qui détecte les ions sortant de l'analyseur

STRUCTURE D'UN SPECTROMETRE DE MASSE



Source d'ionisation électronique

Source d'ionisation chimique



Suivant le type d'ionisation utilisé, un spectre de masse peut être caractéristique d'une molécule. Ainsi en le comparant avec des banques de spectres, il est possible **d'identifier la molécule**.

Une spectrométrie de masse utilisant l'ESI (ionisation electrospray) présente souvent ses résultats sous forme de m/z (ou masse / charge) pour présenter la proportion des différentes formes chargées d'un même composé.



HPLC couplé à un spectromètre de masse

5.3. Identification :

En comparant le spectre de masse d'une molécule avec des banques des spectres, il est possible d'identifier la molécule. Lors de l'utilisation d'un analyseur haute résolution, la spectrométrie de masse permet de mesurer avec précision la masse mono isotopique d'un ion et d'en déduire sa formule brute

Les ions peuvent se fragmenter dans un spectromètre de masse (dans la source d'ionisation, dans l'analyseur ou dans une cellule de collision) l'étude de ces fragments permet de déterminer la structure des ions.

Un spectromètre de masse est un détecteur universel et très sensible. Sa gamme linéaire va de 3 à 7 ordres de grandeur, d'où la possibilité d'obtenir une quantification fiable sur un domaine large

- Très grande sensibilité (fentomole)
- Sélectivité
- Analyse échantillons minéraux, organiques, bio-organiques quelque soit leur état physique: gazeux, liquide ou solide.

- Domaine d'application:

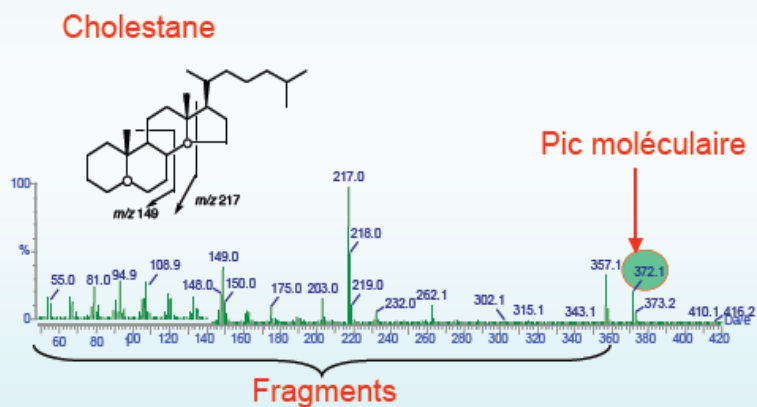
la médecine, la biologie, la pharmacologie, l'industrie chimique, alimentaire, la pétrochimie, l'archéologie, la géologie, l'environnement, le nucléaire..

-Pic moléculaire et masse moléculaire: Définition

- L'existence d'isotopes se traduit par la présence de plusieurs pics moléculaires
- On observe non pas un pic moléculaire, mais un GROUPE de pics moléculaires (un massif moléculaire ou cluster moléculaire)
- La présence d'isotopes complique donc la définition et la mesure du «pic moléculaire»

Quelles informations peut apporter la spectrométrie de masse ?

- 1- La valeur m/z du pic moléculaire permet de calculer la **masse moléculaire**
- 2- Les pics de fragmentation permettent de reconstituer une partie de la **structure**
- 3- L'intensité des pics permet de faire de l'**analyse quantitative**



Exemple: spectre en ionisation par impact électronique du cholestane.

VI. Résonance magnétique nucléaire

6.1. Définition

La **résonance magnétique nucléaire (RMN)** est une propriété de certains noyaux atomiques possédant un spin nucléaire (par exemple ^1H , ^{13}C , ^{17}O , ^{19}F , ^{31}P , ^{129}Xe ...), placés dans un champ magnétique. Lorsqu'ils sont soumis à un rayonnement électromagnétique (radiofréquence), le plus souvent appliqué sous forme d'impulsions, les noyaux atomiques peuvent absorber l'énergie du rayonnement puis la relâcher lors de la relaxation. L'énergie mise en jeu lors de ce phénomène de résonance correspond à une fréquence très précise, dépendant du champ magnétique et d'autres facteurs moléculaires. Ce phénomène permet donc l'observation des propriétés quantiques magnétiques des noyaux dans les phases gaz, liquide ou solide. Seuls les atomes dont les noyaux possèdent un moment magnétique donnent lieu au phénomène de résonance.

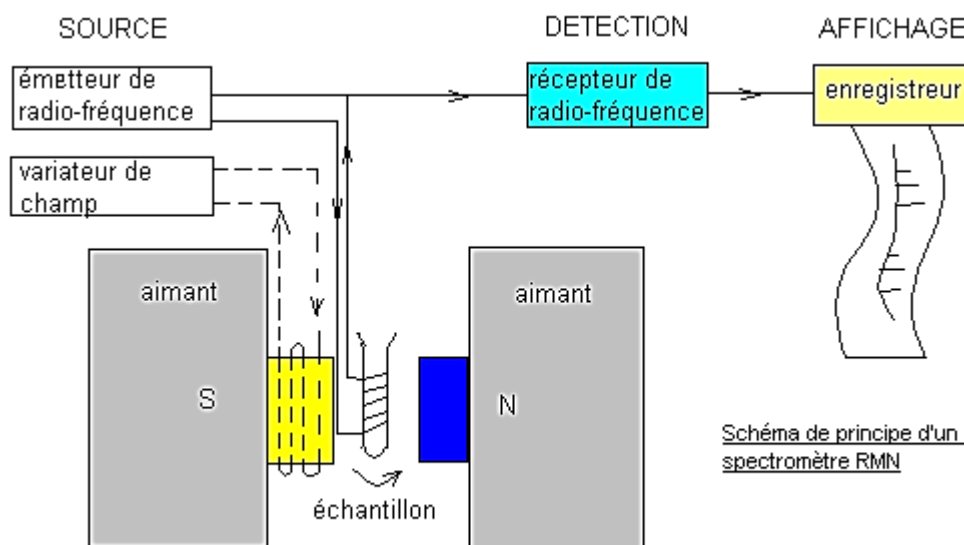
6.1. Principe

La RMN tire son explication du fait que les noyaux des atomes (les protons et les neutrons) possèdent une sorte de « **petit aimant** » interne que les physiciens appellent « **spin** ». On peut donc dire qu'un atome possède aussi un spin en ajoutant tous les spins de chaque particule qui le compose. A noter que si 2 petits aimants sont inverses l'un de l'autre, alors ils s'annulent et le spin résultant est ainsi nul.

Si on applique un **champ magnétique** à ces « petits aimants », ils vont alors se mettre à tourner sur eux même en décrivant un cône, un peu à la manière d'une toupie, c'est le phénomène de **la précession de Larmor**.

Ainsi, tous les atomes ayant un nombre de protons et de neutrons pair comme l'oxygène (4 protons + 4 neutrons) et le carbone (6 protons + 6 neutrons) ont un spin nul et ne sont donc pas soumis au phénomène de RMN. En revanche, tous les atomes ayant un nombre de protons et de neutrons impair sont soumis à ce phénomène de résonance magnétique tel l'**hydrogène** (1 seul proton). L'hydrogène est intéressant en RMN car il est très bien connu des scientifiques et il est présent en grande quantité dans les molécules.

Le spectre RMN correspond à l'absorption par certains atomes de l'échantillon, de certaines des fréquences présentes dans la source électromagnétique. L'interprétation de ces signaux (position, aspect, intensité) conduit à un ensemble d'informations d'où l'on déduit des détails de structure concernant l'échantillon. Ces essais peuvent être effectués en phase liquide ou solide



6.3. Appareillage

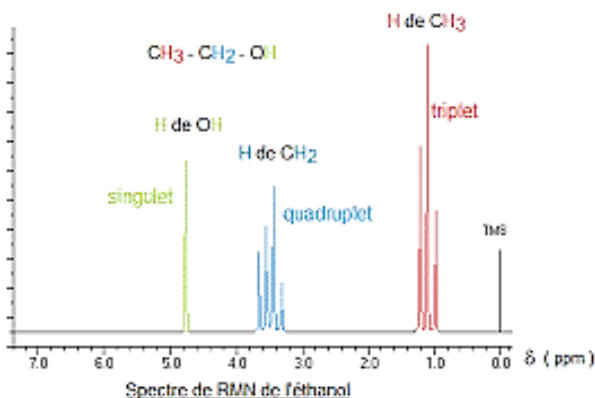
D'un point de vue technique, la prise d'un spectre nécessite un matériel relativement complexe du fait de la faible intensité du phénomène mis en jeu. L'échantillon est préparé dans un tube en verre borosilicaté dans un solvant dépourvu, si possible, d'atomes correspondant à l'isotope étudié. Par exemple, le solvant de choix pour l'étude des spectres protons est le chloroforme deutérié CDCl_3 . Son choix est issu de plusieurs avantages : le proton du chloroforme est facilement échangé par un deutérium, il est donc peu cher et de plus, le deutérium résonnant à une fréquence différente du proton, il est utilisé pour stabiliser le champ

magnétique extérieur, aussi bien dans le temps (stabilité) que dans l'espace (homogénéité). Ces deux aspects du champ sont importants puisque compte tenu de la nature extrêmement ténue du signal, une variation spatiale et/ou une dérive temporelle provoqueront un élargissement important des signaux risquant de faire disparaître les figures de couplage.



La sensibilité d'une expérience de RMN s'améliore avec l'accroissement du champ magnétique ce qui nécessite l'utilisation d'aimants supraconducteurs. Ils permettent de faire circuler un courant très intense (de plusieurs dizaines d'ampère) dans un circuit de résistance nulle. Ainsi aucune perte d'énergie par dissipation thermique n'est à déplorer, alors qu'une bobine en cuivre dans les mêmes conditions dégagerait une énergie qui la ferait fondre ! Le prix à payer est qu'à l'heure actuelle, la plupart des matériaux supraconducteurs ne le sont qu'en dessous d'une certaine température (dite critique) qui est très faible (de l'ordre de $-270\text{ }^{\circ}\text{C}$), ce qui nécessite l'emploi d'hélium liquide (qui bout à $-269\text{ }^{\circ}\text{C}$). Afin d'assurer un minimum de perte thermique, celui-ci calorifugé à l'aide d'azote liquide (bouillant à $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$).

6.4. Spectre RMN



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

Le **déplacement chimique** reflète le décalage entre la fréquence de résonance des protons de la molécule étudiée et une fréquence de résonance prise pour référence. En général la fréquence prise pour référence est la fréquence de résonance des protons de la molécule de tétraméthylsilane (TMS).

Une molécule contient des protons identiques qui seront représentés par un seul pic dont l'aire est proportionnel au nombre de protons présents. Le spectre RMN du proton aura donc plusieurs signaux avec différents déplacements chimiques, représentant les différents environnements et non le nombre de protons présents.

L'intégration des signaux afin d'obtenir l'aire sous les pics permet de connaître le nombre total de protons présents.

6.5. Méthode d'interprétation d'un spectre

La suite chronologique des informations à exploiter est :

- le nombre de signaux et la valeur du déplacement chimique correspondant, ce qui permet d'identifier le nombre et la nature des groupes de protons équivalents ; (en utilisant une table de données) ;
- la courbe d'intégration qui donne le nombre de protons de chaque type ; (l'aire de chaque pic est proportionnelle au nombre de protons responsables du pic. Sur la courbe d'intégration la distance entre deux paliers est proportionnelle à la surface du pic correspondant et donc au nombre de protons.) ;
- la forme de chaque signal qui renseigne sur le nombre de protons voisins du proton étudié. (un signal peut être constitué de plusieurs pics. Ce phénomène est lié à la présence des protons voisins et est appelé couplage spin-spin. En pratique un proton ou un groupe de protons équivalents ayant n protons voisins donnera un signal constitué de $(n+1)$ pics, appelé multiplet (singulet : 1 pic; doublet : 2 pics; triplet : 3 pics; quadruplet : 4 pics; quintuplet : 5 pics....)).

Remarque :

- S'il n'y a pas de courbe d'intégration, on trouve parfois, au-dessus du signal un chiffre qui est égal ou proportionnel au nombre de protons correspondant au signal.
- Si le produit analysé est un acide carboxylique la résonance est obtenue pour un déplacement chimique $10 < \delta < 13$. Si les spectres ne sont gradués que jusqu'à 10 ppm, on effectue un changement d'échelle ("offset"). Ce changement d'échelle est, en général, donné en Hz et il faut le recalculer en ppm d'après la formule $(106.Dn/n0)$; Dn est le décalage offset affiché. A cette valeur de d on doit ajouter la valeur du déplacement chimique où apparaît ce pic pour obtenir le déplacement chimique réel d .

- Les intensités relatives des pics constituant des multiplets sont entre elles comme les coefficients du polynôme $(a+b)^n$ avec n représentant le nombre de protons voisins:

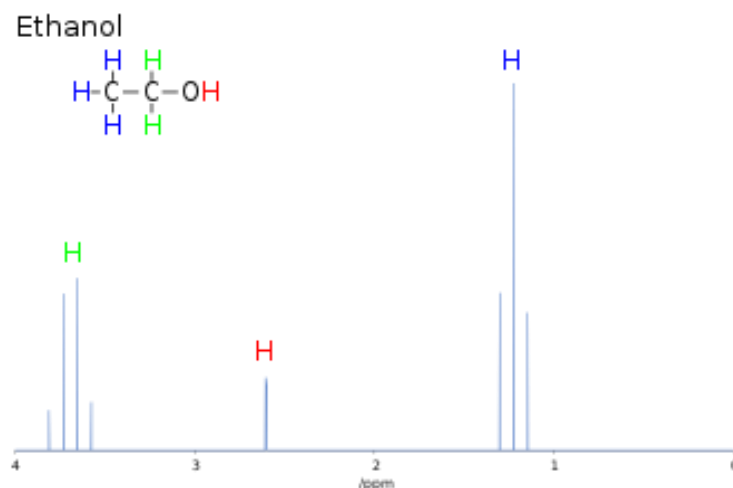
$n = 1$ doublet 1:1

$n = 2$ triplet 1:2:1

$n = 3$ quadruplet 1:3:3:1

$n = 4$ quintuplé 1:4:6:4:1

Attention : la multiplicité des pics ne dépend pas du nombre de protons qui résonnent, mais de ceux de leurs voisins.



Spectre RMN ¹H de l'éthanol

6.6. Couplage LC-RMN

La RMN est la méthode qui fournit le plus de renseignements structuraux sur les composés organiques. Ce couplage était considéré longtemps comme impossible à cause de miniaturisation de la CLHP (échantillon à l'état de traces). Ce couplage est rendu actuellement possible avec les progrès de l'appareillage (CLHP). Le principe consiste au passage de la phase mobile à sa sortie d'un premier détecteur dans une microcellule à circulation placée dans l'appareil de RMN. Sans interrompre le débit (technique on flow) on enregistre au cours du temps plusieurs spectres RMN des composés élués. Lorsque la quantité est trop faible, il faut pouvoir interrompre le débit (technique stop flow) afin d'accumuler des centaines de balayages (scans) pour accroître le signal.

Dans le développement le plus récent en matière de LC-NMR, des cartouches d'extraction en phase solide sont utilisées pour immobiliser des pics sélectionnés après la séparation chromatographique. Les solvants de chromatographie sont retirés puis les échantillons sont élués avec des solvants entièrement deutérés depuis les cartouches pour pénétrer dans une sonde à flux de RMN ou dans des tubes d'échantillons standard de RMN : Système LC/SPE-NMR.



Ultra High Performance Liquid Chromatography (Agilent) – Solid Phase Extraction –CryoFIT Nuclear Magnetic Resonance (Bruker) Analysis.

6.6. Application

▪ **Spectroscopie RMN en biologie structurale**

À côté de la radiocristallographie, la RMN est devenue une méthode d'étude des macromolécules biologiques en biologie structurale. Elle ne nécessite pas l'obtention de monocristaux et permet d'étudier des protéines, des acides nucléiques à des concentrations millimolaires. Les techniques de RMN multidimensionnelles conduisent à corrélérer les fréquences de plusieurs spins et de résoudre les ambiguïtés liées aux superpositions spectrales. Des protéines de masse moléculaire de 10 à 30 kDa peuvent être analysées ainsi que des oligonucléotides de plusieurs dizaines de paires de bases.

▪ La RMN en imagerie médicale et biophysique

L'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) est une technique d'imagerie médicale permettant d'avoir une vue 2D ou 3D d'une partie du corps. Cette technique est très utile pour l'observation du cerveau. Grâce aux différentes séquences (séquence IRM), on peut observer différents tissus avec des contrastes très élevés, car la résolution en contraste est nettement meilleure que celle du scanne.

VII. SPECTROMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE

1 – INTRODUCTION

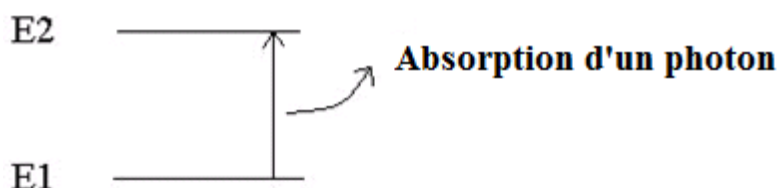
La spectrométrie d'absorption atomique (AAS) est une technique décrite pour la 1ère fois par Walsh (1955). AAS étudie les absorptions de lumière par l'atome libre. C'est une des principales techniques mettant en jeu la spectroscopie atomique dans le domaine UV-visible utilisée en analyse chimique. Elle permet de doser une soixantaine d'éléments chimiques (métaux et non-métaux). Les applications sont nombreuses étant donné qu'on atteint couramment des concentrations inférieures au mg/L (ppm).

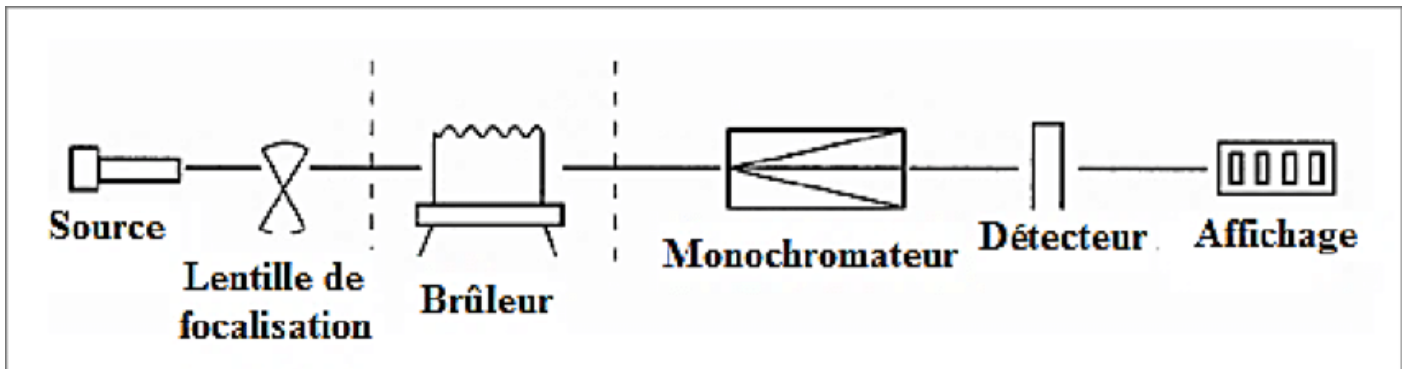
2 – PRINCIPE

L'absorption atomique de flamme est une méthode qui permet de doser essentiellement les métaux en solution. Cette méthode d'analyse élémentaire impose que la mesure soit faite à partir d'un analyte (élément à doser) transformé à l'état d'atomes libres. L'échantillon est porté à une température de 2000 à 3000 degrés pour que les combinaisons chimiques dans lesquelles les éléments sont engagés soient détruites. La spectrométrie d'absorption atomique est basée sur la théorie de la quantification de l'énergie de l'atome. Celui-ci voit son énergie varier au cours d'un passage d'un de ses électrons d'une orbite électronique à une autre :

$$\delta E = h\nu$$

où h est la constante de Planck et ν est la fréquence du photon absorbé. Généralement seuls les électrons externes de l'atome sont concernés.





Les photons absorbés étant caractéristiques des éléments absorbants, et leur quantité étant proportionnelle au nombre d'atomes d'élément absorbant selon la loi de distribution de Boltzmann, l'absorption permet de mesurer les concentrations des éléments à doser. L'analyse par absorption atomique utilise la loi de Beer-Lambert. S'il y a plusieurs éléments à doser, on réalise cette manipulation pour chaque élément de l'échantillon en se plaçant à une longueur d'onde fixée. Il faut donc à chaque manipulation choisir une source adaptée pour éclairer l'élément que l'on cherche à exciter.

2.1. Mode absorption atomique :

Le faisceau lumineux issu de la source (1) traverse la flamme (2) dans laquelle l'élément se

trouve porté à l'état atomique, avant d'être focalisé sur la fente d'entrée d'un monochromateur (3) qui sélectionne un intervalle très étroit de longueurs d'onde. Le trajet optique se termine sur la fenêtre d'entrée du détecteur (4).

Le détecteur, le plus souvent un tube photomultiplicateur, mesure l'intensité transmise. Le principe de l'analyse quantitative est exactement le même que pour la spectrométrie UV/visible ou la spectrométrie infrarouge.

On mesure l'intensité transmise avec échantillon, I , sans échantillon (solvant seul), I_0 et on définit les grandeurs suivantes

La transmittance : $T = I/I_0$

Le pourcentage de transmission : $\%T = 100I/I_0$

Le pourcentage d'absorption : $\%A = 100 - \%T$

L'absorbance : $A = \log I_0/I$

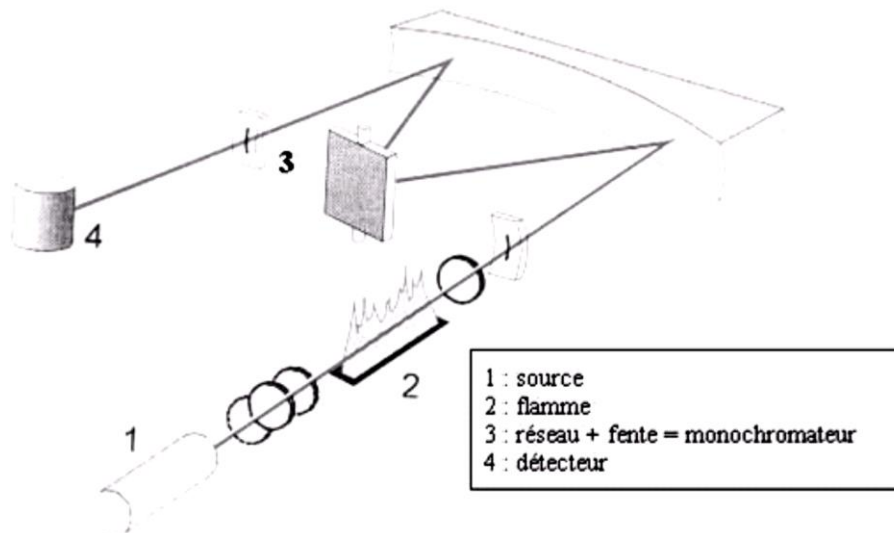
Loi de Beer Lambert : **$A = k.l.c$**

Où :

- ✓ k = coefficient d'absorption qui est une constante pour une espèce absorbante et une transition données.
- ✓ l = longueur du trajet optique dans la zone où se trouve l'espèce absorbante (longueur de la flamme ou du four en graphite).
- ✓ c = concentration en espèce absorbante.

2.2. – Instrumentation de base

Le dispositif expérimental utilisé en absorption atomique se compose d'une source, la lampe à cathode creuse, d'un brûleur et un nébuliseur, d'un monochromateur et d'un détecteur relié à un amplificateur et un dispositif d'acquisition.



- Source :
 - a) à lampe à cathode creuse :

C'est la source la plus utilisée, elle émet un spectre discontinu. Elle est constituée d'une enveloppe de verre scellée contenant une cathode métallique cylindrique creuse et une anode en tungstène ou en nickel. L'enveloppe est aussi pourvue d'une fenêtre en verre ou en quartz. L'ampoule est remplie d'un gaz rare (argon ou néon) sous une pression de quelques mmHg. Le spectre d'émission comporte des raies intenses qui dépendent de l'élément constituant la cathode. 40 espèces métalliques sont couramment utilisées. La sélectivité élevée de la SAA est due au fait qu'on utilise pour chaque élément une lampe particulière. En appliquant une ddp (environ 300 V) entre les deux électrodes, le gaz rare s'ionise et bombarde la cathode. Des atomes libres et excités par chocs sont donc arrachés. Il y a par la suite une désexcitation radiative caractéristique de ces atomes en revenant à leur état fondamental.



Figure 20 : Schéma d'une lampe à cathode creuse

- b) Lampe à décharge sans électrode :

Elle est constituée d'un tube en quartz scellé contenant un gaz inerte et une petite quantité d'une espèce métallique, ou d'un de ses sels, le tout sous une pression de quelques mmHg. L'énergie est fournie par un champ électrostatique intense. Le gaz inerte s'ionise et les ions sont accélérés jusqu'à une énergie nécessaire pour arracher et exciter les atomes métalliques. Il y a alors, tout comme pour la lampe à cathode creuse, une désexcitation radiative caractéristique.

➤ L'atomiseur :

La SAA nécessite d'avoir les atomes à l'état fondamental, afin d'observer les raies caractéristiques de l'élément. L'atomiseur doit donc fournir des atomes libres sans les exciter. Il faut de la chaleur pour faire passer l'échantillon généralement en solution à l'état d'un gaz atomique. Cette chaleur peut être générée par une flamme ou par un four de graphite. La SAA de flamme analyse seulement les solutions, tandis que la SAA de four de graphite analyse les solutions, les boues liquides et les solides.

a) Atomiseur de flamme : (voir Figure 21)

Il consiste en un nébuliseur et un brûleur. A l'orifice du nébuliseur, du fait de l'éjection d'un gaz à grande vitesse et sous l'effet de la différence de pression, la solution de l'analyte généralement aqueuse, est alors aspirée dans un capillaire et à la sortie, elle est pulvérisée en un aérosol constitué de fines gouttelettes. Cet aérosol contenant le comburant (en général le gaz à haute pression) est mélangé au carburant. Ce mélange arrive au brûleur qui libère une large flamme composée de quatre zones. Le solvant est éliminé dans la zone primaire. Il reste les sels ou particules solides qui sont alors fondus, vaporisés puis atomisés. C'est dans la région secondaire qu'a lieu la vaporisation. L'atomisation a lieu dans la zone tertiaire. La flamme est caractérisée par sa réactivité chimique, sa température et son spectre.

La durée du passage de l'échantillon dans la flamme est très courte donc une portion significative n'a pas le temps d'être atomisée, ce qui limite la sensibilité de la méthode. Cette dernière peut être améliorée en jouant sur la température (2000- 4000 K) qui dépend du mélange combustible-comburant utilisé. Ce mélange est choisi adéquatement en fonction de l'échantillon à analyser. De plus, le nombre d'atomes à l'état fondamental est peu affecté par une faible variation de température (la loi de Boltzmann). La flamme air/acétylène (2500°C) est la plus répandue et permet de réaliser le dosage de nombreux éléments. La flamme N₂O/acétylène est utilisée pour certains éléments qui forment des oxydes réfractaires particulièrement solides et ne sont pas atomisés par la flamme air/acétylène. La limite de détection est typiquement de l'ordre de ppm.

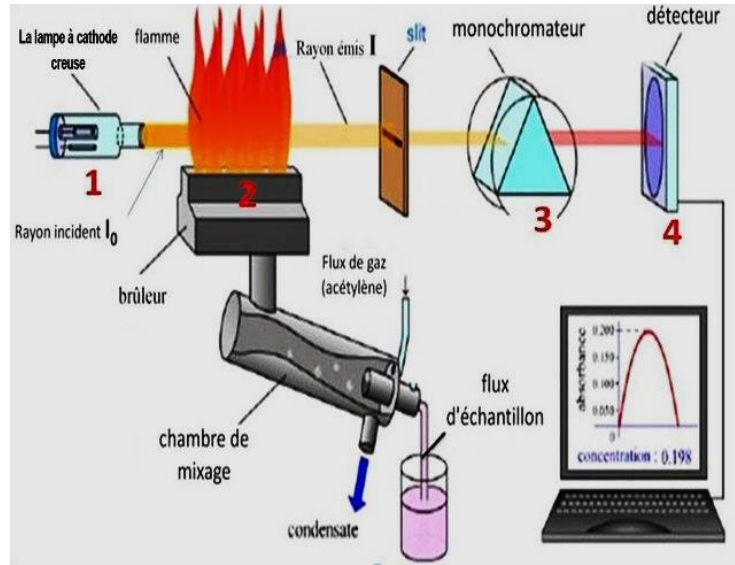


Figure 21 : Schéma d'un spectrophotomètre d'absorption atomique de flamme
 Quelques éléments (l'arsenic, le bismuth, l'étain, le sélénium) sont difficilement réduits à l'état atomique quand ils sont dans des états d'oxydation élevés. Pour les doser, on fait réagir l'échantillon, en amont du spectrophotomètre, sur un agent réducteur (NaBH_4 ou SnCl_2) en milieu acide. Il se forme un hydrure volatil de l'élément qui est entraîné par un gaz de balayage vers une cellule en quartz placée dans la flamme du brûleur.

➤ Le sélecteur de longueur d'onde (monochromateur) :

En général, il n'est pas nécessaire d'utiliser un monochromateur de haute précision car la largeur de raie de la source est une première sélection. Un simple filtre de verre est souvent adéquat pour quelques métaux alcalins. Toutefois la plupart des instruments de SAA sont munis d'un monochromateur. Son rôle consiste à choisir la raie la plus intense et d'éliminer toute lumière, quelle que soit son origine, ayant une longueur d'onde différente de celle à laquelle on travaille (les raies du gaz de remplissage dans la source, d'éventuelles impuretés ou de l'atomiseur).

➤ Le détecteur :

Il mesure les intensités lumineuses nécessaires au calcul des absorbances. L'absorption spécifique est due à l'élément à doser. L'absorption non spécifique est due à l'absorption continue de la matrice.

On a : Absorbance spécifique = Absorbance totale – Absorbance non spécifique

Plusieurs types de détecteurs sont adéquats. Le choix de celui-ci se fera, pour chaque raie d'absorption sélectionnée pour l'analyse, en fonction de sa réponse en fréquence. Le détecteur le plus couramment utilisé est un photomultiplicateur.

3- DOSAGE PAR ABSORPTION ATOMIQUE

La courbe d'étalonnage est déterminée de deux manières différentes : - Etalonnage direct → matrice simple (un seul élément à doser) - Méthode des ajouts dosés → matrice complexe ou inconnue

Remarques : - S'assurer de la similitude de composition (solvant, concentration en acide, teneur en sels...) entre les solutions d'étalonnage et d'échantillons. - Ne pas comparer des échantillons en solution organique à des étalons aqueux. VII - QUELQUES APPLICATIONS La spectrophotométrie d'absorption atomique est essentiellement une méthode d'analyse quantitative qui convient beaucoup mieux à la détermination des traces qu'à celle des composants majeurs. La spectrométrie d'absorption atomique permet le dosage de nombreux matériaux inorganiques (roches et minerais, métaux et alliages...). Elle est donc très adaptée à l'étude du matériel archéologique. Elle permet aussi de quantifier les éléments métalliques en solutions (Gestion des déchets). Citons quelques exemples :

- l'analyse des constituants majeurs et mineurs de céramiques archéologiques
- le dosage du Ca, Sr, Zn dans les os
- l'analyse des éléments traces pour identification des pierres
- la dégradation des verres
- dosage des particules métalliques (Cu, Fe...) dans le papier
- l'analyse des eaux
- l'analyse des tissus végétaux et animaux, des liquides biologiques
- l'analyse des aliments et boissons,
- l'analyse des sols, engrais et sédiments
- l'analyse des produits industriels

Avantages : haute sensibilité, grande spécificité, rapidité, faible quantité de substance nécessaire (1 mL de la solution peut suffire) et facilité de préparation des solutions étalons. Inconvénients : nécessité d'utiliser pour chaque élément à doser une source caractéristique, technique d'analyse destructrice, domaine d'application limité presque exclusivement aux métaux (Cu, Zn, Pb, Cr, Fe, Cd, etc...), nécessité d'avoir des concentrations assez faibles.

Inconvénients : nécessité d'utiliser pour chaque élément à doser une source caractéristique, technique d'analyse destructrice, domaine d'application limité presque exclusivement aux métaux (Cu, Zn, Pb, Cr, Fe, Cd, etc...), nécessité d'avoir des concentrations assez faibles.

Bibliographie:

1. Chimie organique expérimentale. 2^{ème} édition. Editeur: Belin
Auteurs: Chavanne, Beaudoin, Jullien, Flamand. 1999. 901p
2. Analyse chimique (méthodes et techniques instrumentales modernes). Editeur: Dunod. *Auteur:* Rouessac Francis, Rouessac Annick. 2004. 480p
3. 144 manipulations de chimie générale et minérale. Editeur : Ellipses
Auteur: Defranceschi Mireille. 1990. 192p.
4. Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. 4^{ème} édition. Éditeur : Masson. *Auteur :* Jean Tranchant. 1995. 700p.
5. Experimental biochemistry Edition: Oxford Univesity Press, Oxford
Auteur: RL. Dryer, GF. Lata. 1989. 514p.
6. An introduction to practical biochemistry. (3ème edition). Editeur: McGraw Hill Book Co., London. *Auteur:* DT. Plummer. 1987. 332p.
7. Appareils et méthodes en biochimie. Editeur : Flammarion, Médecine-Sciences, Paris.
Auteur: Pierre Kamoun. 1987. 373p.
8. SPECTROMETRIE DE MASSE. Cours et exercices. 2ème édition. Editeur: Dunod
Auteurs Jean Charette Edmond de Hoffmann Vincent Stroobant. 1999. 399 p.
9. <https://www.youtube.com/watch?v=DpIU-33pwVs>
10. [https://www.google.fr/search?q=a\)%09Le+temps+de+rétention+\(tr\)+&tbm=isch&ved=2ahUKewiWsumFgt_0AhUE2xoKHcgeD24Q2-cCegQIAB](https://www.google.fr/search?q=a)%09Le+temps+de+rétention+(tr)+&tbm=isch&ved=2ahUKewiWsumFgt_0AhUE2xoKHcgeD24Q2-cCegQIAB)
11. <https://facscm.univ-annaba.dz/wp-content/uploads/2020/05/Spectroscopie-dabsorption-d%C3%A9mission-atomiques.pdf>
12. <https://www.gci.ulaval.ca/fileadmin/gci/documents/rgalvez/Extra%2063617/Laboratoire.pdf>
13. <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/spectro/C5.html>