

CATEGORIE TECHNIQUE

Formation de Master en Sciences de
l'Ingénieur Industriel - Packaging

1^{ère} année.

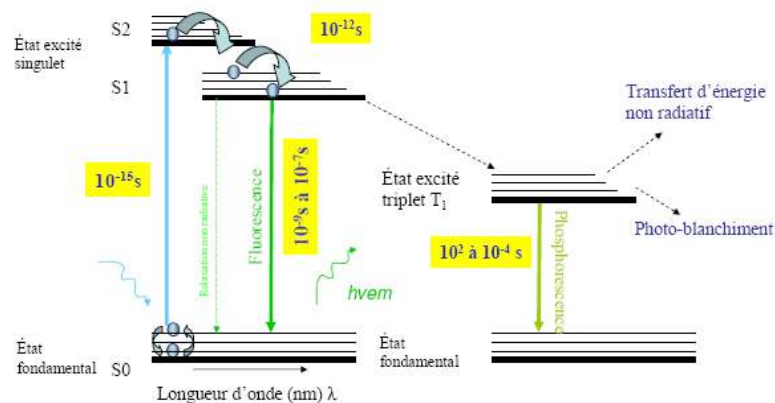
B5a (physique) - bureau 4/57

Allée du 6 Août, 17

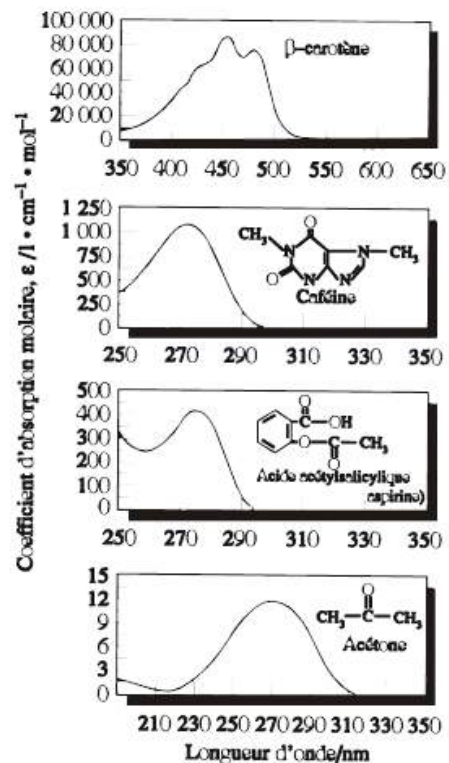
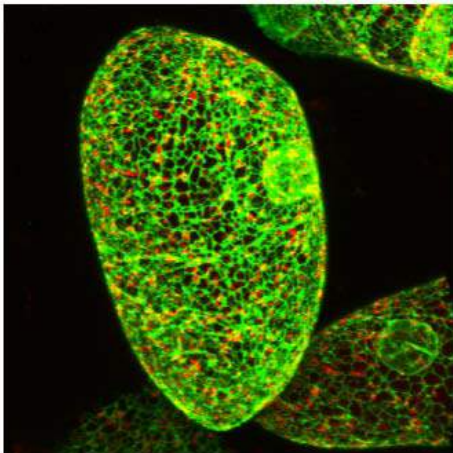
B-4000 Liège (Sart-Tilman)

Tél. : 04 / 366 22 90 / Fax : 04 / 366 22 93

Email : secre.technique@hech.be



Cours de Chimie Analytique et caractérisation des matériaux.



Steve Gillet, D. Sc.

Email : chimiehe@yahoo.fr

Website : <http://perso.latribu.com/shagar>

La spectrométrie.

1.1. Généralités sur la spectrométrie

Introduction

Dans ce cours, nous allons étudier les différentes interactions qui peuvent exister entre la matière et un rayonnement électromagnétique. Plus spécifiquement, nous allons voir comme il est possible d'interpréter les résultats de cette interaction pour en déduire des informations quant à la structure atomique et moléculaire de la matière irradiée et/ou pour doser cette matière. Nous allons également aborder une technique qui repose sur un principe physique différent, mais qui permet également d'identifier la structure de la matière et de la quantifier : la spectrométrie de masse.

Rayonnement électromagnétique

Le **rayonnement électromagnétique**, dont la **lumière** est un exemple, est une forme d'énergie constituée d'ondes, c'est-à-dire de **phénomènes vibratoires caractérisés par** : une **vitesse de propagation** (en l'occurrence $c = 3.10^8 \text{ m.s}^{-1}$, constante pour toutes les ondes électromagnétiques dans le vide), **une fréquence ν** (nombre de vibrations par seconde) et une **longueur d'onde λ** (distance parcourue pendant une vibration). Ces 3 longueurs sont **liées par la relation $\lambda = c / \nu$** . Bien qu'il y ait une continuité totale dans les valeurs possibles de longueur d'onde (ou de fréquence), on distingue (arbitrairement) sur cette base des **domaines particuliers du rayonnement électromagnétique**, comme indiqué sur la figure 1.1. Il est bon de rappeler également que **l'énergie d'un rayonnement électromagnétique est reliée à sa fréquence** par la relation **$E = h \nu$** .

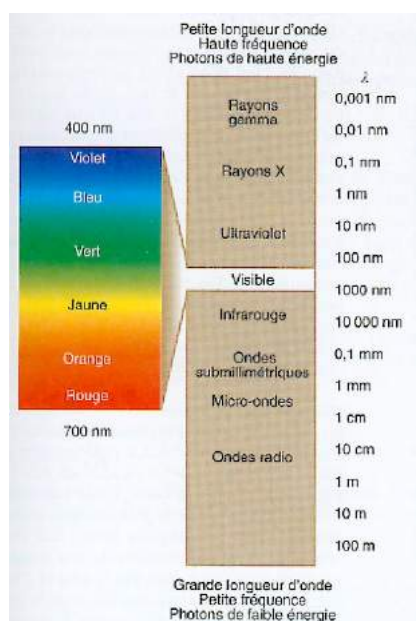


Figure 1.1. : Domaines particuliers du rayonnement électromagnétique : A noter que l'échelle des longueurs d'onde utilisée sur ce schéma est logarithmique, chaque intervalle correspondant à un facteur de 10, et non à une variation de 10 unités. Il est également intéressant de voir que le domaine du visible, le seul auquel notre œil est sensible, est extrêmement étroit et est limité entre 400 et 700 nm. A l'intérieur de cet intervalle, la longueur d'onde détermine la couleur perçue.

A chacun des domaines particuliers du rayonnement électromagnétique, ou presque, correspond un type de spectroscopie qui repose sur une interaction particulière de la matière avec ce rayonnement. Ainsi pour le domaine :

- Des γ et des ***RX***, le rayonnement est extrêmement énergétique et il va pouvoir affecter les ***électrons des orbitales atomiques de cœur***. Ces Interactions sont utilisées notamment dans la ***spectrométrie γ*** et dans la ***fluorescence X***.
- Des ***UV*** et du ***visible***, le rayonnement est énergétique et il va pouvoir affecter les ***électrons des orbitales atomiques périphériques*** et/ou des orbitales ***moléculaires***. Ces interactions sont utilisées notamment dans la ***spectrométrie d'émission atomique*** (SEA), la spectrométrie ***d'absorption atomique*** (SAA) et la spectrométrie ***moléculaire*** (UV-vis).
- De ***l'infra rouge*** (IR) le rayonnement est faiblement énergétique et ne peut affecter principalement que les ***modes de vibration*** des molécules. Ces interactions sont utilisées notamment dans la ***spectrométrie IR*** et la spectrométrie ***Raman***.
- Des ***micro-ondes***, finalement, le rayonnement est très faiblement énergétique et ne peut affecter que les ***modes de rotation des molécules***. Ces interactions sont utilisées notamment dans la ***spectrométrie micro-onde***.

Dans le cadre de ce cours, nous écarterons les deux domaines extrêmes pour ne nous attarder que sur l'UV-vis. et l'IR.

Spectre, spectroscopie et spectrométrie

La ***spectroscopie*** est ***l'étude du spectre électromagnétique*** d'un phénomène, ***visuellement*** (d'où le suffixe -scopie). Depuis un certain temps, maintenant, l'œil a été remplacé par différents types de ***détecteurs photoélectriques***, moins subjectifs et il convient alors de parler de ***spectrométrie*** (le suffixe -métrie indiquant que l'on effectue une mesure et non une simple appréciation du phénomène). Dans de nombreux cas, il convient donc de remplacer le terme « spectroscopie », par le terme plus exact de « spectrométrie » toutefois, les vieilles habitudes ayant la vie dure, il est courant de faire l'amalgame entre ces deux termes.

Quoiqu'il en soit, il nous reste à définir le ***spectre***. Il s'agit de la ***distribution en énergie, puissance, intensité, absorbance, transmission, etc*** (signal en général) ***en fonction de la longueur d'onde ou de la fréquence***. On distingue 3 types de spectres :

- Les ***spectres continus***, pour lesquels il existe un « signal » pour chaque longueur d'onde (ou fréquence). Ex. Gauche de la figure 1.2.
- Les ***spectres discontinus***, ou ***spectres de raies***, ou encore ***spectres discrets***, qui ne disposent d'un signal que pour certaines fréquences (longueurs d'onde)

spécifiques, caractéristique de la matière irradiante ou irradiée. Ex. Milieu de la figure 1.2.

- Les **spectres combinés** qui sont constitués d'une superposition d'un spectre continu et d'un spectre discret. Ex. Droite de la figure 1.2.

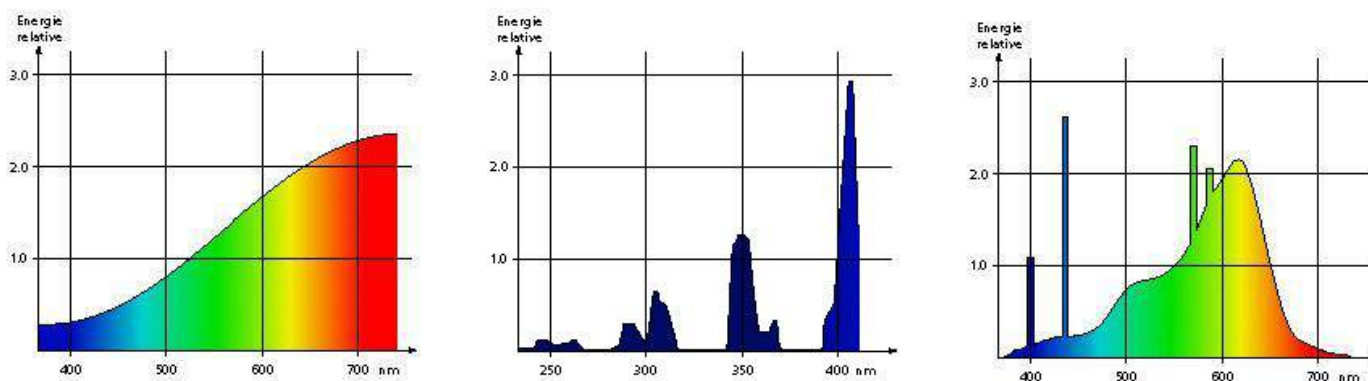


Figure 1.2. : Différents types de spectre : Gauche : Spectre continu. Milieu : Spectre discret, discontinue ou de raies. Droite : Spectre combiné.

Émission et absorption

Il peut se produire des **échanges énergétiques entre la matière et un rayonnement dans deux sens** :

- **Émission** : dans certaines conditions, la matière peut émettre du rayonnement. C'est le cas, par exemple, de toutes les sources lumineuses : soleil, ampoule à incandescence, flammes, tubes « fluos », vers luisants, etc.
- **Absorption** : l'énergie d'un rayonnement peut être absorbée par la matière. L'échauffement d'un objet au soleil, l'absorption des rayons X par les parties denses de notre corps, le phénomène de la couleur,... en sont autant d'exemples. Cette absorption peut avoir des effets chimiques en déclenchant des réactions chimiques.

(Illustration en classe figure 1.3.)

1.2. Spectrométrie d'absorption et d'émission atomique

L'expérience montre que **les atomes n'émettent un rayonnement que si on les soumet à une excitation**. Celle-ci peut se réaliser **par chauffage** (ex. : flamme jaune en présence de chlorure de sodium) ou **par l'action d'un champ électrique** (ex. : décharge dans un gaz). Les spectres obtenus à partir des rayonnements ainsi provoqués sont des **spectres de raies**. Ils comportent un ensemble de fréquences, **caractéristiques de chaque élément**. L'analyse des spectres d'émission peut donc constituer une **méthode d'analyse chimique**. Les métaux s'y prêtent particulièrement bien, et c'est une méthode d'analyse des

alliages. C'est aussi en analysant la lumière reçue des étoiles que l'on peut savoir quels éléments chimiques y sont présents. Les fréquences caractéristiques de chaque élément sont strictement invariables et on les utilise parfois comme étalon pour la définition de certaines unités. Le mètre, par exemple, est défini comme la longueur égale à 1 650 763, 73 longueurs d'onde dans le vide d'une raie émise par le nucléide ^{86}Kr . La seconde, est définie comme la durée de 9 192 631 770 vibrations pour l'une des raies émises par le nucléide ^{133}Cs .

Aspect théorique

La théorie des quanta

La théorie des quanta a été formulée pour expliquer divers phénomènes, notamment l'effet photoélectrique (arrachement d'électrons à un métal sous l'action d'un rayonnement de longueur d'onde suffisamment courte). Elle repose sur l'idée que ***l'énergie ne peut pas être échangée entre la matière et le rayonnement de manière continue***, par quantités aussi petites que l'on veut, à la limite infiniment petites. ***Ces échanges***, qu'il s'agisse d'absorption ou d'émission du rayonnement, ***ne peuvent avoir lieu que par multiples entiers d'une quantité minimale d'énergie***, égale à ***un quantum***. Il ne peut pas exister d'échanges d'énergie entre matière et rayonnement par quantité inférieure à un quantum.

Cela revient à dire que ***l'énergie, comme la matière, est discontinue***. En plus de son aspect ondulatoire, qui explique certains phénomènes, on doit aussi lui attribuer un caractère corpusculaire, qui en explique d'autres. ***Un rayonnement peut être décrit soit comme une onde, soit comme un flux de particules***, les photons, qui représentent chacun un quantum d'énergie. La valeur d'un quantum dépend de la fréquence ν du rayonnement concerné : 1 quantum (photon) = $h \cdot \nu$ (joules). Quand un atome absorbe un rayonnement de fréquence ν , son énergie augmente de la quantité $h \cdot \nu$. Et inversement, si un atome émet un rayonnement de fréquence ν , il perd une quantité d'énergie égale à $h \cdot \nu$.

Le modèle de l'atome de Bohr

La prise en compte de la théorie des quanta a conduit Bohr à construire un nouveau modèle de l'atome, dont les caractéristiques essentielles sont les suivantes :

- ***L'énergie de l'électron*** (qui représente en fait l'énergie de l'électron dans le champ d'attraction du noyau, donc l'énergie de l'ensemble du système « noyau + électron »)

est quantifiée, c'est-à-dire qu'elle ne peut prendre que certaines valeurs déterminées, appelées également **niveaux d'énergie**.

- **À chacune des valeurs** possibles **pour l'énergie** d'un électron **correspond une trajectoire circulaire stable**, sur laquelle l'électron ne rayonne pas et ne perd donc pas d'énergie, et une distance noyau-électron.
- Les **changements d'énergie** d'un électron ne peuvent s'effectuer que **par sauts discontinus** d'un niveau à un autre. On appelle ces sauts **des transitions**. Si la variation d'énergie associée à une transition est ΔE , la fréquence du rayonnement absorbé ou émis est définie par la relation $\Delta E = h.v$.
- En l'absence d'une excitation extérieure, un électron se trouve en permanence sur le niveau d'énergie le plus bas possible. **Si tous les électrons d'un atome sont à leur plus bas niveau d'énergie possible, l'atome est dans l'état fondamental, sinon il est dans un état excité.**

Ce modèle rend effectivement compte des observations qui peuvent être faites à propos des spectres d'émission atomique.

- Puisque les électrons sont normalement au niveau d'énergie le plus bas possible, ils ne peuvent pas perdre d'énergie. L'émission d'un rayonnement ne peut donc avoir lieu que si une excitation (apport d'énergie) les porte d'abord à un niveau supérieur, d'où ils pourront ensuite redescendre sur un niveau inférieur, en émettant un photon.
- L'existence de niveaux d'énergie bien définis, et celle de la condition $\Delta E = h.v$, justifient les spectres de raies : seul un rayonnement dont la fréquence satisfait à cette condition pour l'une des transitions possibles peut échanger de l'énergie avec l'atome, à l'émission comme à l'absorption.

L'**absorption d'un photon** de fréquence convenable provoque des **transitions « montantes »** ; l'**émission de rayonnement** a lieu à l'occasion de **transitions « descendantes »**, qui ramènent l'électron au niveau fondamental, directement ou par étapes. Les séries de raies observées dans les **spectres d'émission** correspondent à l'**ensemble des transitions descendantes** qui aboutissent à un niveau déterminé. Il est à noter qu'il existe des **règles de sélection**, en fonction desquelles **certaines transitions sont interdites**.

Il est à noter qu'**un électron ne peut subir qu'une seule transition à la fois** et, si on raisonne sur un seul atome, le schéma de la figure 1.3. ne peut justifier l'obtention d'un spectre d'émission dans lequel on observe simultanément toutes les transitions (raies) possibles. L'interprétation microscopique ne rend pas compte de l'existence du phénomène observé au niveau macroscopique. **Mais l'échantillon avec lequel on produit ce spectre**

contient toujours, si petit soit-il, un nombre énorme d'atomes (54 milliards de milliards dans 1 ml, à 0°C et sous 1 atm) ***et à tout moment, au sein de cet échantillon, toutes les transitions peuvent avoir lieu.***

Aspect pratique (émission)

Généralités

Nous venons de voir dans la partie théorique que des atomes excités peuvent voir leurs électrons retomber à des niveaux d'énergie plus faible avec émission simultanée d'une radiation, dont la longueur d'onde (et donc l'énergie) correspond à la différence d'énergie entre les deux niveaux envisagés ($\Delta E = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda$). Ces ***différences de niveaux énergétiques sont caractéristiques pour chaque atome***, il est donc possible en les identifiant, de déterminer la nature de l'atome qui les émet : on dispose donc d'une ***méthode d'identification des atomes.***

On peut distinguer ***deux types de spectrométrie d'émission atomique*** en fonction de la nature de la source d'excitation et donc de la plage d'énergie mise en œuvre :

- Si l'***excitation*** est ***d'origine thermique*** (flamme, plasma d'argon,...) ***ou électrique*** (atomisation par arc, étincelle,...), l'énergie mise en œuvre est relativement limitée et les raies émises se situeront dans le ***domaine de l'UV et du visible*** (plage d'énergie qui correspond aux ***électrons périphériques***). On parle alors de Spectrométrie d'Émission Atomique (SEA en français et AES : Atomic Emission Spectroscopy en anglais) ou encore de Spectrométrie d'Émission Optique (SEO en français et OES ; Optical Emission Spectroscopy en anglais).
- Si l'***excitation*** a pour origine ***un bombardement électronique ou électromagnétique de haute énergie (γ ou X)***, le spectre de raies se place dans le ***domaine des rayons X*** (plage d'énergie correspondant aux ***électrons internes***). On parle en général, dans ce cas, de ***spectrométrie de Fluorescence X*** (FRX en français et XRF : X-Ray Fluorescence en anglais).

Dans la suite de ce cours, nous allons surtout nous concentrer sur l'émission atomique dans le domaine de l'UV-Vis., puisque c'est la technique à laquelle vous risquez le plus de vous retrouver confrontés.

Composition d'un spectromètre d'émission

Schéma général

Dans le cas de la spectroscopie d'émission atomique, la **source de rayonnement est constituée de l'échantillon, lui-même, sous forme d'atomes excités**. Le **but de l'excitation** est triple :

- **Vaporiser l'échantillon** (solide ou solution).
- **Atomiser la vapeur** (idéalement, la distribution des éléments doit, à ce stade, être liée de façon reproductible à leur distribution dans l'échantillon).
- **Exciter les atomes libres et les ions formés** pour les faire émettre un spectre électronique caractéristique.

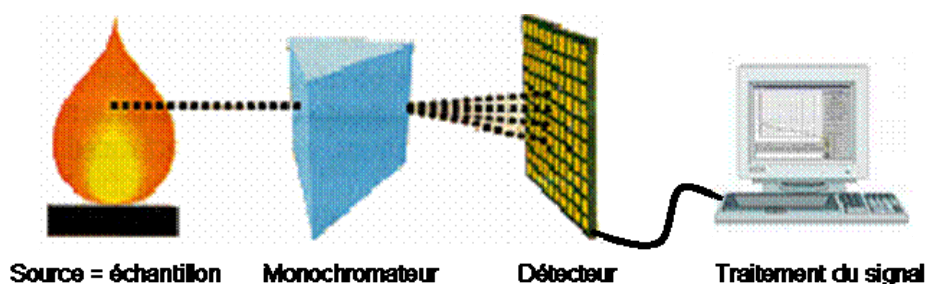


Figure 1.4. : Schéma général d'un spectromètre d'émission atomique : Une source-échantillon (ici, une flamme), un monochromateur (ici, un prisme), un détecteur (ici, un CCD) et un système de traitement du signal (ici, un ordinateur).

Comme nous l'avons déjà signalé brièvement, il existe plusieurs **techniques d'excitation**, que nous verrons un peu plus en détail dans la suite de ce cours. Quoiqu'il en soit, les **paramètres cruciaux** communs à toutes ces méthodes sont la **stabilité et la reproductibilité**, puisqu'ils représentent souvent la seule limite de précision de la méthode. Notons également, dès maintenant, que l'architecture même du système superpose au spectre de raies qui nous intéresse :

- o Un spectre continu provenant des électrodes chaudes dans le cas d'un arc ou d'une étincelle ou de la recombinaison ions-électrons dans le cas d'un plasma.
- o Un spectre de bandes provenant des espèces moléculaires éventuellement produites à haute température : par exemple, si on utilise un arc au graphite, on observe souvent des raies moléculaires C-C et C-N (air) ou des raies OH.

La spectroscopie d'émission atomique requiert ensuite la **dispersion du rayonnement polychromatique**, issu de la source-échantillon, en série de zones de faibles largeurs sur le plan des longueurs d'ondes (en raies). Pour ce faire, on utilise un **monochromateur**, dont nous parlerons plus en détail dans la suite de ce cours.

Une fois le rayonnement émis par l'échantillon décomposé en ses constituants, il est nécessaire de détecter ces derniers. Mises à part la détection visuelle et la détection

photographique, quasi abandonnées à cause de l'aspect subjectif de l'une et de l'incompatibilité pour l'analyse quantitative de routine de l'autre, il existe différents types de **détecteurs qui font appel à la conversion de l'énergie radiante en énergie électrique**, ce sont les détecteurs électriques. Nous verrons plus en détail le fonctionnement de quelques uns de ces détecteurs.

Finalement, le signal détecté doit être traité graphiquement « à la main » (ce qui devient de plus en plus rare) ou via un ordinateur.

Sources d'excitation

La flamme : Il s'agit d'un moyen d'excitation **purement thermique**. La solution contenant la substance à analyser est injectée directement dans la partie centrale de la flamme sous forme d'aérosol. La figure 1.5 représente une coupe longitudinale schématique d'un brûleur de Beckman, dans lequel le comburant (ici de l'oxygène) assure l'aspiration de la solution. Dans la flamme, la gouttelette de solution se vaporise et, de manière dépendante de la température de la flamme, un certain nombre d'atomes sont excités électroniquement par voie thermique.

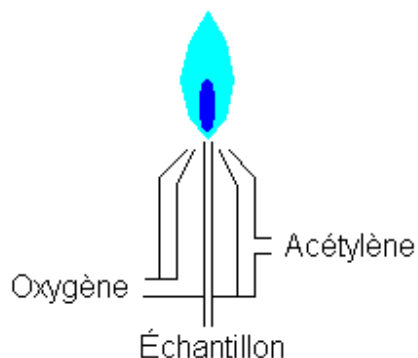


Figure 1.5. : Coupe longitudinale schématique d'un brûleur Beckman : L'échantillon, en solution, est aspiré dans la flamme par le comburant, ici de l'oxygène.

Sachant que la distribution d'énergie thermique répond à une distribution de Boltzmann (au comportement comparable à la distribution de Maxwell-Boltzmann vue dans la section consacrée à la cinétique des gaz), on se rend compte que **plus la température de la flamme est élevée, plus il y a aura d'atomes possédant une énergie suffisante pour provoquer une transition responsable d'une raie** et que donc **l'intensité** de cette dernière **sera plus importante**. Donc, plus la flamme est chaude, plus **on gagne en sensibilité**. En outre, des températures plus élevées permettent d'exciter des éléments de potentiel d'ionisation de plus en plus élevés. Ainsi, à 3000 °C, il est possible de détecter jusqu'à une soixantaine d'éléments.

Cela dit, c'est **principalement pour l'analyse des alcalins et des alcalino-terreux, facilement ionisables** (potentiels d'ionisation bas : 4 à 5 eV), que cette méthode est la plus

utilisée. Le tableau suivant reprend quelques exemples de comburants / carburants possibles, ainsi que la température de la flamme associée :

Combustible	Comburant	
	air	dioxygène
Gaz naturel	1850 °C	2800 °C
Butane	1900 °C	2900 °C
Hydrogène	2100 °C	2780 °C
Acétylène	2200 °C	3050 °C
Cyanogène		4550 °C
Acétylène + NO (% divers)		2600 à 2800 °C

L'arc et l'étincelle : Ces sources utilisent une **décharge disruptive de haute tension (étincelle) ou une décharge électrique continue (arc)** entre deux électrodes pour vaporiser et exciter les atomes à analyser. Les électrodes peuvent être en métal ou en graphite. Si l'échantillon à analyser est un métal, il peut d'ailleurs servir lui-même d'électrode. Les échantillons non-conducteurs sont placés dans l'électrode de graphite inférieure en forme de coupelle. Nous n'étudierons pas plus en détail ces méthodes d'excitation, puisqu'elles ont été remplacées dans de nombreuses applications par les plasmas ou les sources lasers et ne sont pratiquement plus utilisées que dans l'industrie des métaux.

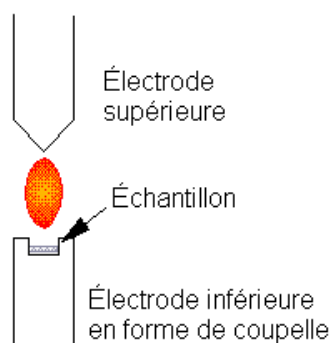


Figure 1.6. : Schéma d'une source à arc ou à étincelle : Dans le cas illustré, l'échantillon analysé n'est pas conducteur, il est donc placé dans une électrode de graphite qui possède une forme de coupelle.

Le Plasma Haute Fréquence à Couplage Inductif (Inductively Coupled Plasma, ICP) : Par définition, un **plasma** est un **mélange gazeux dans lequel une fraction importante des espèces présentes est sous forme d'ions**. En général, on utilise un plasma d'argon. Quand un échantillon est introduit dans ce milieu, l'atomisation se produit en raison de la température élevée (jusque 10 000 K). Les ions d'argon, une fois formés dans le plasma, sont capables d'absorber suffisamment d'énergie d'une source extérieure pour que se maintienne la température requise à la continuation du processus d'ionisation. **Quatre sources de puissance** ont été utilisées en spectroscopie au plasma d'argon :

- Une source de **courant continu** capable de maintenir une intensité de plusieurs ampères entre deux électrodes plongées dans un courant d'argon (on parle alors de DCP = Direct-Current Plasma, en anglais).
- Un **laser à CO_2 de haute puissance** (on parle alors de LIPS = Laser Induced Plasma Spectroscopy ou de LIBS = Laser Induced Breakdown Source).
- Un **générateur de micro-ondes**.
- Un **générateur de radiofréquence** (ICP en tant que tel).

Dans ces deux derniers systèmes, il y a **transformation de l'énergie magnétique en énergie thermique**. Lorsque la fréquence du champ magnétique est convenable, il y a couplage inductif, l'ionisation et la température du plasma s'accroissent notablement. Le système à radiofréquences étant l'une des sources les plus courantes en spectroscopie de plasma d'argon, nous nous y attarderons un peu plus.

La figure 1.7 donne le schéma d'une source ICP. Elle est constituée de trois tubes concentriques de quartz au travers desquels passe un flux d'argon. La partie supérieure des tubes est entourée d'un **enroulement inductif**, refroidi à l'eau, raccordé à un **générateur de hautes fréquences** qui produit une puissance réglable de l'ordre de 1 à 3 kW à 27 MHz. Tel quel, le système ne pourrait produire de plasma, même si le générateur HF fonctionne. Par contre, si **on ionise l'argon par une décharge de Tesla**, juste avant qu'il n'entre dans l'enroulement inductif, les ions et les électrons formés interagissent avec le champ magnétique oscillant. Cette interaction fait se mouvoir les ions et les électrons en des trajectoires circulaires. Ils sont freinés dans leur mouvement par **le gaz qui s'échauffe par effet Joule et s'ionise progressivement**. Le plasma ainsi formé s'entretient de lui-même. **La température du gaz atteignant 8 000 à 10 000 K**, une isolation thermique est requise entre les deux tubes de quartz les plus extérieurs. On obtient celle-ci par un flux d'argon introduit tangentielllement aux parois.

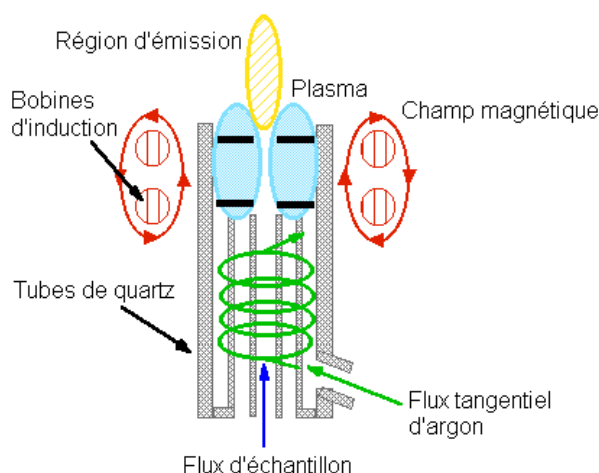


Figure 1.7. : Coupe longitudinale schématique d'une torche ICP.

L'injection de l'échantillon se fait sous forme d'aérosol par un flux d'argon grâce à un nébuliseur pneumatique ou à ultrasons. La forme toroïdale du plasma permet aux particules d'aérosol de passer en son centre, les exposant à une température très élevée pendant une période relativement longue (2,5 ms). Cette forme particulière du plasma n'est possible que grâce à la haute fréquence du générateur (à 5 MHz, le plasma a une forme plus sphérique). **Le cœur**, le plus chaud, a un aspect blanc intensément brillant et ne dépasse le tube d'induction que de quelques millimètres, **émettant un rayonnement quasi continu** dû à des recombinaisons ions-électrons. **A ce rayonnement se superpose le spectre atomique (raies) de l'argon.** Entre **10 et 30 mm au dessus de l'enroulement inductif**, le **rayonnement continu disparaît**, le plasma est optiquement transparent **et est en outre quasi exempt des raies de l'argon.** C'est souvent cette zone de température quasi uniforme, qui sert à l'analyse.

L'ICP représente donc une source d'excitation particulièrement intéressante :

- Les **temps de résidence élevés** et la **haute température** sont particulièrement favorables, ce qui se traduit par une augmentation importante de la sensibilité par rapport à la flamme.
- L'atomisation se fait en **atmosphère inerte** au sein du canal axial du plasma toroïdal de **température assez uniforme.**
- Moyennant régulation de l'alimentation en puissance de la source, la **stabilité** de l'émission permet d'atteindre une erreur relative de 0,5 à 1 % dans une grande zone de concentration.

Elle présente toutefois un **inconvenient majeur : le coût élevé** de ces instruments et de leur utilisation (argon).

Monochromateurs

Les monochromateurs pour l'UV, le visible et l'IR sont similaires sur le plan de la construction dans le sens qu'ils emploient les mêmes **éléments constitutifs** :

- **Une fente d'entrée**, s, pour donner au faisceau une forme et des dimensions bien définies.
- **Un collimateur d'entrée** C_1 de distance focale F_1 (lentille ou miroir) pour produire un faisceau parallèle de radiations.
- **Un disperseur** D (réseau ou prisme).
- **Un élément de focalisation** C_2 de distance focale F_2 (lentille ou miroir) qui forme l'image de la fente d'entrée sur une surface plane (plan focal PF).
- **Un plan focal** PF

Tous ces éléments sont centrés sur l'axe optique AO.

En outre, la plupart des monochromateurs ont des fenêtres d'entrée et de sortie destinées à protéger les composants contre la corrosion.

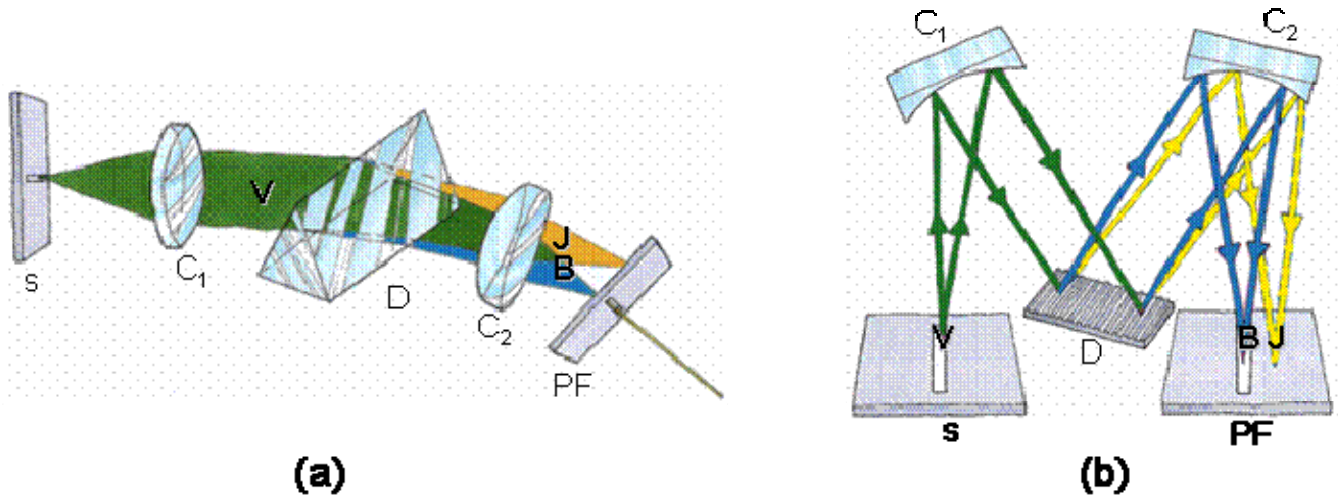


Figure 1.8. : Deux montages courants de monochromateurs :

- (a) : Un rayon lumineux vert (V) pénètre par la fente d'entrée (s) avant d'être redressé en un faisceau parallèle par la lentille de collimation (C_1). En passant dans le prisme (D), la lumière est dispersée en ses deux composantes jaune (J) et bleue (B). Finalement, la lentille de focalisation (C_2) « concentre » les rayons dispersés sur le plan de focalisation (PF). Ce type de monochromateur porte le nom de « montage à prisme de Bunsen ».
- (b) : Un rayon lumineux vert (V) pénètre par la fente d'entrée (s) avant d'être redressé en un faisceau parallèle par un miroir concave (C_1). En passant sur le réseau à réflexion (D), la lumière est dispersée en ses deux composantes jaune (J) et bleue (B). Finalement, un deuxième miroir concave (C_2) « concentre » les rayons dispersés sur le plan de focalisation (PF). Ce type de monochromateur porte le nom de « montage à réseau de Czerny-Turner ».

Détecteurs

Le **détecteur**, dans un spectromètre, **va** jouer le rôle qu'a la rétine dans l'œil, c'est-à-dire **convertir les impacts photoniques en impulsions électriques**, qui seront ensuite traitées. Il est donc logique que le premier détecteur utilisé ait été l'œil. Mais cette méthode, trop subjective a rapidement laissé la place à la détection par émulsions photographiques. Comme c'est le cas pour la photographie, la rapidité et la facilité, du traitement numérique, ont progressivement poussé les scientifiques à avoir recours à la détection électrique pour remplacer l'émulsion photographique. Les différents **détecteurs électriques** possèdent plusieurs paramètres caractéristiques qu'il convient de comparer pour déterminer quel type de détecteur convient le mieux à l'utilisation que l'on compte faire du spectromètre (ex. : analyse qualitative et / ou quantitative, mesures en routine et / ou épisodiques, analyse en

continu et / ou ponctuelles de phénomènes rapides et / ou lents, etc...). Le tableau suivant reprend ces différents paramètres, ainsi que leur définition :

Paramètre	Définition
Réponse spectrale	<i>Plage des longueurs d'ondes dans laquelle il y a une réponse du détecteur.</i>
Résolution	<i>Capacité du détecteur à discriminer deux points côte à côte comme étant séparés.</i>
Sensibilité	<i>Rapport entre le courant produit et la quantité de lumière reçue.</i>
Efficacité quantique	<i>Probabilité qu'un photon incident provoque « l'apparition » d'un électron.</i>
Ecart dynamique (linéarité)	<i>Rapport entre le signal le plus élevé et le plus faible qui peuvent être enregistrés linéairement.</i>
Rapport signal sur bruit	<i>Rapport entre la grandeur du signal et celle du bruit.</i>
Lag	<i>Quantité de signal restant dans le photoélément de la mesure précédente.</i>
Éblouissement	<i>Possibilité de « débordement » du signal d'une zone intensément illuminée vers les zones voisines.</i>

Barrettes de diodes (PDA = Photo Diode Array) : Ce détecteur est constitué d'une rangée de photodiodes individuelles. Les photodiodes, habituellement constituées d'une couche de semi-conducteur entre deux électrodes, **produisent un courant électrique fonction de la quantité de rayonnement lumineux** qu'elles reçoivent.

Capteur à transfert de charge (CCD = Charged Coupled Device) : Ce type de détecteur est en général constitué d'un **tableau de pixels** (consistant en une photodiode de silice), qui stockent les charges produites lorsqu'un photon les heurte. Au bout d'un temps déterminé, la **charge accumulée de chaque pixel est transférée de photodiode à photodiode** jusqu'à un registre avant d'être amplifiée et numérisée (AD = Analogic to digital).

Capteur à pixels actifs (APS = Active Pixel Sensor ou encore CMOS = Complementary Metal Oxide Semi-conductor) : Concurrent direct du CCD, il est lui aussi constitué d'un tableau de pixels qui comportent chacun un élément photosensible, un amplificateur et un convertisseur analogique – numérique. C'est en quelque sorte une **version « sur puce » des barrettes de diodes**.

Comparaison de trois détecteurs commerciaux de types différents :

Détecteur	TAOS 102	HAM 1024	Sony 2048
Type	<i>PDA</i>	<i>CMOS</i>	<i>CCD</i>
# pixels, pitch*	102, 85 μm	1024, 25 μm	2048, 14 μm
Sensibilité	100 $V.lx^{-1}.s^{-1}$	22 $V.lx^{-1}.s^{-1}$	160 $V.lx^{-1}.s^{-1}$
Signal / bruit	1000 : 1	2000 : 1	250 : 1
Plage de longueurs d'ondes	360 – 1100 nm	200 – 1000 nm	200 – 1000 nm

*pitch : distance entre deux pixels

Applications de la spectroscopie d'émission

Pour finir la partie de ce cours concernant la spectroscopie d'émission, nous citerons simplement quelques exemples d'applications (les valeurs numériques données dans ces exemples correspondent à l'utilisation d'un ICP-OES) :

- Détection de la présence de métaux lourds, et leur quantification, dans des échantillons d'eau. On peut typiquement détecter une trentaine d'éléments et les quantifier à des concentrations de l'ordre de 0,01 à 5 $\mu g.l^{-1}$.
- Détection d'éléments traces dans des métaux tels que l'or, le cobalt, le nickel ou le palladium (de l'ordre du $\mu g.kg^{-1}$).
- Détermination de la présence de plomb, chrome, cadmium et mercure dans des polymères.
- Analyse d'échantillons cliniques ou pharmaceutiques pour déterminer, par exemple, la quantité de sodium, potassium, magnésium, calcium, aluminium et chlore qu'ils contiennent.

Aspect pratique (absorption)

Bref historique

L'historique de la spectroscopie d'absorption atomique est lié aux observations du spectre solaire au début du 19^{ème} siècle. En 1802, Wollaston découvrit des raies « noires » dans le spectre brillant de la lumière solaire. Ce phénomène, étudié plus en détails par Fraunhofer (1814), fut partiellement interprété par Brewster (1832) et élucidé par Kirchhoff (1860) qui montra que les raies noires étaient dues à l'absorption par divers éléments (H, O, Ca, Na, etc.) présents dans l'atmosphère solaire. Avec Bunsen (1861), Kirchhoff jetait ainsi les bases d'une nouvelle méthode d'analyse chimique. Ils montrèrent notamment, par une expérience désormais classique (figure 1.9), que la raie jaune typique émise par le sodium dans une flamme était identique à la raie « noire » cataloguée D dans le spectre solaire. A la

suite de ses expériences, Kirchhoff émit la loi suivante, base de l'absorption atomique : ***tout corps chimique peut absorber certaines radiations qu'il émet lui-même.***

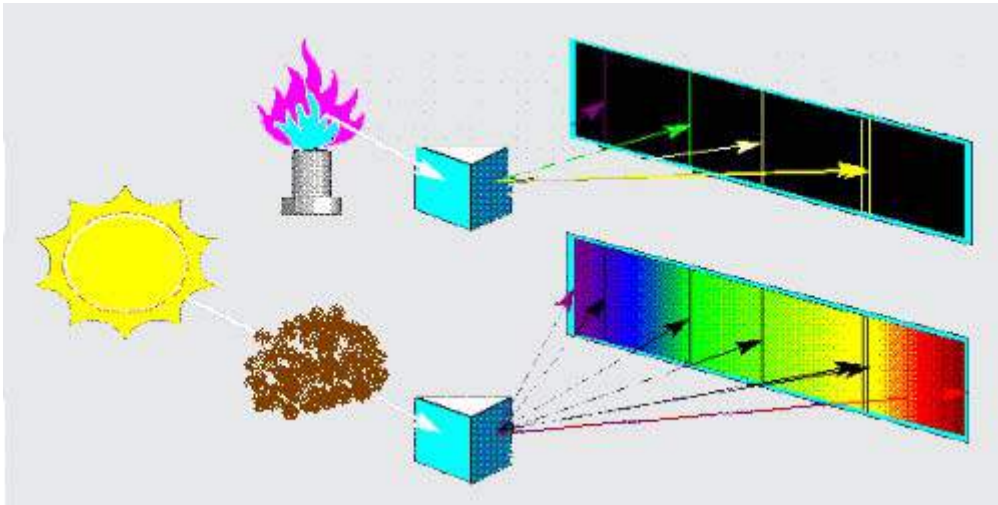


Figure 1.9. : Schéma de l'expérience de Kirchhoff et Bunsen : Le schéma du dessus représente la dispersion du rayonnement d'émission du sodium et celui du dessous, les raies « noires » (d'absorption) obtenues lors de la dispersion d'un rayonnement solaire après passage au travers d'un nuage de sodium. On voit que les raies d'émission correspondent bien aux raies d'absorption pour l'élément sodium.

Généralités

Nous savons qu'un atome excité thermiquement ou électriquement à un état E_2 émet une radiation de fréquence ν lorsqu'il revient à un état inférieur E_1 . C'est le phénomène d'émission que nous avons déjà amplement étudié et qui est régi par l'équation de Planck $h \cdot \nu = E_2 - E_1$. L'absorption atomique résulte du processus inverse, à savoir l'**absorption du photon $h \cdot \nu$** (de même énergie) **qui fait passer l'atome de l'état E_1 à l'état E_2 (d'énergie supérieure)**.

Ainsi, **l'intensité d'une onde lumineuse** de longueur d'onde λ (I^λ) **traversant un échantillon** homogène **s qui absorbe** à cette longueur d'onde, **diminuera progressivement pendant toute la durée de son trajet** à travers l'échantillon. Il a été déterminé qu'il existe une proportionnalité entre la fraction absorbée (dI / I) et l'épaisseur traversée dx , normale au trajet lumineux. De là, on peut déduire : $\frac{dI}{I} = -k_s^\lambda dx$. Dans cette relation, k_s^λ est une constante pour une longueur d'onde et un milieu donnés. L'intégration de cette équation pour un trajet allant de 0 à la longueur l de l'échantillon, ce qui correspond à la diminution de l'intensité lumineuse depuis I_0 (avant passage dans s) jusqu'à I (après

passage dans s), donne une équation appelée **loi de Lambert** : $\ln \frac{I_0^\lambda}{I^\lambda} = k_s^\lambda \cdot l$. Cette dernière relation s'écrit fréquemment en passant aux **logarithmes décimaux** et on appelle « **absorbance** », A_λ , le rapport $A_\lambda \equiv \log \frac{I_0^\lambda}{I^\lambda} = \frac{k_s^\lambda}{2,302} \cdot l \equiv \varepsilon_s^\lambda \cdot l$. Dans cette relation, ε_s^λ est appelé **coefficient d'absorption** à la longueur d'onde λ du milieu s. Il arrive également que l'on parle de transmission au lieu d'absorbance, pour désigner, cette fois, le pourcentage de lumière transmise, soit $T_\lambda \% \equiv \frac{I^\lambda}{I_0^\lambda} \times 100$ et on a ainsi : $A = \log \frac{100}{T}$.

Notons que toutes ces considérations sont valables non seulement pour l'absorption atomique, mais également pour l'absorption moléculaire (spectroscopie UV-Vis) que nous allons étudier plus en détail dans une section ultérieure. Sachant cela, nous pouvons poursuivre notre raisonnement au cas d'une solution assez diluée pour laquelle l'absorbance du soluté (1) est donnée par la relation :

$$\boxed{A = \varepsilon_1^\lambda \cdot C_1 \cdot l} \text{ loi de Beer-Lambert}$$

Les unités les plus courantes sont la mole par litre pour la concentration (C en mol.l^{-1}) le centimètre pour la longueur (l en cm) et, dès lors, le coefficient d'absorption molaire est exprimé en litre par centimètre par mole (ε en $\text{l.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$) puisque ***l'absorbance n'a pas d'unité***. Il est important de garder à l'esprit que ***des écarts par rapport à la loi de Beer-Lambert peuvent exister***. Ces déviations peuvent avoir **deux origines** :

- **Chimique ou physico-chimique (seulement dans le cas de la spectroscopie moléculaire)** : Si la concentration en soluté est trop élevée, il peut apparaître des interactions entre ses molécules, ainsi qu'une modification de l'indice de réfraction de la solution, ce qui peut faire varier le coefficient d'absorption molaire.
- **Instrumentale** :
 - o Si la **lumière incidente n'est pas suffisamment monochromatique**, c'est-à-dire si la largeur de la bande spectrale incidente n'est pas suffisamment petite vis-à-vis de la largeur de la bande spectrale d'absorption, l'absorbance n'est plus une fonction linéaire de la concentration.
 - o Le rayonnement sortant d'un monochromateur peut être contaminé par de la **lumière diffuse** (provenant de diffusions et de réflexions dans le montage),

engendrant le même genre de problème que la polychromaticité de la lumière incidente.

- o La **non linéarité du détecteur** peut également causer un écart apparent à la loi de Beer-Lambert.

Composition d'un spectromètre d'absorption atomique

Schéma général

La figure 1.10 représente le schéma d'un spectromètre d'absorption atomique :

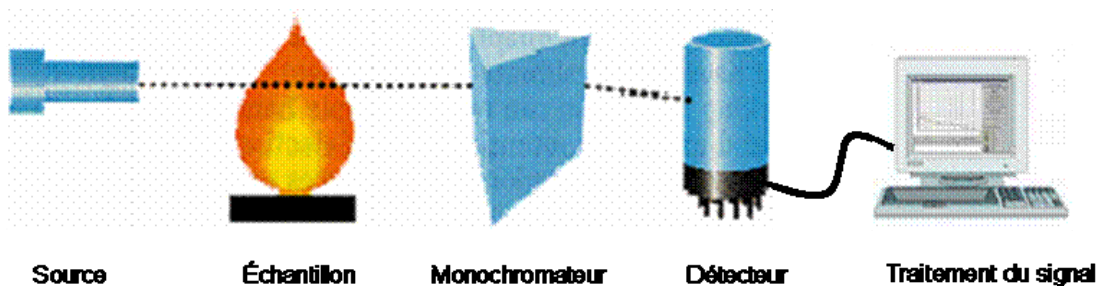


Figure 1.10. : Schéma général d'un spectromètre d'absorption atomique : Une source de rayonnement (ici, une lampe), un échantillon (ici, l'atomiseur est une flamme), un monochromateur (ici, un prisme), un détecteur (ici, une photodiode) et un système de traitement du signal (ici, un ordinateur).

Les différents éléments constitutifs en sont :

- **Une source** émettant le spectre de raies de l'élément à doser.
- **Un atomiseur** qui transforme l'échantillon (solution) à analyser en une population d'atomes.
- **Un monochromateur** qui isole la raie de résonance en éliminant les autres raies de la source et autant que possible, l'émission propre de la flamme.
- **Un photomètre** à détection photoélectrique qui mesure l'intensité de la raie de résonance en présence et en l'absence de la population d'atomes absorbants dans la flamme.

La précision des mesures, dans ce type de système à simple faisceau, est **tributaire de la stabilité de l'ensemble** et de l'atomiseur en particulier, en fonction du temps. Il n'est possible d'**éliminer ce problème** qu'en ayant recours au **système à double faisceau**.

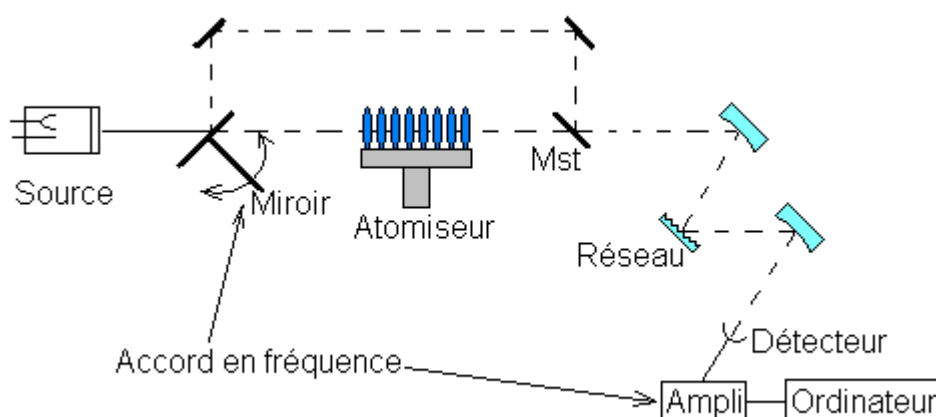


Figure 1.11. : Schéma d'un spectrophotomètre d'absorption atomique à double faisceau : Un miroir rotatif permet à la fois de hacher la lumière (ce qui permet de diminuer l'influence de l'émission d'excitation de l'élément analysé, dans la flamme) et de la faire passer alternativement dans l'atomiseur et dans le faisceau de référence. Les deux faisceaux sont alors recombinés géométriquement par un miroir semi-transparent (Mst) situé derrière l'atomiseur.

Sources

Les **qualités essentielles d'une source** utilisable en spectroscopie optique sont : une **stabilité** et une **puissance suffisantes**. La puissance lumineuse d'une source varie de manière exponentielle avec la puissance électrique du générateur. La stabilité est donc assurée par la régulation de la puissance électrique.

Lampes à cathode creuse : De tels systèmes produisent des spectres de raies caractéristiques d'un grand nombre d'éléments. La figure 1.12 en donne un schéma. La **cathode est construite au moyen du métal dont on désire mesurer le spectre ou est recouverte d'une couche de ce métal**. Ces lampes sont donc **spécifiques**. On construit cependant des lampes multi-élémentaires dans lesquelles la cathode est recouverte d'un mélange des éléments à analyser. Un potentiel appliqué entre les électrodes provoque l'ionisation du gaz et on obtient un courant de 5 à 10 mA par migration des ions aux électrodes. Si le potentiel est suffisant, les cations en heurtant la cathode lui arrachent des atomes de sa surface, ce qui produit un nuage atomique (processus de pulvérisation). Une partie de ces atomes est dans un état excité, ils retournent vers l'état fondamental par émission de radiations caractéristiques. La conformation cylindrique de la cathode favorise la concentration du rayonnement en une région limitée du tube. Elle augmente aussi la redéposition, sur la cathode, des atomes de métal plutôt que sur les parois du tube.

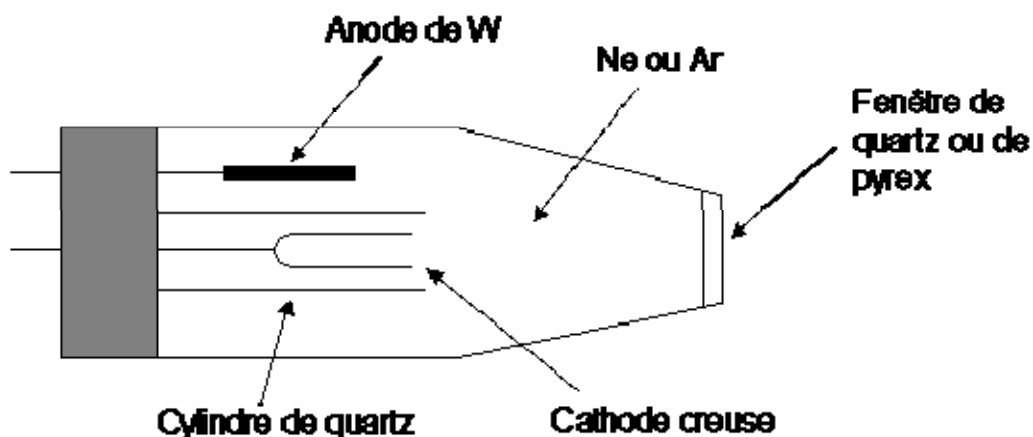


Figure 1.12. : Schéma d'une lampe à cathode creuse : La cathode creuse est fabriquée au moyen du métal dont on désire mesurer le spectre ou est recouverte d'une couche de ce métal ou d'un mélange de métaux.

Atomiseurs

Le rôle de l'atomiseur est de ***réaliser une population d'atomes représentative de la composition de l'échantillon en solution.***

Atomiseurs à flamme : Nous n'entrerons pas ici dans les processus qui se produisent dans le système nébuliseur-brûleur, ni des exigences de stabilité de fonctionnement, ces deux points ayant déjà été abordés lors de l'étude de l'émission dans la flamme. Dans le cas présent, la flamme doit être suffisamment chaude pour obtenir une atomisation maximale ; elle ne peut également être trop chaude car on veut éviter au maximum les phénomènes d'excitation et d'ionisation. Nous avons vu, cependant, que même à 3000-4000 K, la proportion d'atomes excités est faible, sauf pour les éléments à très bas potentiel d'ionisation. ***La population est donc essentiellement constituée, en général, d'atomes neutres non excités.*** Il y a par ailleurs moyen de pallier aux inconvénients dus à l'émission de flamme par « hachage » du faisceau incident, mais nous n'entrerons pas dans les détails de ce procédé.

Le problème de formation d'oxydes représente un autre problème technique à contourner. On le minimise soit en augmentant la température de la flamme, soit en utilisant un mélange gazeux plus riche en combustible. Les flammes les plus courantes sont : Air – propane $\approx 1950\text{ }^{\circ}\text{C}$, air – acétylène $\approx 2200\text{ }^{\circ}\text{C}$ et N_2O – acétylène $\approx 2950\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Fréquemment, on utilise des brûleurs allongés d'un ***trajet optique atteignant 10 cm***, ce qui augmente la sensibilité, et la nébulisation est produite par ultrasons, technique qui fournit des gouttelettes de volume plus uniforme que par simple aspiration.

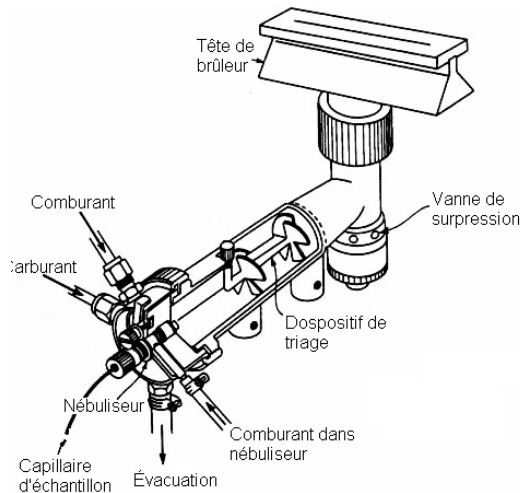


Figure 1.13. : Schéma d'un brûleur de spectromètre d'absorption atomique : Notons spécifiquement le nébuliseur, qui assure l'aspiration et la pulvérisation de l'échantillon dans la chambre de mélange des gaz. Les gouttelettes qui seraient trop grosses pour assurer une bonne atomisation dans la flamme sont précipitées par le dispositif de triage, avant de s'écouler vers l'évacuation.

Atomiseurs sans flamme – fours en graphite : Le système le plus utilisé est le four tubulaire de Massmann (Figure 4.16). Le **chauffage est réalisé par effet Joule** dans le tube graphite lui-même. On introduit un petit volume de solution (5 – 10 µl) dans un tube par l'orifice (a) du tube de graphite. En général, on a à sa disposition la sélection d'un programme automatique qui assure les meilleures performances dans chaque cas particulier. Par exemple : séchage 15'' à 100 °C, minéralisation 60'' à 400 °C, atomisation 10'' à 2100 °C (mesure de l'absorbance), nettoyage de four 5'' à 2600 °C. **La limite de détection peut être 1000 fois plus basse avec le four de Massmann qu'avec une flamme.** La cadence d'analyse est cependant plus faible qu'avec une flamme.

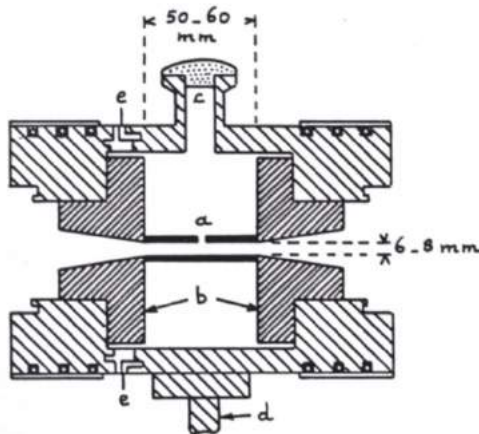


Figure 1.14. : Schéma d'un four en graphite de type Massmann :

- a) Orifice du tube de graphite
- b) Cône en graphite
- c) Ouverture d'introduction de l'échantillon
- d) Support
- e) Isolant

Monochromateurs

Cfr. spectromètre d'émission atomique, avec une prédominance des systèmes à réseau.

Détecteurs

Cfr. spectromètre d'émission atomique.

Avantages et inconvénients de la spectroscopie d'absorption atomique

En dépit de la nécessaire mise en solution des échantillons, qui peut être lente et délicate, on peut citer au crédit de l'absorption atomique :

- **Rapidité des mesures**
- **Spécificité spectrale**
- **Bonne précision relative**
- **Excellente limite de détection** pour un grand nombre d'éléments. A ce niveau, d'ailleurs, l'expérience montre que l'émission et l'absorption atomiques sont deux techniques complémentaires.

Par contre, la nature même de la source (majoritairement des lampes à cathode creuse) **proscrit l'analyse multiélémentaire simultanée**. Il s'agit donc d'une **analyse séquentielle**. Nous l'avons signalé, le commerce fournit des lampes multiélémentaires, mais, en général, leur rapport signal / bruit est plus faible que celui des lampes monoélémentaires. En outre, le risque d'interférence augmente avec le nombre d'éléments. Les lampes multiélémentaires peuvent cependant être utiles en analyse de routine.

Applications de la spectroscopie d'absorption atomique

Elles touchent de nombreuses disciplines et sont souvent comparables aux applications de l'émission atomique. En voici quelques unes :

- Analyse clinique : analyse de métaux dans les fluides biologiques comme le sang et l'urine.
- Analyse environnementale : détermination de la quantité de certains éléments dans l'eau des rivières, de la mer, de l'eau potable et dans le pétrole.
- Industrie pharmaceutique : L'utilisation courante de catalyseurs (métalliques) dans la synthèse de médicaments, nécessite la vérification de l'absence de traces de ce dernier dans les produits finis.
- Industrie minière : En déterminant la quantité d'un élément déterminé dans des échantillons de minerais, il est possible d'évaluer la rentabilité de l'exploitation de ces minerais.
- Médecine légale : Dosage de substances toxiques (ex. : arsenic) dans des tissus (cheveux, ongles, etc.)
- Alimentation et cosmétique : Dosage de substances toxiques.

1.3. Spectrométrie UV – Vis

Aspect théorique

Ce type de spectrométrie repose *principalement*, pour les **molécules organiques**, sur des interactions entre les rayonnements électromagnétiques et les électrons des **orbitales moléculaires**, et plus spécifiquement des **électrons π** et des **paires libres**. On appelle alors « chromophore » les groupes fonctionnels insaturés porteurs de tels électrons.

C'est une spectrométrie basée sur l'absorption du rayonnement électromagnétique et les spectres UV-vis seront en général représentés en Absorbance en fonction de la longueur d'onde (A vs λ).

Dans la majeure partie des cas, les **spectres** UV-visibles sont **continus** et constitués de **bandes larges** (exception faite des spectres de lanthanides et actinides) qui correspondent à la **superposition de transitions électroniques** (fortement énergétiques), **vibrationnelles** (faiblement énergétiques) **et** de transitions **rotationnelles** (très faiblement énergétiques). Ces spectres **présentent un ou plusieurs maximum(s)** d'absorbance, auquel correspond une longueur d'onde notée λ_{max} , qui sera, dans le cas des molécules organiques, plus ou moins **caractéristique d'un certain motif de délocalisation des électrons**.

Cela dit, les spectres UV-vis n'étant pas fins, de sorte que plusieurs molécules peuvent présenter le même spectre, ils ne **servent en général pas à une identification** des structures, **mais** se révèlent très pratiques au niveau des **dosages**.

En effet, l'absorbance UV-vis, dans certaines conditions, est fonction de la concentration suivant la **loi de Beer-Lambert** : $A = \varepsilon l C$ (où ε est le coefficient d'extinction à une longueur d'onde donnée, pour une famille de composés donnée ; l est le trajet optique et C est la concentration de la solution étudiée). Notons que ε est de l'ordre de 10 à $100 \text{ l cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ pour les transitions $n \rightarrow \pi^*$ et de 10^3 à $10^4 \text{ l cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ pour les transitions $\pi \rightarrow \pi^*$. En pratique, donc, le **spectre UV-vis est surtout représentatif des transitions $\pi \rightarrow \pi^*$** .

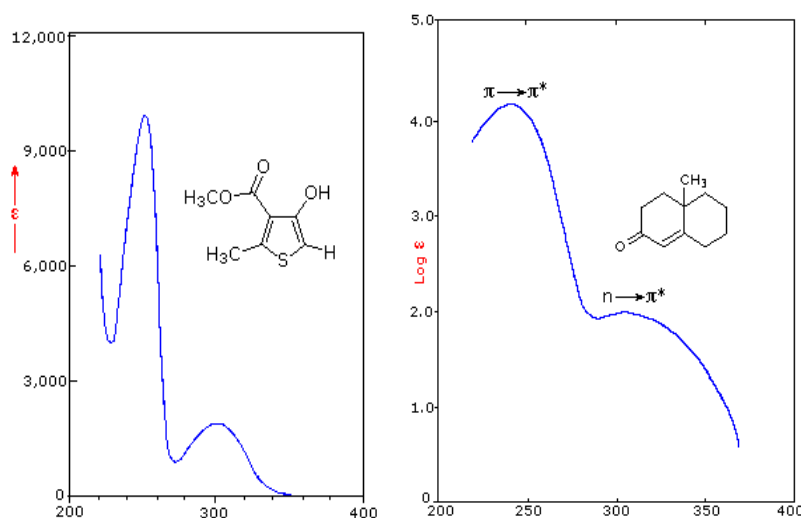
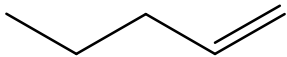
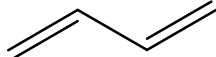


Figure 1.15. : Deux exemples de spectres moléculaires : Notons que ces spectres sont continus et que les bandes sont relativement larges. A noter également, sur le spectre de droite, les bandes correspondant aux transitions $n \rightarrow \pi^*$ et $\pi \rightarrow \pi^*$.

Qu'est-ce qui, dans la structure d'une molécule organique, va influencer la valeur de $I_{\max}$?

Influence de la délocalisation

Supposons les molécules suivantes à concentrations égales dans une solution :

Molécule			
Types de liaisons	1 C=C	2 C=C non conjuguées	2 C=C conjuguées
ϵ ($l\ cm^{-1}\ mol^{-1}$)	10 000	20 000	21 000
$\lambda_{\max}$ (nm)	184	185	217

On peut constater que la délocalisation a deux effets :

- **Effet hyperchromique** : Alors que pour des liaisons non conjuguées, la valeur du coefficient d'extinction est simplement proportionnel au nombre de liaisons doubles, pour des liaisons conjuguées, on observe une augmentation importante d' ϵ .
- **Effet bathochromique** (red shift) : La délocalisation déplace le maximum d'absorbance vers des longueurs d'onde plus élevées.

En résumé, plus la délocalisation sera importante, plus ϵ et $\lambda_{\max}$ seront importants.

(Illustration en classe figure 1.16)

Influence du solvant

L'augmentation de la polarité du solvant s'accompagne, en général, d'un **effet bathochromique** pour les transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ et d'un **effet hypsochromique** (blue shift = déplacement vers des longueurs d'ondes plus faibles) pour les transitions $n \rightarrow \pi^*$.

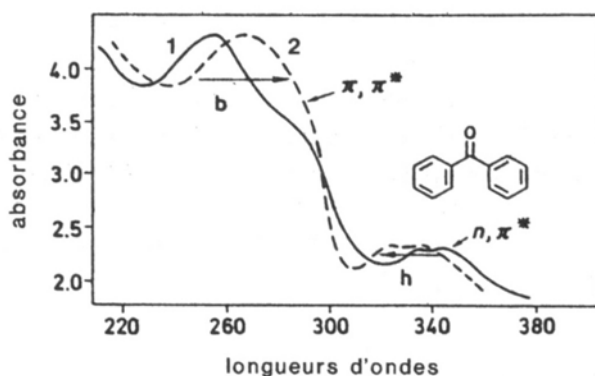


Figure 1.17. : Effet du solvant sur le spectre moléculaire de la benzophénone :
La courbe 2 discontinue correspond au spectre pris dans un solvant plus polaire. Effet bathochromique (red shift) pour les transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ et effet hypsochromique (blue shift) pour les transitions $n \rightarrow \pi^*$.

Influence des auxochromes

Un auxochrome est un **substituant** présent **sur le chromophore**, **qui n'absorbe pas**, lui-même, à une longueur d'onde supérieur à 200 nm, **mais** qui **modifie** tout de même **le spectre d'absorption**. Ce type de groupement **possède en général une paire libre** d'électrons qui va pouvoir se délocaliser sur l'ensemble des doubles liaisons conjuguées et avoir un **effet bathochromique** et parfois, **hyperchromique**. Si on prend l'exemple du thiophénol, par rapport au benzène, on observe des effets bathochromique et hyperchromiques importants, alors que le groupement –SH, en lui-même, n'absorbe pas à une longueur d'onde supérieure à 200 nm. Notons également que c'est la présence d'un ou plusieurs auxochromes qui explique la variation de couleur des indicateurs pH en fonction de ce dernier (comme on peut le voir dans une moindre mesure avec les exemples du phénol et de l'aniline).

Molécule	λ_{max} (nm)	ϵ_{max} (l mol⁻¹ cm⁻¹)
Benzène	204	7 900
Thiophénol	236	10 000
Phénol	211	-
Phénolate	235	-
Aniline	230	-
Ion anilinium	203	-

Règles de Woodward-Fieser

L'analyse structurale à partir des spectres électroniques est assez aléatoire, dans la mesure où leur relative simplicité a pour corollaire un faible apport d'informations. Dans les années 40, cependant, avant l'arrivée des techniques plus puissantes d'identification dont nous disposons à présent, la spectrométrie UV-Vis a été utilisée à cette fin. L'étude des spectres d'un grand nombre de molécules a permis d'établir des corrélations entre structures et maxima d'absorption. Les plus connues sont les règles empiriques dues à Woodward, Fieser et Scott, qui concernent les diènes et composés carbonyles insaturés. A partir de tableaux rassemblant, sous forme d'incrément, les divers facteurs et particularités de structure à prendre en compte, on peut prévoir la position de bandes d'absorption $\pi \rightarrow \pi^*$ de ces systèmes conjugués particuliers.

(Tables + exercices en classe)

Aspect pratique

Composition d'un spectromètre d'absorption moléculaire

Schéma général

Le schéma général d'un spectromètre d'absorption moléculaire (figure 1.18) reprend globalement les mêmes éléments qu'un spectromètre d'absorption atomique, si ce n'est que la **sélection de la longueur d'onde se fait ici en amont de l'échantillon**.

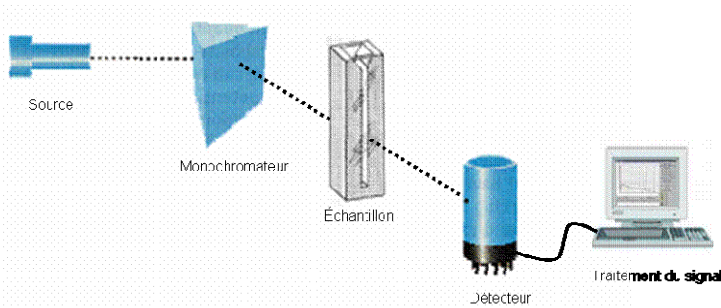


Figure 1.18. : Schéma général d'un spectromètre d'absorption moléculaire : Une source de rayonnement (ici, une lampe), un monochromateur (ici, un prisme), un échantillon (ici, une solution dans une cuvette), un détecteur (ici, une photodiode) et un système de traitement du signal (ici, un ordinateur).

Sources

Pour la spectroscopie d'absorption UV-Vis, on utilise des sources fournissant un **spectre continu aussi intense que possible**.

Lampes à hydrogène ou à deutérium : On obtient un spectre continu dans l'UV par **décharge électrique dans le gaz à basse pression**. La décharge produit une molécule excitée d'énergie quantifiée E_{H_2} qui se dissocie en deux atomes animés d'énergie cinétique E_{CH1} et E_{CH2} . Le phénomène est accompagné de l'émission d'un photon $h\nu$ dans l'UV. On a donc $E_{H_2} = E_{CH1} + E_{CH2} + h\nu$. Comme la somme des énergies cinétiques peut varier de 0 à E_{H_2} et ce, de manière continue, l'énergie des photons varie aussi de façon continue. On obtient ainsi, en pratique, une **source continue utilisable entre 160 et 375 nm**. En conséquence, les fenêtres du tube à décharge doivent être constituées de **quartz, transparent dans cette zone**. On peut provoquer l'excitation de différentes façons :

- Soit par **décharge entre deux électrodes** d'aluminium entre lesquelles une différence de potentiel de 2000 à 6000 V est appliquée ; un refroidissement par eau est requis aux puissances élevées.
- Soit par **formation d'un arc** entre un filament recouvert d'oxyde et chauffé par effet Joule, et une électrode métallique placée à un potentiel de +40 V, par exemple, par rapport au filament.

Lampes à filament de tungstène : C'est certainement la source la plus utilisée dans le visible et l'IR. La **distribution énergétique est grosso modo, celle d'un corps noir** (que vous

avez peut-être étudié dans votre cours de physique). Rappelons-en les caractéristiques : le **maximum d'émission se fait à une longueur d'onde qui varie par l'inverse de la température**. La température normale d'un filament de tungstène est de 2870 K. A cette température, la plus grande partie de l'énergie est émise dans l'IR Cette source est utile pour la **zone comprise entre 320 et 2500 nm**. Notons qu'à présent, il n'est pratiquement plus fait usage que de lampes dites « halogènes ». Ces dernières nécessitent une température élevée pour bien fonctionner, l'enveloppe de ces lampes est donc constituée de quartz, ou de verre spécial, plus résistants. **La présence de l'halogène permet d'augmenter la durée de vie de la lampe** en s'additionnant au tungstène sublimé, dans la partie « froide » de l'ampoule, pour le redéposer dans la partie chaude, c'est-à-dire sur le filament lui-même (figure 1.19). Cela dit, le filament n'a pas pour autant une durée de vie infinie, les atomes se redéposant rarement là d'où ils sont partis, des zones fragilisées se créent donc au cours du temps.

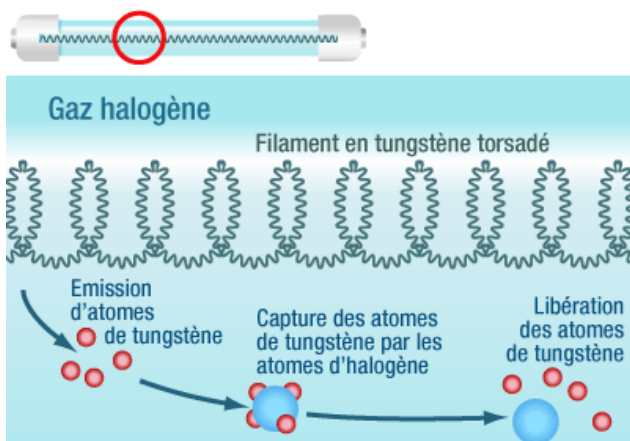


Figure 1.19. : Schéma de fonctionnement d'une lampe « halogène » : Lorsqu'il est porté à incandescence, des atomes de tungstène se libèrent du filament. Arrivés à la paroi de l'ampoule, plus froide, ces atomes sont « capturés » par les atomes d'halogène, qui circulent dans l'ampoule. Quand cet assemblage arrive à nouveau à proximité du filament, il se casse et libère les atomes de tungstène qui se redéposent sur le filament.

Lampe à arc au xénon : L'émission est produite par **décharge dans le gaz**. Le spectre est **continu entre 250 et 600 nm** avec un maximum à 500 nm. On peut obtenir des intensités très élevées. Dans certains cas, la décharge est intermittente grâce à l'interposition d'une capacité.

Monochromateurs

Cfr. spectromètre d'émission atomique.

Échantillons

Le plus fréquemment, il s'agit de **substances en solution**. En général, on utilise des récipients (cellules) d'**épaisseur fixe et calibrée**. En effet, pour les travaux quantitatifs, la

longueur de trajet à travers la cellule (l) doit être connue avec précision ($10,00 \pm 0,01$ mm) pour **pouvoir déterminer des concentrations via la loi de Beer-Lambert**. Des cellules de 0,5 à 50 mm de trajet optique sont d'utilisation courante. On utilise aussi des cellules d'épaisseur variable à vis micrométrique.

En tout état de cause, comme les faces du monochromateur, les cellules doivent être faites d'un **matériau transparent à la longueur d'onde à utiliser** (UV = quartz, visible = verre ou plastic). Leurs faces doivent être optiquement planes.

Dans le même ordre d'idée, deux critères importants sont à considérer lorsqu'on choisit le **solvant de l'échantillon** :

- **Transparence** : dans le domaine spectral intéressant pour l'absorption du soluté.
- **Interactions éventuelles solvant-soluté** : un solvant polaire, comme l'eau, les alcools, etc. peut modifier fortement le spectre d'absorption d'un soluté par **effets bathochromique et hypsochromique**, comme nous l'avons vu. En général, une substance dissoute dans l'hexane donne un spectre se rapprochant plus de celui de la vapeur (structure fine) que le spectre obtenu dans un solvant polaire. D'autre part la **variation du pH** des solutions aqueuses ou hydroalcooliques peut conduire à l'apparition d'**espèces ioniques ou moléculaires distinctes dont le spectre d'absorption est différent**. C'est le cas notamment des indicateurs colorés dont la forme acide HIn et basique In^- ont des couleurs différentes. En fait, la proportion de chacune des formes en fonction du pH, peut être déterminée par mesure de l'absorbance au maximum de chaque bande caractéristique et débouche sur la valeur de pK de l'indicateur.

Détecteurs

Photomultiplicateur : Outre les détecteurs de type photodiode ou CCD, que nous avons déjà décrits précédemment, les spectromètres d'absorption moléculaire utilisent parfois des photomultiplicateurs. Ce dernier joint à **l'émission électronique de la photocathode**, sous l'impact d'un photon, un **processus d'amplification par une émission d'électrons secondaires par des dynodes successives** placées à des potentiels positifs de l'ordre de 100 V l'une par rapport à l'autre. Ces dynodes, ou anodes secondaires, sont recouvertes d'un dépôt de nature voisine à celle de la photocathode, mais mieux adapté à l'émission secondaire d'électrons sous l'impact d'électrons incidents. Chaque photoélectron expulsé de la photocathode est accéléré et focalisé sur la dynode d_1 et de celle-ci, s'en expulsent en moyenne 2 à 6 électrons qui viennent frapper d_2 et ainsi de suite. Après la dernière dynode, les électrons sont collectés sur

l'anode. Un photomultiplicateur de 9 dynodes fournit une amplification supérieure à 10^6 par rapport au courant photocathodique.

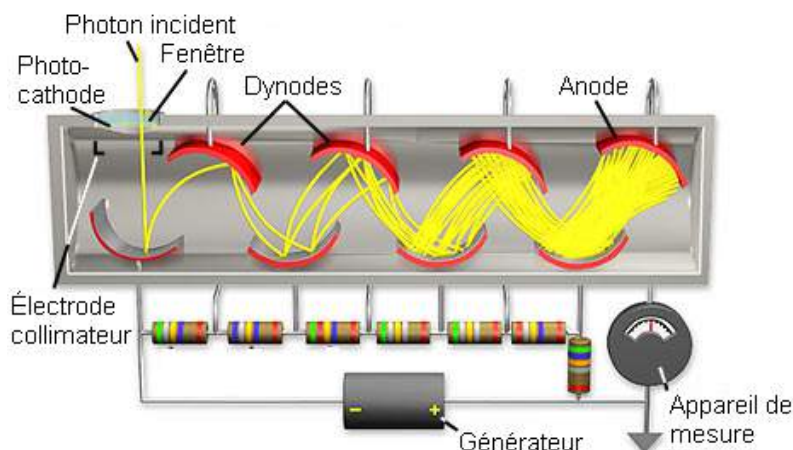


Figure 1.20. : Schéma de la coupe d'un photomultiplicateur : Un photon incident éjecte un électron de la photocathode. L'électron est ensuite dirigé vers la première dynode par une électrode collimatrice. La dynode étant à un potentiel positif de 100 V, l'électron est accéléré et son impact produit l'éjection de 2 (ou plus) électrons. Ce processus se répétant à chaque dynode, le signal s'en trouve amplifié.

Champs d'application de la spectroscopie UV-vis.

- Analyse quantitative de substances simples absorbantes (dosage directe) :
 - o Composés **organiques insaturés** ($e^- \pi$ et n)
 - Composés aromatiques dans l'eau (tyrosine, acide benzoïque, etc.)
 - Composés polyéniques naturels (vitamine A, carotène, etc.)
 - Composés contenant des chromophores conjugués tels que C=O et C=N (chlorophylle, hémoglobine, stérols, etc.)
 - Dérivés aromatiques substitués (polluants tels que la dioxine, pesticides tel que DDT, etc.)
 - o Les **métaux de transition** (e^- O.A. d)

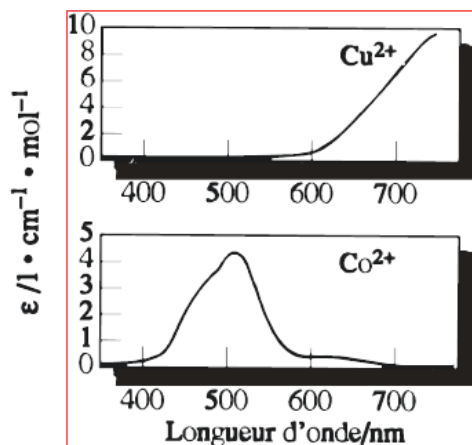


Figure 1.21. : Spectres UV de deux métaux de transition : En haut, une solution de Cu^{2+} et en bas, une solution de Co^{2+} .

o Les **lanthanides et les actinides**

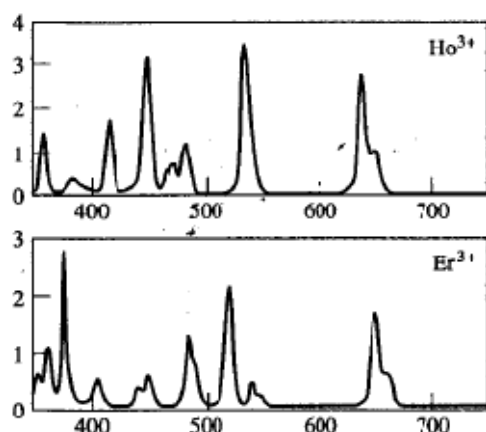


Figure 1.21. : Spectres UV de deux **lanthanides** : En haut, une solution de Ho^{3+} (Holmium) et en bas, une solution de Er^{3+} (Erbium).

- o Certains **composés inorganiques**, dont des complexes.
- Analyse quantitative de substances simples non absorbantes (**dosage indirecte**) :
 - o Formation d'un **complexe coloré** (ex. : dosage du Fe^{2+} avec l'orthophénantroline).
 - o **Réaction** transformant la substance à doser en une substance « colorée » (ex. oxydation de Mn^{2+} en MnO_4^- pour le dosage du manganèse dans le ciment).
- Analyse quantitative de **mélanges** (ex. Dosage simultané du chrome et du manganèse dans un alliage, cfr. chimie analytique 2BBM)
- **Détermination de constantes** de formation de complexes, de constantes de dissociations d'acides, etc.
- **Titration photométrique**.

Analyse quantitative

La spectrophotométrie présente de nombreux avantages dans le cadre des dosages :

- Bonne **précision** (de l'ordre de 0,2 à 0,5 % relatif).
- Bonne **sensibilité** (typiquement de 10^{-4} à 10^{-5} M et jusque 10^{-7} M dans les cas les plus favorables).
- Moyenne à grande **sélectivité** (en choisissant judicieusement la longueur d'onde à laquelle on effectue l'analyse).
- **Facilité de mise en œuvre et coût réduit**.
- **Large domaine d'application**

Rien d'étonnant dès lors que l'utilisation de l'UV-vis comme moyen de dosage représente 95 % des analyses quantitatives dans le domaine de la santé.

Bases de l'analyse quantitative

L'analyse quantitative par spectrophotométrie UV-vis repose sur le respect de la loi de **Beer-Lambert**. Il est dès lors important de se rendre compte que cette loi n'est **valable** que sous certaines conditions :

- Le **faisceau** lumineux source doit être bien **monochromatique** (puisque le coefficient d'extinction est fonction de la longueur d'onde).
- La **concentration** doit se situer **dans le domaine dynamique** (c'est-à-dire qu'elle doit se situer au-delà de la limite de mesure quantitative et rester dans le domaine de réponse linéaire).

LRL: limite du domaine de réponse linéaire

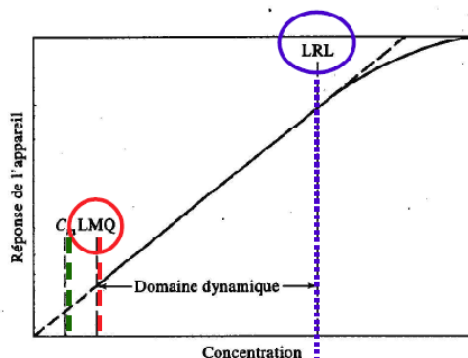


Figure 1.22. : Courbe réponse vs concentration d'un détecteur UV : Ce schéma illustre les différents paramètres importants sur ce type de courbe :

- Cm : la concentration en dessous de laquelle la substance ne peut être objectivement détectée.
- LMQ : la concentration en dessous de laquelle une quantification de la substance ne peut être précisément réalisée.
- LRL : la concentration au-delà de laquelle la réponse n'est plus directement proportionnelle à la concentration.

LMQ: Limite de mesure quantitative

$$\text{LMQ} = 10 \times S_{\text{blanc}}$$

Cm: Limite de détection $C_m = 3 \times S_{\text{blanc}}$

- La **solution** doit être **suffisamment diluée** ($C^\circ < 10^{-2} \text{M}$), sinon l'influence des molécules les unes sur les autres provoque une modification du spectre.

Il convient également de se rappeler à tout moment que l'absorbance est influencée par plusieurs paramètres, tels que :

- La **nature du solvant** (ex. : effet bathochromique et hypsochromique en fonction de la polarité).
- De la **température**.
- Du **pH** (ex. : phénol-phénolate)
- De **substances interférentes**.

La plupart de ces observations résultent du fait que le **coefficient d'extinction** est **fonction de** :

- La **structure** de la substance absorbante (cfr. exercices sur Woodward-Fieser)
- Le **solvant**

- La **longueur d'onde** du rayonnement incident

Méthodes d'analyse spectrophotométrique

Il existe plusieurs procédés pour déterminer une concentration par dosage UV-vis.

Méthode de l'étalon externe : On compare l'absorbance (A_S) d'une solution de concentration connue (C_S) à l'absorbance (A_X) d'une solution de concentration inconnue (C_X). La loi de Beer-Lambert indique que :

$$A_S = \epsilon l C_S \text{ et } A_X = \epsilon l C_X \text{ d'où } \frac{A_X}{A_S} = \frac{\epsilon l C_X}{\epsilon l C_S} \Leftrightarrow C_X = \frac{A_X C_S}{A_S}$$

Méthode de l'étalon interne (ou méthode de l'ajout dosé) : Le principe consiste à mesurer l'absorbance A_X de la solution de concentration C_X inconnue et de volume V_X . Dans un second temps, on ajoute un volume Δv (faible par rapport à V_X) d'une solution standard de concentration C_S . L'absorbance A_{XS} est alors mesurée. On a alors que

$$C_X = \frac{A_X C_S \Delta v}{A_{XS}(V_X + \Delta v) - A_X V_X}$$

Cette méthode présente l'avantage de tenir compte des effets de

matrice. Par contre, elle est relativement lente, puisqu'elle nécessite un ajout par échantillon. A noter que cette méthode, comme celle de l'étalon externe, supposent que la loi de Beer-Lambert est bien respectée, ce qui n'est pas toujours le cas (notamment pour les solutions concentrées).

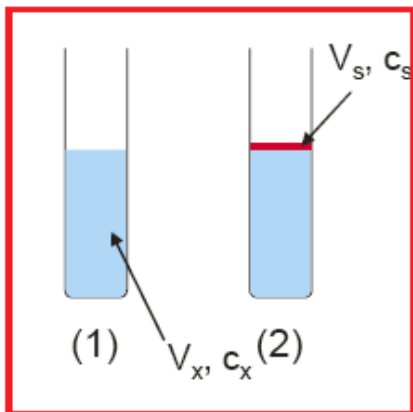


Figure 1.23. : Illustration de la méthode de l'étalon interne : En (1) la cuvette avec l'échantillon à doser. En (2) l'échantillon à doser, auquel on a ajouté un volume très faible d'une solution très concentrée d'étalon. La volume de solution étalon ajoutée est très faible pour limiter son effet sur la matrice.

Méthode de la droite d'étalonnage : Consiste à mesurer l'absorbance de différentes solutions contenant des quantités connues et croissantes de l'élément à doser. On trace ensuite la droite $A=f(C^\circ)$. On détermine, finalement, l'absorbance de la solution inconnue, puis on reporte cette valeur sur la droite d'étalonnage pour en déduire la concentration.

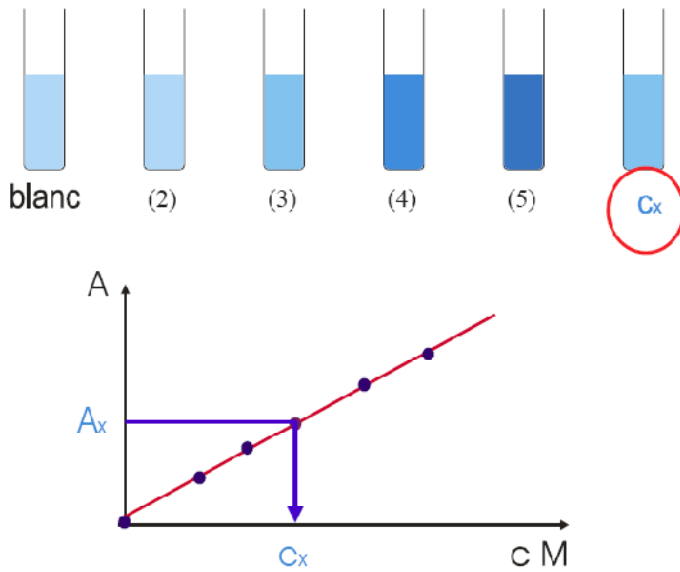


Figure 1.24. : Illustration de la méthode de la droite d'étalonnage : Les absorbances de solutions étalon de différentes concentrations sont mesurées et reportées sur une courbe Absorbance vs concentration. L'absorbance de l'inconnue est ensuite reportée sur la droite d'étalonnage, ce qui permet de déterminer sa concentration.

Cas des mélanges et additivité des absorbances

Pour une longueur d'onde donnée, l'absorbance d'un mélange est égale à la somme des absorbances de chaque composant.

Composé: C_1 C_2 C_3 C_n
 Absorbance: A_1 A_2 A_3 A_n
 Loi de Beer Lambert pour mélanges:

$$A_{\text{tot}} = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \varepsilon_1 \ell C_1 + \varepsilon_2 \ell C_2 + \dots + \varepsilon_n \ell C_n$$

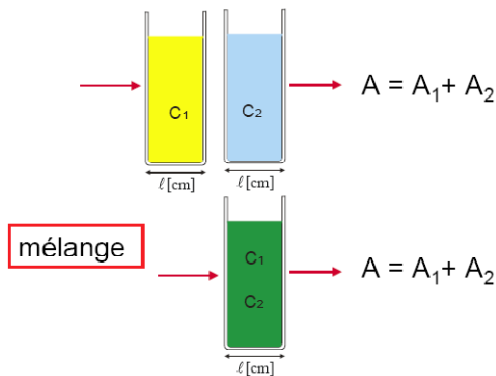


Figure 1.24. : Cas de mélanges : Les absorbances de différents composants d'un mélange sont additives.

Ainsi, supposons un mélange de M et de N, l'**absorbance totale est la somme des absorbances** des deux composés **individuels**.

La détermination de la concentration en M et N nécessite **2 étapes** :

- 1^{ère} étape : **Détermination de ε_M et ε_N à λ_1 et λ_2** . Pour ce faire, construire quatre courbes étalons (une pour chaque coefficient d'extinction à déterminer). Soit deux courbes avec des étalons de M mesurés aux deux longueurs d'onde et deux courbes avec des étalons de N mesurés aux deux longueurs d'onde.

- 2^{ème} étape : **Mesure de A_{M+N}^λ aux deux longueurs d'onde** de sorte que l'on obtient un système de deux équations à deux inconnues (C_M et C_N dans la solution inconnue).

$$A_{M+N}^{\lambda_1} = \epsilon_M^{\lambda_1} C_M + \epsilon_N^{\lambda_1} C_N$$

$$A_{M+N}^{\lambda_2} = \epsilon_M^{\lambda_2} C_M + \epsilon_N^{\lambda_2} C_N$$

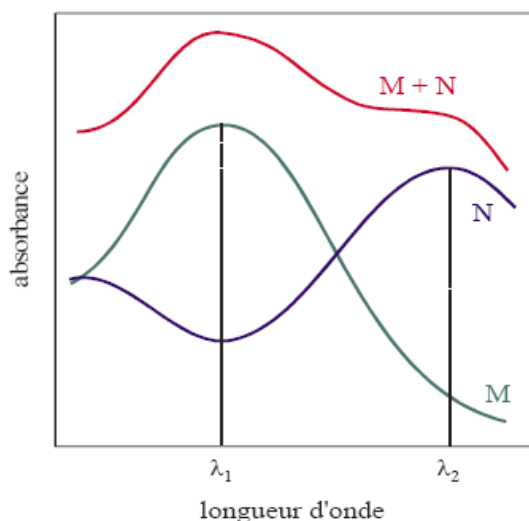


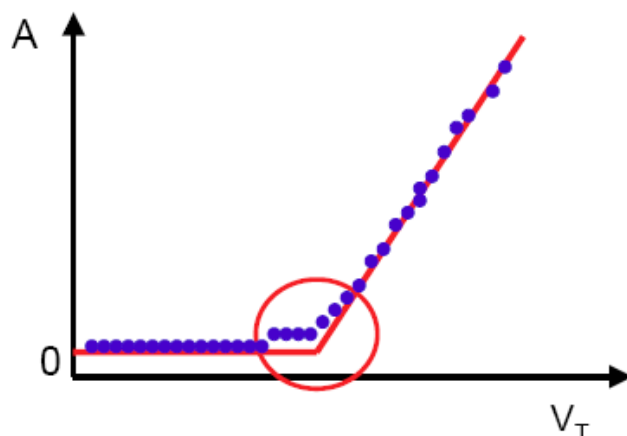
Figure 1.25. : Spectre UV d'un mélange : En bleu clair : spectre d'une substance M à une concentration C_M , en bleu foncé : spectre d'une substance N à une concentration C_N , en rouge : spectre d'un mélange de M + N à des concentrations respectives de C_M et C_N .

Titration photométrique

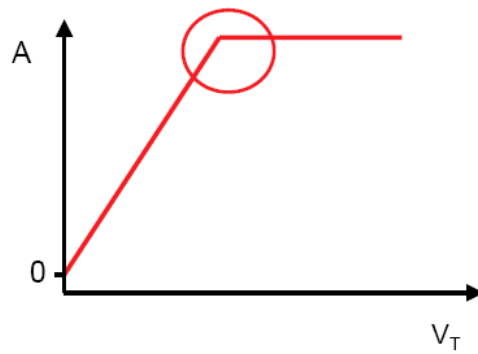
Le principe du titrage photométrique est identique à celui d'un titrage avec indicateur pH (qui l'eut cru ?), si ce n'est que la détection des modifications de couleur n'est plus visuelle, mais instrumentale. On obtient alors des courbes de type absorbance en fonction du volume de titrant ($A=f(V_T)$). Le point de fin de titrage correspond alors à l'intersection des droites obtenues par extrapolation des deux parties linéaires. Prenons l'exemple suivant :



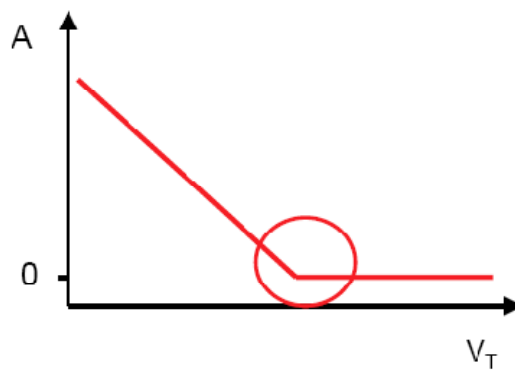
Cas 1. S et P n'absorbent pas ($\epsilon_S = \epsilon_P = 0$) et T absorbe ($\epsilon_T > 0$)



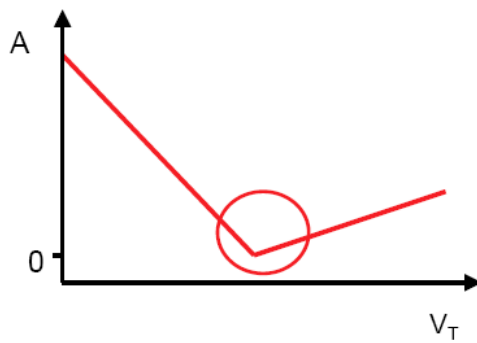
Cas 2. S et T n'absorbent pas ($\epsilon_S = \epsilon_T = 0$) et P absorbe ($\epsilon_P > 0$)



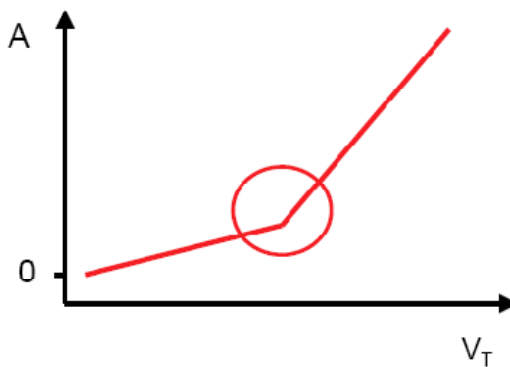
Cas 3. P et T n'absorbent pas ($\epsilon_P = \epsilon_T = 0$) et S absorbe ($\epsilon_S > 0$)



Cas 4. S et T absorbent ($\epsilon_S > \epsilon_T > 0$) et P n'absorbe pas ($\epsilon_P = 0$)



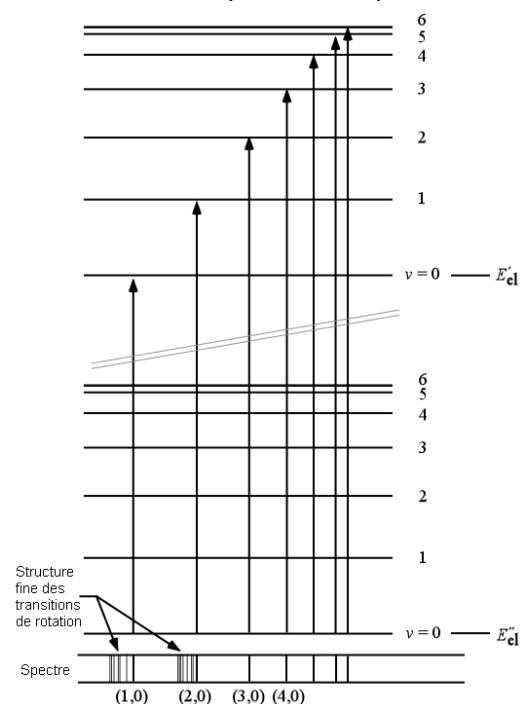
Cas 5. P et T absorbent ($\epsilon_T > \epsilon_P > 0$) et S n'absorbe pas ($\epsilon_P = 0$)



1.4. Spectroscopie de fluorescence (UV)

Il est important de noter que *pour chaque niveau d'excitation électronique, il existe plusieurs niveaux d'excitation vibrationnelle (IR) et que pour chacun de ces derniers, il existe plusieurs niveaux d'excitation rotationnelle (MO)*, ce qui est illustré dans la figure 1.26. La maîtrise de ce concept est nécessaire à la bonne compréhension de la fluorescence, et principalement à bien voir la différence qui existe entre ce phénomène et une simple ré-émission. C'est d'ailleurs par cela que nous commencerons l'aspect théorique de la spectroscopie par fluorescence.

Figure 1.26. : Niveaux d'énergie électronique et vibrationnelle (et structure fine rotationnelle) : Deux niveaux électroniques sont représentés, le niveau E''_{el} , fondamental et le niveau E'_{el} excité. Les deux barres diagonales grises qui séparent ces niveaux, indiquent que l'échelle n'est pas respectée et qu'ils sont en fait beaucoup plus éloignés en énergie que ce qui est illustré. Pour chaque niveau électronique (UV-Vis) on voit qu'il existe plusieurs niveaux d'énergie vibrationnelle (IR). Quelques transitions possibles sont représentées par des flèches et le spectre correspondant est illustré dans le dessous de la figure. En outre, il existe des niveaux d'énergie rotationnelle pour chaque niveau d'énergie vibrationnelle, mais ils ne sont pas représentés pour des raisons de clarté. Par contre, deux exemples de structures fines sont illustrés dans le spectre.



Aspect théorique

Désexcitation

Une fois la molécule portée dans un état excité par l'absorption d'un photon, plusieurs voies de déséxcitation sont possibles :

- **Dissociation.** La molécule excitée se brise en deux fragments. Dans ce cas, **aucun phénomène spectroscopique autre que celui d'absorption initial n'est observé**, à moins que les fragments n'irradient de l'énergie par un des processus mentionnés ci-dessous.
- **Ré-émission.** Si l'absorption a lieu comme illustré dans la figure 4.57, alors la ré-émission est exactement l'inverse de celle-ci. **La radiation émise, qui peut être mesurée et représentée comme un spectre d'émission, est identique en fréquence avec celui d'absorption.**

- **Fluorescence.** Si, comme cela est représenté dans la figure 1.27, la molécule se retrouve dans un état de vibration élevé après une excitation électronique et ***l'excès d'énergie vibrationnelle peut être perdu par des collisions intermoléculaires.*** L'énergie vibrationnelle est convertie en énergie cinétique et apparaît sous forme de chaleur dans l'échantillon ; un tel ***transfert entre les niveaux d'énergie*** est dit « ***non radiatif*** » et on parle dans ce cas de ***conversion interne (CI)***. Ce phénomène est représenté par des flèches ondulées sur la figure 1.27. Lorsque la molécule excitée a atteint un niveau vibrationnel plus bas (ex : $v = 0$), elle peut alors émettre une radiation et retourner à l'état fondamental ; ***la radiation émise, appelée « spectre de fluorescence », est normalement de fréquence plus basse que celle de l'absorption initiale,*** mais dans certaines conditions, elle pourrait être de fréquence plus élevée. Le temps entre l'absorption initiale et le retour à l'état fondamental est très court, de l'ordre de 10^{-8} s.
- **Phosphorescence.** Ce phénomène peut avoir lieu quand deux états excités, différents par leur spin total ($S = 0 \rightarrow$ multiplicité de spin = $2S+1 = 1$, état singulet : les deux électrons sont de spins opposés ou $S = 1 \rightarrow$ multiplicité de spin = $2S+1 = 3$, état triplet : les deux électrons sont de spins identiques), ont des énergies comparables. Dans la figure 1.27, on voit que l'état fondamental (S_0) et l'un des états excités (S_1) sont des singulets, alors qu'un état excité voisin (T_1) est un triplet. Même si une règle de sélection ($\Delta S = 0$) interdit qu'il y ait une transition spectroscopique entre un état singulet et un état triplet, il n'est pas interdit que le transfert entre les états excités ($S_1 \rightarrow T_1$) se déroule cinétiquement, c'est-à-dire suivant des transitions non radiatives induite par des collision. On parle alors de conversion inter-systèmes (CIS). Lorsque la molécule est arrivée à l'état triplet et a perdu un peu d'énergie vibrationnelle dans cet état, elle ne peut retourner à l'état excité singulet. Elle va donc finalement atteindre le niveau vibrationnel fondamental de l'état triplet. Maintenant, et bien qu'une transition vers l'état fondamental (singulet) est interdit, il se peut qu'elle ait lieu, mais de façon bien plus lente qu'une transition électronique permise. Dans le cas contraire, elle peut également rejoindre l'état fondamental via une nouvelle conversion inter-système ($T_1 \rightarrow S_0$) et une cascade de conversions internes. La lenteur de la transition « non autorisée » de l'état triplet à l'état fondamental explique pourquoi les substances phosphorescentes continuent d'émettre des radiations lumineuses des secondes, des minutes ou même des heures après l'absorption initiale. Contrairement à la fluorescence, un spectre de phosphorescence est exclusivement constitué de fréquences plus faibles que celles absorbées.

- **L'émission stimulée.** Ce phénomène, dont ne nous parlerons pas plus en détail dans le cadre de ce cours, est à l'origine de la **production de radiations laser**.

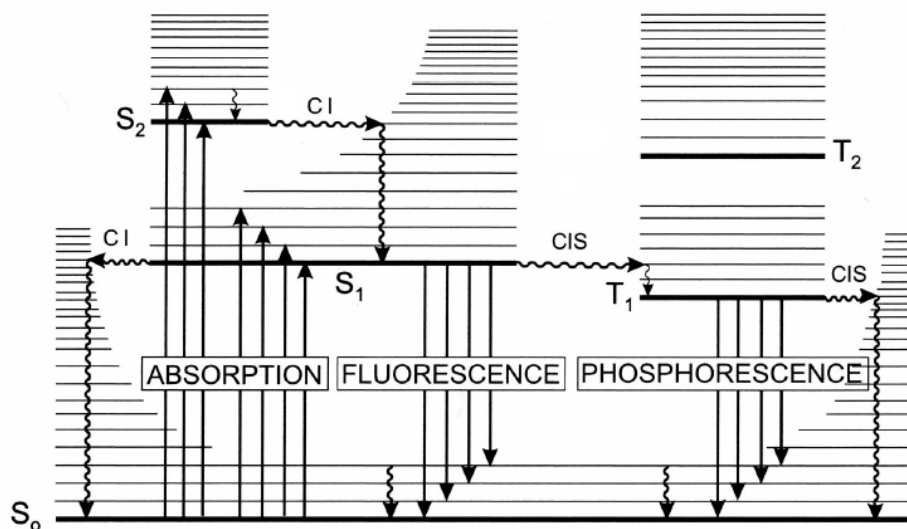


Figure 1.27. : Diagramme de Perrin-Jablonski :

- CI : Conversion interne.
- CIS : Conversion inter-systèmes.
- S_x : État singulet.
- T_x : État triplet.

Les niveaux d'énergie électronique sont représentés par des traits horizontaux gras, les niveaux d'énergie vibrationnelle par des traits horizontaux fins, les transitions radiatives (avec absorption ou émission de lumière) par des flèches verticales droites et les transitions non radiatives (sans émission de lumière) par des flèches ondulées.

Fluorescence

Les principales caractéristiques de l'émission de fluorescence d'une molécule organique sont :

- La **longueur d'onde d'excitation** (λ_{ex}), qui correspond à la longueur d'onde d'absorption pour laquelle il y a une fluorescence maximale (et qui correspond en général au maximum du spectre d'absorption).
 - La **longueur d'onde d'émission** (λ_{em}), qui correspond au maximum du spectre de fluorescence.
 - La **durée de vie de fluorescence** (τ_F), qui correspond au temps que passe la molécule à l'état excité avant d'émettre le photon.
 - Le **rendement quantique de fluorescence** (Φ_F), qui correspond au nombre de photon émis par photon absorbé. Cette grandeur, comprise entre 0 et 1, caractérise en quelque sorte l'efficacité du phénomène de fluorescence pour une molécule.
- L'efficacité d'un fluorophore dépend donc non seulement de ce paramètre, mais également de du coefficient d'absorbance,** puisque plus une molécule

fluorescente sera capable de capter de photons, plus elle sera susceptible d'en réémettre.

La fluorescence a connu un très fort développement dans de nombreux domaines (physique, biologie, médecine, environnement, industries pharmaceutiques, etc.) en particulier du fait de la très grande dépendance de la lumière émise par une molécule à son environnement (polarité, pH, température, pression, viscosité, liaisons hydrogènes, etc.)

Aspect pratique

Composition d'un spectromètre de fluorescence UV

Schéma général

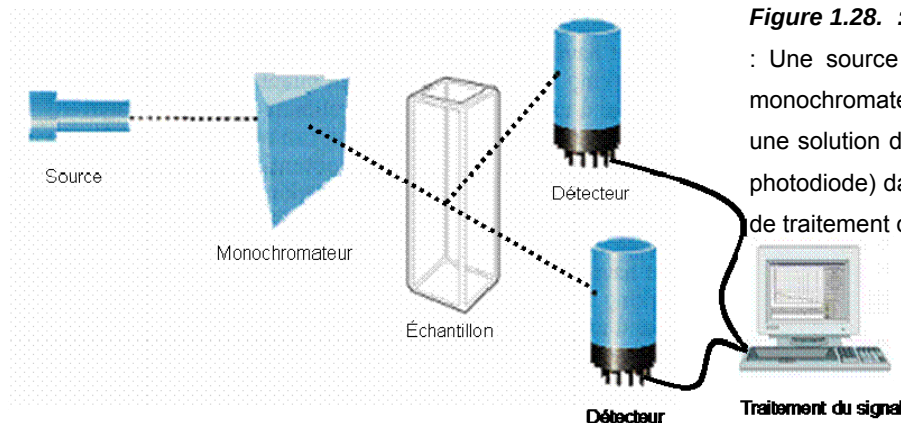


Figure 1.28. : Schéma général d'un fluorimètre UV

: Une source de rayonnement (ici, une lampe), un monochromateur (ici, un prisme), un échantillon (ici, une solution dans une cuvette), un détecteur (ici, une photodiode) dans l'axe optique et à 90° et un système de traitement du signal (ici, un ordinateur).

Comme on peut le voir à la figure 1.28, le schéma général d'un fluorimètre est en tout point comparable au schéma général d'un spectromètre UV, si ce n'est que cette fois, on détecte le signal, non seulement dans l'axe optique (mesure du spectre d'absorbance), mais également à 90° de cet axe, pour détecter les émissions de fluorescence.

Applications de la fluorescence UV

Afin de bien montrer l'étendue des applications de la fluorescence, nous ne nous limiterons pas à la spectroscopie par fluorescence UV exclusivement.

- **Études cinétiques** : Si, un composé fluorescent est le produit ou le réactif d'une réaction, il est possible de suivre l'évolution de cette dernière par mesure de la fluorescence de l'échantillon. Cela permet également, par exemple, d'évaluer l'efficacité d'un catalyseur, comme le montre la figure 1.29.



Figure 1.29. : Photo de 4 puits d'une plaque de test : Les Puits 1 et 2 ne contiennent pas un des réactifs de la réaction. Le puits 3 contient les deux réactifs, sans catalyseur ; on y observe une faible fluorescence après plusieurs minutes, trahissant l'apparition d'un produit fluorescent. Dans le puits 4, en présence d'un catalyseur, la fluorescence est plus importante.

- **Marquage** : Certains composés fluorescents ont été créés pour avoir en plus une certaine affinité pour l'une ou l'autre organelle cellulaire, ce qui permet de les colorer spécifiquement, comme l'illustre la figure 1.30.

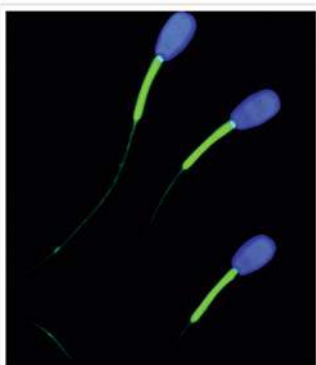


Figure 1.30. : Photo de spermatozoïdes de taureau : Ces spermatozoïdes vivants ont été colorés avec un fluorophore bleu qui marque spécifiquement les noyaux des cellules (tête) et un fluorophore vert qui marque spécifiquement les mitochondries (queue).

- **Détection de métaux** : Il est possible de créer des composés dont la fluorescence va dépendre de la complexation d'un métal.
- **Fixation à l'ADN** : Le bromure d'ithidium, reconnu pour être un bon intercalant de l'ADN, permet la coloration des gels d'ADN pour vérifier l'efficacité d'une PCR ou d'une digestion de plasmide, comme vous l'avez peut-être vu ou allez peut-être le voir dans votre cours de biotechnologie ou de microbiologie.

1.5. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (SM) permet de recueillir des informations sur la nature, la composition et la structure des espèces présentes dans l'échantillon. Les instruments correspondants sont les spectromètres de masse, appareils de conceptions diverses, dont certains dérivent de montages imaginés au début du 20^{ème} siècle par les physiciens pour l'étude des particules ou des atomes ionisés tandis que d'autres utilisent le principe des pièges à ions.

La spectrométrie de masse trouve ses applications dans des secteurs très divers, tels ceux de la chimie organique, de la biochimie, de la parachimie, de l'environnement, de l'agro-alimentaire, de la géochimie, ainsi que dans beaucoup de contrôles de procédés industriels.

Aspect théorique

Principe de la spectrométrie de masse

L'analyse par spectrométrie de masse repose sur l'ionisation, généralement dans une enceinte où règne un **vide poussé** (10^{-4} Pa), d'une très petite quantité d'échantillon, afin de créer des **ions** ; ces espèces chargées sont alors soumises à l'action de champs **électriques et/ou magnétiques**, suivant les appareils. L'étude des trajectoires suivies permet de **déterminer le rapport masse/charge des ions**, donc éventuellement leur nature. La représentation sous forme graphique de l'abondance des ions sur la base de leur rapport masse/charge constitue le spectre de masse (figure 1.31). Celui-ci traduit la fragmentation, à l'échelle statistique, du très grand nombre d'espèces individuelles qui composent tout produit soumis à cette analyse. La méthode, d'une extrême sensibilité, détruit l'échantillon.

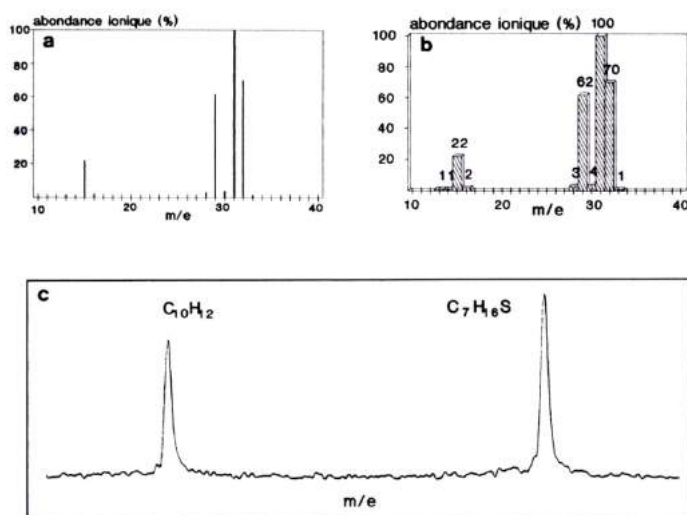


Figure 1.31. : Différents types de spectres de masse : tracés en histogrammes au dessus (a et b) et tracé en continu, en dessous (c).

En résumé, lorsque l'on soumet un composé moléculaire à cette analyse, on initie un processus en plusieurs étapes enchaînées :

- **Ionisation** : les molécules présentes dans l'échantillon passent à l'état gazeux, par effet du vide, et sont ionisés par un des procédés existants. Il en résulte un mélange d'ions issus de la fragmentation des molécules de départ.
- **Accélération** : sitôt formés, les ions sont dirigés vers le dispositif de séparation, par effet d'un champ électrique qui accroît leur énergie cinétique.
- **Séparation** : les ions sont alors triés suivant leur rapport masse/charge (m/e). Plusieurs procédés peuvent être employés à cette fin.
- **Détection** : après séparation, les ions sont recueillis par un détecteur sensible aux charges électriques transportées.

- **Traitement du signal** : le signal en sortie de l'appareil conduit au spectre de masse, représentation conventionnelle de l'abondance des ions en fonction de leur rapport masse/charge, mesurable jusqu'à 10^4 .

Selon le spectromètre, on accède aux masses individuelles des ions présents avec plus ou moins de précision. Les meilleurs appareils peuvent déterminer les masses avec une extrême précision : la marge d'erreur ne dépasse pas 10^{-5} uma. Tous les appareils, quelles que soient leur performances, conduisent à une présentation standardisée des résultats sous forme de spectre de fragmentation qui correspond à une répartition des ions, regroupés aux valeurs nominales entières (qui n'existe que de nom et non de fait) les plus proches de leur masse réelles, et dont **les intensités sont exprimée en % du pic le plus intense, appelé pic de base**.

Ce "spectre-bâtons", qui correspond à la distribution des masses réparties en classes dont les hauteurs sont proportionnelles à leurs abondances, n'est autre qu'une sorte d'histogramme. Néanmoins cette représentation a pour inconvénient **qu'à une même masse nominale il peut correspondre plusieurs ions**, par ailleurs totalement différents, qui se confondent dans ce type de représentation. C'est pourquoi les spectromètres de masse permettent également une autre présentation des résultats, sous forme d'un tracé continu des masses balayées. Les signaux prennent alors l'aspect de pics gaussiens, plus ou moins larges selon l'appareil. La position de chaque maximum correspond à un rapport masse/charge précis.

Pour **identifier un composé moléculaire** par spectrométrie de masse, on dispose de **deux approches** : soit en faisant appel à une **spectrothèque** où est répertorié un grand nombre de spectres, parmi lesquels on retrouvera celui du composé étudié s'il existe dans la collection, **soit** en essayant de **reconstituer la structure** du composé de départ **à la manière d'un puzzle**. La seconde méthode est un exercice d'une grande difficulté, les fragmentations étant souvent assez difficilement prévisibles. Il faut alors disposer de plusieurs spectres, enregistrés dans des conditions différentes.

La spectrométrie de masse est devenue progressivement un moyen d'investigation irremplaçable des composés structurés. Elle s'applique également à l'analyse de la composition élémentaire des milieux inorganiques (technique ICP/MS) et peut être étendue à l'étude des mélanges moléculaires, à condition de placer en amont du spectromètre de masse un chromatographe (liquide ou gazeux) ou une électrophorèse capillaire pour séparer les composés.

Action d'un champ électrique – force de Coulomb

Le fonctionnement des diverses catégories de spectromètres de masse est basé sur l'action des champs électrique et magnétique sur les ions dans le vide.

Lorsque l'on crée une **différence de potentiel** $\vec{V}$ (volts) entre deux plaques parallèles distantes de d (m), il apparaît un **champ électrique** $\vec{E}$ (V/m) uniforme si le milieu est homogène et orienté vers les faibles potentiels. On pose :

$$\vec{E} = \frac{\vec{V}}{d}$$

$\vec{E}$ grandeur vectorielle détermine la **force de Coulomb** qui s'exerce sur l'ion de masse m porteur de la charge q et placé dans ce champ.

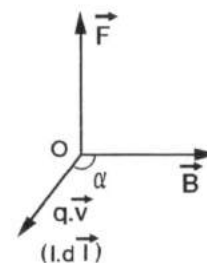
$$\vec{F} = q\vec{E}$$

Si $q > 0$, $\vec{F}$ a le même sens que $\vec{E}$, et inversement. Cette force est indépendante de la vitesse de l'ion. En spectrométrie de masse, on remplace souvent q par e ou z pour désigner la charge, bien que les ions portent quelquefois plus d'une seule charge élémentaire.

Action d'un champ magnétique – formule de Lorentz

La **force** qui s'exerce sur une particule ou un ion, porteur d'une charge q , animé d'une vitesse $\vec{v}$ et soumis à l'action d'un **champ** d'induction **magnétique** $\vec{B}$, est donnée par une expression connue sous le nom de **formule de Lorentz** que l'on écrit :

$$\vec{F} = q\vec{v} \wedge \vec{B}$$



Si $\alpha = \pi/2$ et si on remplace q par e , on a $F = evB$ (e en coulomb, v en m s^{-1} , B en tesla et F en newton). La formule de Lorentz est déduite de la loi plus générale de Laplace

qui exprime la force à laquelle est soumise un conducteur de longueur $\vec{dl}$, parcouru par un courant I , dans un champ d'induction magnétique $\vec{B}$.

$$\vec{F} = I d\vec{l} \wedge \vec{B}$$

Le champ magnétique ne modifie pas la vitesse des ions, donc leur énergie cinétique. Par application de la relation fondamentale de dynamique, qui s'écrit, dans le repère du laboratoire, $\vec{F} = m\vec{a}$, on en déduit, si $\alpha = \pi/2$:

$$\vec{a} = \frac{e}{m} \vec{v} \wedge \vec{B}$$

Seule la composante centripète du vecteur accélération intervient ($\alpha = \pi/2$). **L'ion amorce une trajectoire circulaire** de rayon R , dans un plan perpendiculaire à $\vec{B}$ et contenant $\vec{v}$. De ce fait, $a = v^2/R$, soit en remplaçant a par sa valeur tirée de l'expression ci-dessus,

$$\frac{m}{e} = \frac{RB}{v} \text{ ou } R = \frac{mv}{eB}$$

La spectrométrie de masse ne permet d'accéder qu'au rapport masse/charge des ions, porté en abscisse du spectre (c'est pourquoi on écrit par convention m/q ou m/e). Si tous les ions portent la même charge, l'échelle de masse est la même, à un facteur près. C'est pourquoi l'échelle des spectres est indiquée en uma (ou Da). Par contre, si un même fragment m est porteur de charges différentes, il apparaîtra à plusieurs positions, l'appareil ne pouvant différencier, par exemple, $m/2e$ et $(m/2)/e$.

Aspect pratique

Introduction et ionisation de l'échantillon

Modes d'introduction directe des échantillons

Le mode d'introduction dans le spectromètre de masse varie suivant l'état physique de l'échantillon et la technique choisie. Dans le cas d'un gaz ou d'un composé à l'état de vapeur, on introduit un peu de l'échantillon dans un réservoir qui communique avec la

chambre d'ionisation par une fuite réglable. Pour un liquide, on utilise une microseringue. Le liquide se trouve vaporisé par effet du vide régnant dans la chambre d'ionisation.

Les solides peuvent être introduits en les déposant à l'extrémité d'une canne métallique chauffante, pour assurer la sublimation du composé, ou par évaporation à partir d'une solution dans un solvant volatil.

Introduction dans le cas d'un couplage CG/SM

L'interfaçage le plus simple pour la technique couplée CG/SM (GC/MS), consiste à réunir la colonne capillaire et le spectromètre de masse, soit en introduisant directement l'extrémité de la colonne dans la chambre d'ionisation, soit par le relais d'un capillaire de transfert chauffé, placé entre le chromatographe et le spectromètre de masse. A condition que le **débit** dans la colonne **ne dépasse pas quelques ml/min**, et que les **colonnes** soient **très longues**, les pompes peuvent maintenir le vide nécessaire à l'analyse. Pour les colonnes à garnissage dont le débit est plus élevé, ou pour permettre un emploi moins restrictif de la colonne capillaire, on adapte une microvanne et un restricteur, appelé séparateur.

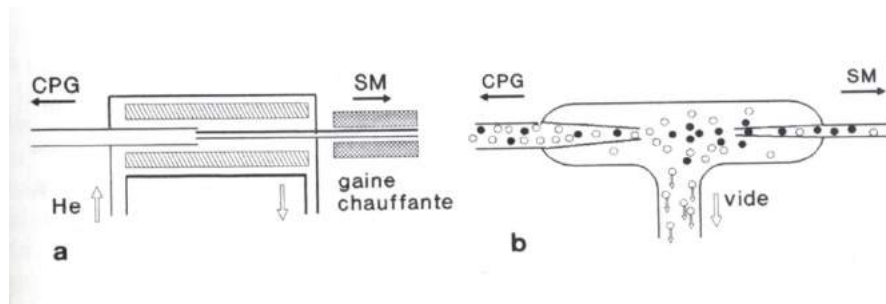


Figure 1.32. : Couplage d'une CG à un SM :

a/ Couplage par un capillaire relais chauffé.

b/ Couplage par un restricteur.

Introduction dans le cas d'un couplage CLHP/SM

L'interfaçage CLHP/SM pose plus de **difficultés** par suite de la **nature de la phase mobile**, particulièrement lorsqu'il s'agit d'éliminer un solvant aqueux (1 ml/min) au niveau de l'interface entre les deux appareils. Il existe toutefois différentes possibilités pour remédier à ce problème.

Introduction directe de l'éluant dans la région de la source d'ions :

- Ne peut supporter un débit de 1 ml / min. Un tel débit donne un volume de gaz égal à 1,2 l / min, ce qui dépasse de loin les capacités d'une pompe à vide. Il est donc nécessaire **d'utiliser un système split/splitless** pour des débits aussi grands.
- S'adapte au débit d'une colonne capillaire qui est de l'ordre de 5 à 50 µl / min. Les **composés** ne sont **jamais complètement désolvatés**.

Thermospray : Volatilisation rapide par **passage** de l'éluant, dont le débit se situe entre 1 et 2 ml/min, **dans un capillaire chauffé en présence d'un électrolyte** comme l'acétate d'ammonium. Un système de pompage situé en face du capillaire produit un jet supersonique de vapeur contenant de très fines gouttelettes. La taille de ces dernières diminue à mesure qu'elles se déplacent (vaporisation) et, à un certain moment, les ions s'en détachent et entrent dans le spectromètre de masse.

ICPA (Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique) : C'est un procédé assez comparable au thermospray, mais avec une ionisation à pression atmosphérique.

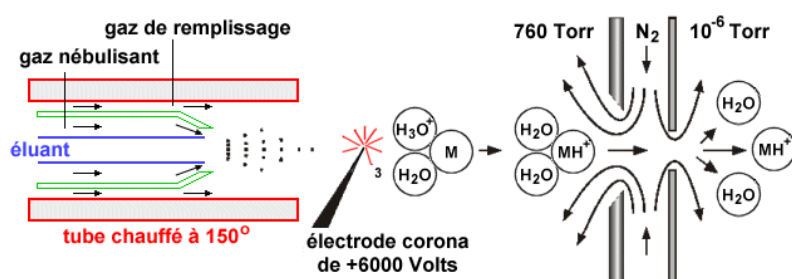


Figure 1.33. : Ionisation à pression atmosphérique.

Électrospray : L'éluant entre dans une chambre, maintenue à la pression atmosphérique, à travers un fin capillaire en acier inoxydable. Un **potentiel élevé** est appliqué entre un manchon composé d'une solution dont le rôle est de maximiser l'ionisation des molécules de l'éluant, et une contre-électrode. Ce potentiel a pour effet de créer un **champ électrique** puissant qui **provoque l'apparition de charges à la surface des gouttelettes** qui sortent du capillaire en jet très fin. Ces gouttelettes se déplacent dans un courant d'azote à travers un orifice de la contre électrode, processus qui contribue à l'évaporation du solvant présent dans les gouttelettes. Ce même courant d'azote transporte les ions dans le spectromètre de masse. **Les ions formés par ce type d'ionisation possèdent un rapport m/z (masse sur charge) élevé, ce qui permet de faire l'analyse de molécules de masse molaire élevée comme les protéines.**

Inconvénients :

- Limité à un débit assez faible (quelques μl par minute).
- Problème de nébulisation si changement de solvant (utilisation de gradient).

Développements récents dans ce mode d'ionisation :

- Addition de gaz qui aide à la nébulisation du liquide et à la désolvatation des ions.
- Chauffage du capillaire (permet d'augmenter le débit).

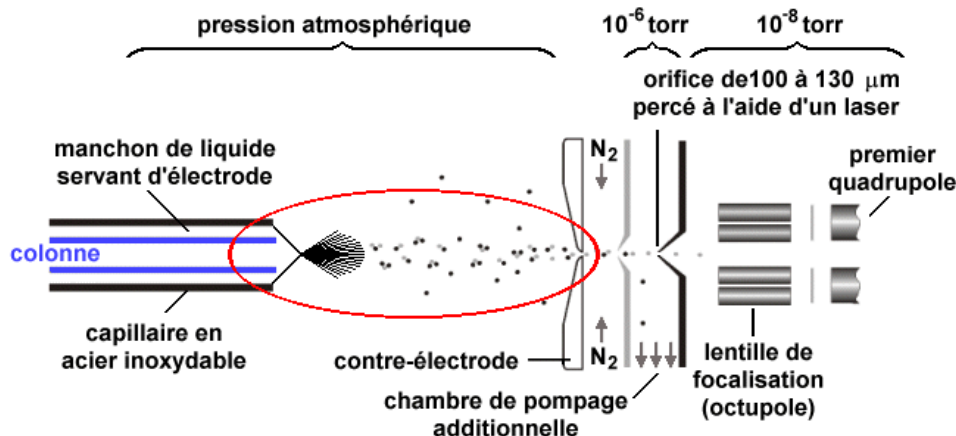


Figure 1.34. : Électrospray

Ionisation par impact électronique

L'ionisation par impact électronique, *dérive* des premières expériences sur les tubes à décharge, les "rayons canaux" et les **rayons cathodiques**. Elle est provoquée par impact d'électrons sur l'échantillon. Le standard d'ionisation – 70 eV – est obtenu avec des électrons produits par effet thermoionique, accélérés par une différence de potentiel de 70 V. Afin d'accroître, sur le spectre, l'intensité relative du pic moléculaire M^+ , il est possible de choisir une énergie d'ionisation plus faible, 15 eV par exemple.

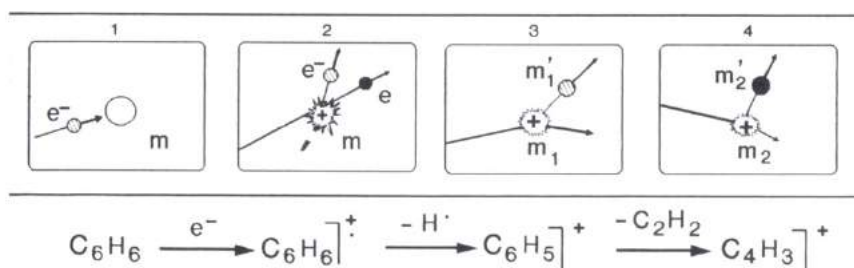


Figure 1.35. : Schéma du processus d'ionisation par impact électronique :

1. Bombardement électronique.
2. Formation d'un ion-radical.
3. Ionisation.
4. Fragmentation.

Désorption / ionisation

L'échantillon est ionisé par impact d'atomes lourds (Xe ou Ar), ou avec des ions (Cs^+ ou Na^+), animés d'une grande vitesse. Ainsi dans la méthode de **bombardement par des atomes rapides** (FAB), on ionise un gaz atomique avec des électrons, puis on accélère les ions formés afin de les faire entrer en collision avec des atomes du gaz restés à l'état neutre. Ceux-ci sont projetés à grande vitesse sur l'échantillon déposé, à l'état de film, sur un support métallique. Cette technique **évite de chauffer les composés** et permet de faire des études de plus longue durée.

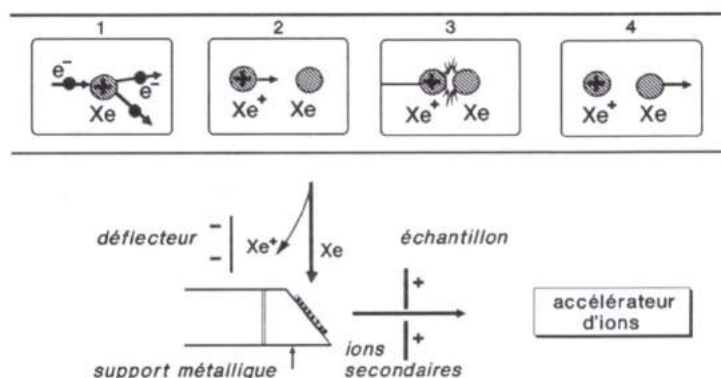


Figure 1.36. : Schéma du processus de désorption/ionisation :

1. Bombardement électronique du Xe et formation d'un cation Xe^+ .
2. (ainsi que 3 et 4), propulsion d'un atome de Xe par collision avec un cation Xe^+ .

Sur le schéma du dessous : Les atomes de Xe viennent heurter l'échantillon qui se trouve sur un support métallique, ce qui provoque l'éjection d'ions secondaires, alors que les cations Xe^+ sont déviés par des déflecteurs.

Ionisation chimique (IC)

L'échantillon est **bombardé par des ions issus de petites molécules**. Pour cela, on introduit dans la chambre d'ionisation, conjointement au composé à analyser, un gaz en large excès, tel que le **méthane, l'ammoniac ou l'isobutane**, à la pression de 0,1 Pa. On bombarde ce mélange par des électrons. La pression du gaz étant telle que le libre parcours moyen des molécules est faible, il se produit des collisions entre les espèces réactives. En prenant l'exemple du méthane, on a :

Ionisation primaire : $\text{CH}_4 + e^- \rightarrow \text{CH}_4^{++} + 2e^-$

Ions secondaires : $\text{CH}_4^{++} \rightarrow \text{CH}_3^+ + 2\text{H}^+$

$\text{CH}_4^{++} + \text{CH}_4 \rightarrow \text{CH}_5^+ + \text{CH}_3^+$

$\text{CH}_3^+ + \text{CH}_4 \rightarrow \text{C}_2\text{H}_5^+ + \text{H}_2$

Collisions : $\text{CH}_5^+ + \text{M} \rightarrow \text{MH}^+ + \text{CH}_4$ (ion à M+1)

$\text{CH}_5^+ + \text{M} \rightarrow \text{MCH}_4^{++} + \text{H}^+$ (ion à M+16)

$\text{C}_2\text{H}_5^+ + \text{M} \rightarrow \text{MC}_2\text{H}_5^+$ (ion à M+29)

En général, la présence d'ions relativement lourds dans ces milieux rend **inoportune l'étude du spectre en dessous de 45 uma**.

L'ion quasi moléculaire MH^+ (qui n'est pas un ion radical) a une moindre tendance à se fragmenter que l'ion moléculaire M^+ en ionisation électronique. Il permet généralement de repérer la **masse moléculaire**. La formation de MH^+ dépend cependant de l'affinité de M pour H^+ , si bien que dans d'assez nombreux cas, on observe un ion $(\text{M}-1)^+$, ce qui fait que l'ionisation chimique laisse toujours planer un doute sur la valeur de la masse moléculaire du composé étudié.



NH_4^+ se comporte comme CH_5^+ . Quant à l'isobutane, il donne avec facilité l'ion $(\text{CH}_3)_3\text{C}^+$ stable, qui conduit à l'ion (M+1), en se transformant en isobutène :



Ionisation par plasma (ICP/MS)

Cette méthode est réservée à l'analyse élémentaire des échantillons en solution aqueuse. Elle convient bien aux sels inorganiques. L'échantillon nébulisé est introduit au centre d'un plasma d'argon placé à l'entrée du spectromètre et dont la température est de l'ordre de 7000 K.

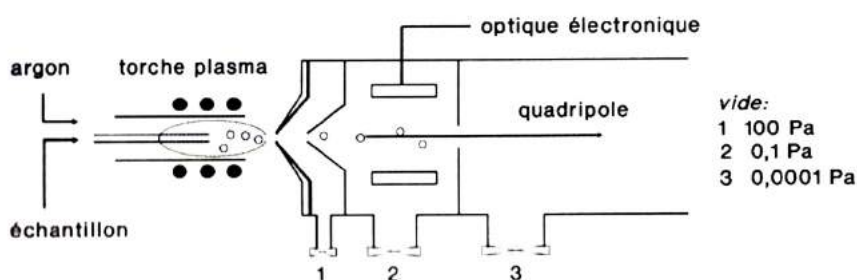


Figure 1.37. : Schéma du processus par plasma :
L'échantillon est atomisé et ionisé, par un système comparable à celui étudié dans la section consacrée à la spectrométrie d'émission atomique, avant d'entrer dans le spectromètre de masse proprement dit.

Après désolvatation, vaporisation et dissociation, les éléments dont l'énergie de première ionisation est inférieure à 10 eV sont totalement ionisés (ceci concerne une cinquantaine d'éléments). Les ions sont aspirés par le spectromètre de masse en passant par une interface conçue autour d'un dispositif séparateur refroidi, assez semblable au système utilisé dans le couplage CLHP/SM.

Détecteurs à ions

La détection repose sur les mesures électriques des charges transportées pour lesquelles on retrouve des principes qui sont communs avec la détection des photons.

Ces détecteurs fixes imposent que l'on explore le domaine m/e par un balayage en fonction du temps. Certains modèles ont une telle sensibilité qu'ils peuvent repérer l'impact d'un seul ion. Ordinairement le nombre d'ions d'une même espèce est grand, de sorte que le signal est de type analogique. On distingue :

- Les **multiplicateurs d'électrons à dynodes séparées**. Dont le fonctionnement est comparable aux photomultiplicateurs, si ce n'est que cette fois, l'arrachement initial

d'électrons n'est pas provoqué par l'impact d'un photon, mais par l'impact d'un ion. Malheureusement, ces détecteurs vieillissent assez mal, mais il est possible de les remplacer par des photomultiplicateurs, en ajoutant un système de conversion ion $\rightarrow$ photon, ce qui conduit à un montage appelé ***dynolite***.

- Les ***multiplicateurs d'électrons à dynode continue*** (channeltron). Les ions sont déviés vers un collecteur dont l'entrée en forme de cornet est constituée d'un verre dopé au plomb qui fait office de cathode de conversion. Les électrons libérés sont attirés par un gradient de potentiel vers une électrode positive. Les chocs successifs des électrons sur les parois provoquent leur multiplication, comme sur des dynodes séparées. Le montage est désaxé, par rapport à la trajectoire incidente des ions, pour préserver la partie sensible du détecteur de l'impact des espèces neutres ainsi que des photons émis par le filament, susceptibles également d'arracher des électrons.

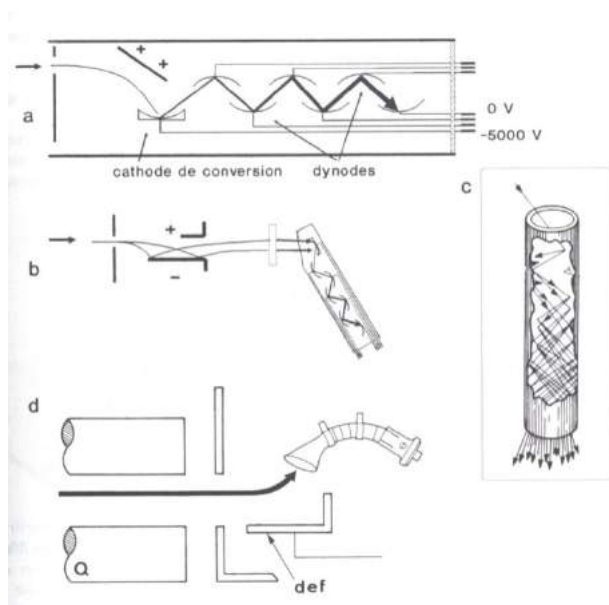


Figure 1.38. : Schémas des détecteurs à ions : a/ Multiplicateur d'électrons à dynodes séparées. b/ Dynolite (convertisseur d'ions en photons, couplé à un photomultiplicateur. d/ Channeltron (multiplicateur d'électrons à dynode continue).

Performance des spectres de masse

Limite en masse

Chaque appareil permet la mesure du rapport m/e des ions jusqu'à une valeur limite. Cette valeur supérieure est exprimée en uma pour un ion porteur d'une seule charge élémentaire. Certains constructeurs prennent pour valeur, la masse à partir de laquelle on ne peut distinguer M de $M+1$. Il va de soi que si l'ion est porteur de n charges, la limite en masse se trouve multipliée par n .

Sensibilité

La sensibilité d'un appareil se mesure en masse d'échantillon consommé par seconde (de l'ordre du pg), pour obtenir un signal d'intensité normalisée.

Pouvoir de résolution

Les pics des spectres de masses des appareils présentent l'aspect de courbes gaussiennes plus ou moins larges par la suite d'imperfections diverses. Le pouvoir de résolution est un paramètre qui permet de juger de l'efficacité des appareils à séparer des ions de masses voisines. Il est défini par $R = M/\Delta M$, calculé sur un enregistrement réel, après que l'appareil ait été réglé au mieux de ses performances. La masse M est mesurée au milieu du pic choisi. Quant à ΔM , il correspond :

- soit à la largeur du pic à mi-hauteur, en unités de masse.
- soit à l'écart minimum entre deux masses voisines, de même intensité, tel que la vallée, entre les pics, ne dépasse pas 10 % de leur hauteur.

Le pouvoir de résolution est sans dimension. Avec des appareils à secteur magnétique, ΔM varie avec M et il faut donc préciser la masse ayant servi au calcul. Avec des appareils à filtres quadrupolaires, ΔM est constant.

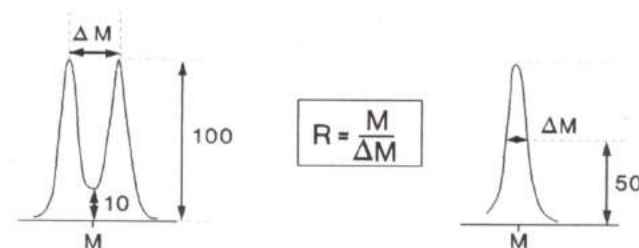


Figure 1.39. : Calcul de la résolution d'un

SM : A gauche, ΔM correspond à l'écart minimum entre deux masses voisines, de même intensité, tel que la vallée, entre les pics, ne dépasse pas 10 % de leur hauteur. A droite, ΔM correspond à la largeur du pic à mi-hauteur.

Spectrométrie à secteur magnétique et double focalisation

Cette catégorie d'appareils sépare les ions par effet d'un champ magnétique orienté perpendiculairement à la trajectoire des ions.

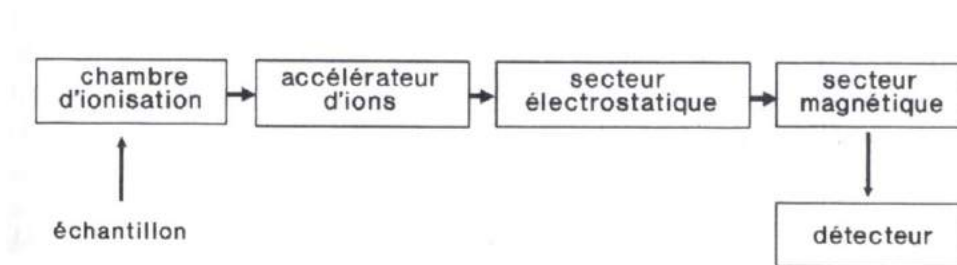


Figure 1.40. : Éléments constitutifs d'un spectromètre à secteur magnétique et double focalisation.

Dans certains montages, l'ordre des deux secteurs est inversé (le secteur électrostatique est placé avant le secteur magnétique). Étant donné la quantité

d'informations produites au cours d'une seule analyse, le traitement des données par l'ordinateur s'avère indispensable pour la correction, la manipulation, la conservation et la visualisation des données, sans oublier l'impression des résultats et le diagnostic des pannes de l'appareil.

Accélérateur d'ions

Environ 5 % des ions formés amorcent le parcours qui va les mener jusqu'au détecteur. Les **ions** (supposés ici positifs) sont **accélérés** au moyen de plusieurs plaques portées à des potentiels négatifs croissants, la **différence de potentiel** totale pouvant atteindre 10 000 V. Le vide doit être excellent pour éviter la formation d'arcs électriques.

Les ions **acquièrent** tous une **même énergie cinétique** $E_c = eU$. La vitesse acquise après accélération est donc inversement proportionnelle à la racine carrée de leur masse :

$$v_i = \sqrt{\frac{2eU}{m_i}}$$

Cependant leur **énergie cinétique** E_0 **avant accélération**, bien que très petite devant celle qu'ils ont acquise, est la **cause d'une faible dispersion** de leur énergie cinétique totale.

$$E_{\text{totale}} = E_0 + E_c$$

Secteur électrostatique

L'inhomogénéité énergétique précitée est neutralisée en faisant passer les ions à travers un secteur constitué de deux électrodes cylindriques concentriques qui sélectionnent les ions ayant la même énergie, quelle que soit leur masse. Ce **système à champ radial**, également focalisateur en direction, **redresse les trajectoires** quelque peu divergentes, à l'entrée du secteur.

La force $\vec{F} = e\vec{E}$ qui s'exerce sur les ions est perpendiculaire à la trajectoire centrale de rayon R et ne modifie donc pas leur énergie. En grandeur, elle est égale à $F = mv^2/R$. En remplaçant le produit mv^2 par son équivalent en fonction de tension accélératrice ($mv^2 = 2eU$), on aboutit à la relation fixant les conditions de passage des ions dans le secteur radial :

$$E = \frac{2U}{R}$$

Lorsque E et U sont reliés par cette expression, **seuls les ions ayant exactement l'énergie acquise au cours de l'accélération passeront par la fente de sortie**. En reliant U à la différence de potentiel V entre les plaques du secteur distantes de d ($V = Ed$), l'expression devient :

$$V = \frac{2d}{R}U$$

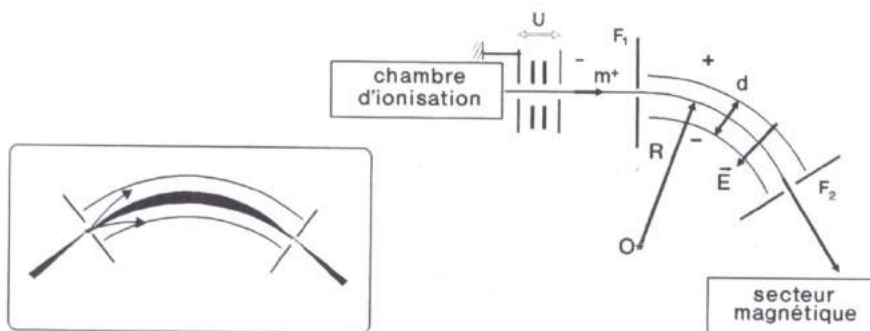


Figure 1.41. : Schéma de fonctionnement du secteur électrostatique d'un spectromètre à secteur magnétique et double focalisation.

Secteur magnétique

A la suite du secteur électrostatique, se trouve le secteur magnétique. Les appareils se partagent entre le montage Nier-Johnson pour lequel la courbure imposée par le champ magnétique est de même sens que la courbure due au secteur électrostatique et le montage de type Mattauch-Herzog où ces deux courbures sont opposées.

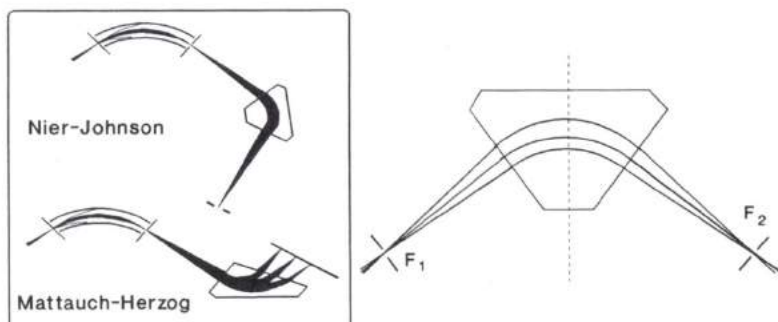


Figure 1.42. : Schéma de fonctionnement du secteur magnétique d'un spectromètre à secteur magnétique et double focalisation : A gauche, illustration des deux montages possibles : Nier-Johnson et Mattauch-Herzog. A droite, illustration de la focalisation par le secteur magnétique.

En éliminant la vitesse v par combinaison des relations vues précédemment, on retrouve la formule de déflexion des appareils classiques à secteur magnétique :

$$\frac{m}{e} = \frac{R^2 B^2}{2U}$$

Seuls les ions ayant suivi la trajectoire de rayon R , imposé par la construction, pourront être détectés. Par conséquent, pour repérer les masses présentes **on fait varier B** (mode normal d'utilisation) **ou U** , de manière progressive, pour que les ions suivent successivement l'unique parcours qui permet leur détection.

Comme le secteur électrostatique, le **secteur magnétique** – encore appelé prisme magnétique – est **focalisateur en direction** : un faisceau d'ions identiques abordant le secteur magnétique sous un petit angle de divergence α , est focalisé en F_2 , fente image de F_1 . **A chaque instant une seule masse peut suivre la trajectoire de rayon R .**

Le qualificatif de double focalisation donné à ces appareils, vient de ce que les montages en tandem des deux secteurs **permettent de corriger à la fois les aberrations angulaires et en énergie des ions** (focalisation en direction par le secteur magnétique et en vitesse par le secteur électrostatique).

Spectromètre à temps de vol

L'interdépendance entre la masse et la vitesse des ions est à la base du principe des appareils à temps de vol. Les **ions** sont **soumis**, durant un temps très bref, **à un potentiel accélérateur** (ex. 2000 V durant 10 μ s, de manière répétitive).

L'instrument **mesure** ensuite le **temps nécessaire** aux divers ions pulsés **pour parcourir**, d'un mouvement rectiligne uniforme dans le vide du tube analyseur, **une distance L** , libre de tout champ. En éliminant v entre les deux expressions $\frac{1}{2}mv^2 = eU$ et $L = vt$, on obtient la relation classique de ces appareils qui relie temps de parcours et masse :

$$m = \frac{2eU}{L^2} t^2$$

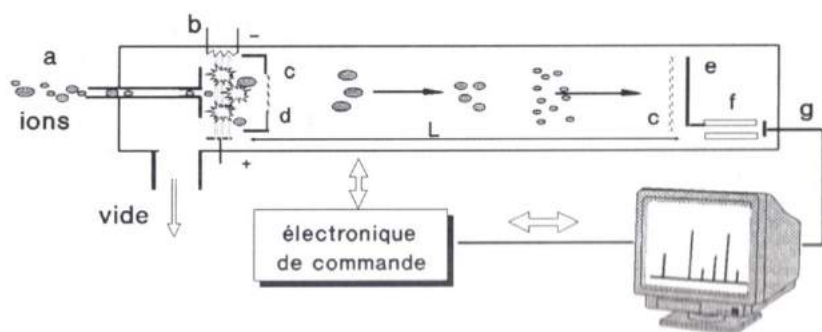


Figure 1.43. : Schéma de fonctionnement d'un spectromètre à temps de vol.

Spectromètre à résonance cyclotronique

Cette catégorie de spectromètre utilise la technique des pièges magnétiques à ions. Elle conduit à une très grande précision dans la mesure des masses, mais leur prix élevé reste un handicap à leur diffusion. Nous n'en parlerons donc pas plus en détail.

Spectromètre à filtre quadrupolaire

La plupart des applications relevant de la spectrométrie de masse n'exigent pas des spectres de haute résolution. Aussi trouve-t-on, à côté des instruments précédents, d'autres montages aux performances plus modestes, mais moins coûteux et peu encombrants. C'est dans cette catégorie que se situent les appareils à champ électrique seul basés sur les filtres quadrupolaires, très utilisés comme détecteurs de masses dans la technique couplée CG/SM ainsi que dans nombre d'applications industrielles concernant le vide ou l'analyse des gaz.

Potentiel et champ électrique dans un filtre quadrupolaire

Un filtre quadrupolaire est **composé de quatre barres conductrices** de quelques décimètres de longueur, **raccordées électriquement deux à deux**, entre lesquelles ont été créés une **différence de potentiel** V_0 continue.

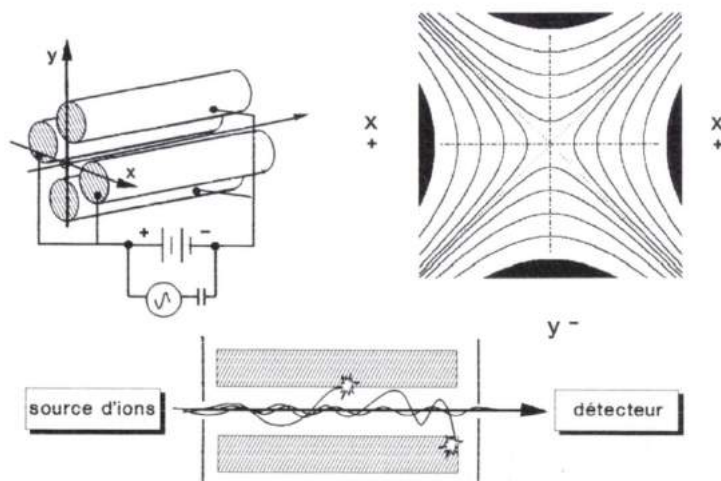


Figure 1.44. : Schéma de fonctionnement d'un spectromètre à filtre quadrupolaire : En haut, à gauche, illustration des barres conductrices. En haut à droite : lignes de champ dans une coupe transversale. En bas : trajectoires empruntées par les ions dans l'espace délimité par les barres conductrices.

Étude du trajet des ions dans un filtre quadrupolaire

Lorsqu'un **ion positif** entre dans le filtre, **les composantes de son vecteur vitesse dans les trois directions xyz vont déterminer sa trajectoire** qui sera, en général, complexe **sauf** dans deux cas bien particuliers :

- **composante de vitesse nulle suivant Oy** : dans ce cas, la trajectoire reste dans le plan xOy. L'ion se déplace entre deux parois chargées positivement qui le repoussent vers le centre, correspondant à une vallée de potentiel. Une transposition imagée est celle d'une bille que l'on lance dans l'axe d'une gouttière horizontale. **Le trajet central est favorisé**, même s'il existe une composante de vitesse selon Ox, auquel cas la bille effectuera des oscillations.
- **composante de vitesse nulle suivant Ox** : la trajectoire se situe dans le plan yOz ; la situation est différente de la précédente. L'ion, attiré vers les barres chargées négativement, est sur une bosse de potentiel, correspondant à une **trajectoire instable** (l'amplitude va dépasser r_0). Pour reprendre l'image précédente, il faudrait envisager cette fois une bille que l'on enverrait sur le dos d'une gouttière : on imagine aisément la trajectoire qu'elle suivrait !

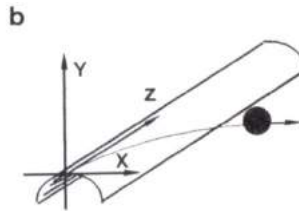
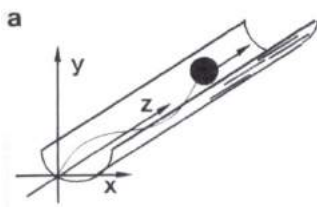


Figure 1.45. : Analogie de la trajectoire d'un ion avec celle d'une bille dans une gouttière :
a/ Cas où l'ion se trouve dans une vallée de potentiel. b/ Cas où l'ion se trouve sur un maximum de potentiel.

Utilisation d'un filtre quadrupolaire pour trier les ions

On superpose à la tension continue V_0 une tension alternative V_{RF} de fréquence ν et d'amplitude maximale V_M (ν est de l'ordre de 1,2 MHz et V_M/V_0 de 6).

$$V_{RF} = V_M \cos(2\pi \nu t)$$

Les tensions alternatives sont déphasées de π entre les deux jeux de barres. En chaque point, à l'intérieur du filtre, mis à part l'axe Oz, le potentiel varie, de même que le champ.

On obtient les équations du mouvement d'un ion à partir des forces F_x , F_y et F_z qui s'exercent sur lui. Ces équations de Mathieu permettent de définir des **trajectoires ayant la forme d'une hélice de tir-bouchon**.

Empiriquement, étudions à nouveau ce qui se passe dans les deux cas particuliers déjà abordés :

- **composante de vitesse nulle suivant Oy** : la trajectoire reste dans le plan xOz. Les parois devenant alternativement positives et négatives, les **ions lourds** auront une inertie trop grande pour suivre ces variations d'orientation du champ électrique : ils resteront **peu perturbés**. Par contre, les ions légers se mettront à osciller et ne pourront pas, en général, trouver le trou de sortie du filtre. On a réalisé ce qu'on appelle un **filtre passe-haut**.
- **composante de vitesse nulle suivant Ox** : la trajectoire restera dans le plan yOz. Les ions lourds vont continuer comme si de rien n'était, tandis que les **ions légers vont pouvoir être éventuellement récupérés**. On est en présence d'un **filtre passe-bas**.

Par **choix judicieux des potentiels V_0 et V_{RF}** , on démontre que le filtre **ne laisse passer qu'un petit intervalle en masses**, en particulier si $V_0/V_{RF} < 0,2$. En faisant varier cette bande passante, on sélectionne les ions de masses croissantes et on comprend qu'il soit ainsi possible d'obtenir un spectre de masse.

Spectromètre à piégeage d'ions

Un dernier type d'appareil est représenté par les pièges électriques à ions, par opposition aux pièges magnétiques des montages à résonance cyclotronique. Les **ions** sont **confinés entre des électrodes de formes particulières, soumises à des potentiels de radiofréquence**. Simples en apparence, mais complexes d'un point de vue fondamental, ces détecteurs à piégeage d'ions sont **plus sensibles que des filtres quadrupolaires**. Le volume délimité par les électrodes, dites supérieure, inférieure et annulaire, constitue à la fois la chambre d'ionisation et le filtre de masse.

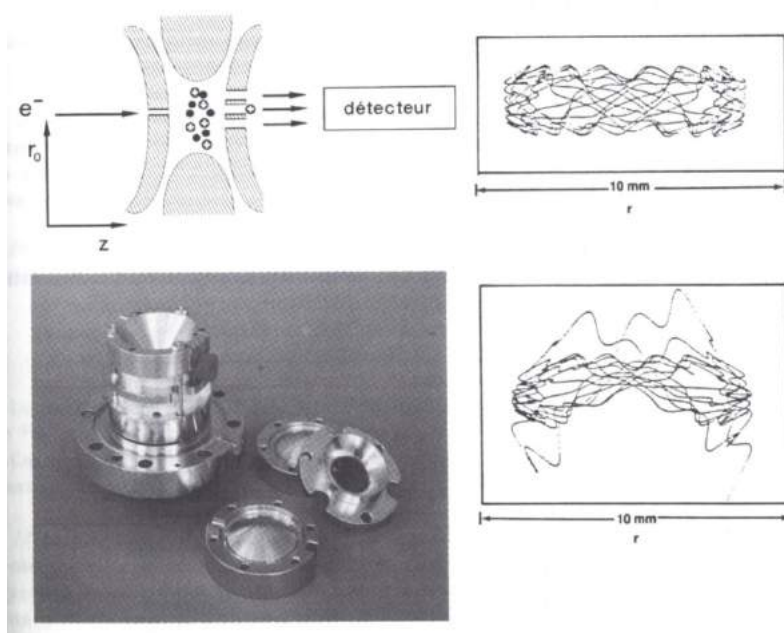


Figure 1.46. : Schéma d'un piège à ions : A gauche, en haut, coupe transversale d'un piège à ions. A gauche, en bas, photo d'un piège à ion. A droite : trajectoires complexes empruntées par les particules à l'intérieur du piège. Notez la déstabilisation dans le second cas.

Une approche qualitative du fonctionnement peut se résumer comme suit. Le **composé** introduit dans cette cavité est **ionisé par un bombardement d'électrons**, de très courte durée définie par une électrode de contrôle. Une **radiofréquence fixe**, appliquée à l'électrode annulaire, **confine les ions** formés dans l'espace central où ils **décrivent des trajectoires complexes, amorties par** effet d'une faible pression d'**hélium**, de l'ordre de 0,01 Pa. L'**analyse** des ions **se fait** en les extrayant dans l'ordre des masses croissantes **par augmentation de l'amplitude du champ de radiofréquence** : l'amplitude d'oscillation des ions croît dans la direction axiale et va jusqu'à conduire à leur **éjection vers les électrodes d'entrée ou de sortie**. Ceux qui traversent l'électrode de sortie, percée en son centre, **atteignent le détecteur** (channeltron). Par introduction conjointe de l'échantillon et d'un gaz réactant dans le piège on obtient, sans autres modification, une ionisation chimique.

Établissement des formules développées des composés moléculaires

La spectrométrie de masse permet d'obtenir des renseignements sur la composition atomique et surtout sur la structure des composés moléculaires, ce qui revêt une grande importance en chimie organique où l'analyse d'un composé peut se faire à plusieurs niveaux.

Détermination des formules brutes

Suivant le matériel dont on dispose, il existe plusieurs méthodes pour résoudre ce problème.

Méthode utilisant un appareil à haute résolution

La détermination de la masse d'un ion avec une grande précision, par la technique de "peak-matching", peut mener directement à la formule brute recherchée. **Toute ambiguïté est levée, dès lors que l'on connaît la nature des éléments présents et la masse avec quatre ou cinq décimales exactes.**

Aux débuts de la spectrométrie de masse, la seule solution consistait à rechercher dans des tables classées par masse et composition, la formule brute s'approchant le plus de celle déterminée expérimentalement. Maintenant les appareils proposent la formule brute la plus probable en fonction de la masse trouvée. L'algorithme de recherche tient compte des éléments que l'on suppose être présents afin de limiter les calculs.

Méthode utilisant un appareil basse résolution

Si l'appareil ne permet d'accéder qu'aux masses nominales, **on compare les intensités des pics de l'amas isotopique de l'ion parent** (pics M, M+1, M+2, etc.) car elles

reflètent les abondances isotopiques naturelles des éléments présents. Les amas isotopiques forment des combinaisons uniques pour chaque formule brute. L'utilisation de cette méthode ***pour déterminer la formule brute*** suppose que l'on dispose d'une table de valeurs calculées ou bien d'un ordinateur pour rechercher la formule brute dont l'amas isotopique s'approche le plus des valeurs expérimentales.

Pour les composés ne comportant que les éléments C, H, N, O, F, P, les intensités des pics M+1 et M+2 sont données par les formules simplifiées suivantes :

$$(M+1)\% = 1,1 n_C + 0,36 n_N$$
$$(M+2)\% = n_C(n_C - 1) \cdot 1,1^2/200 + 0,2 n_O$$

Le pic M+1 sera d'autant plus important que le nombre d'atomes de ^{13}C , de ^{15}N ou de ^{35}S sera plus grand. Par contre, le pic M+2 dépend de ^{18}O , ^{34}S , ^{37}Cl , etc.

Ces formules permettent aussi de déduire le nombre maximum de C dans un composé dont on connaît l'amas isotopique.

Méthode utilisant les ions moléculaires polychargés

Les masses moléculaires très élevées, rencontrées notamment en biochimie (protéines, glycoprotéines, polysaccharides, etc.), peuvent être déterminées par SM, en étudiant les ions polychargés (2... 10... 30... fois la charge de l'électron). En effet, ***plus la charge de l'ion est grande, plus on recule la limite en masse de l'appareil***, qui donne le rapport m/e (et directement la masse, dans tous les cas où la charge de l'ion est unitaire). Ainsi avec un appareil dont la limite est m/e = 4000, il est possible d'observer un ion de masse 120 000 si ce dernier est porteur de 30 charges élémentaires. Ces analyses sont couramment réalisées avec les procédés d'ionisation douce ***électrospray ou thermospray***.

Identification d'un composé à l'aide d'une spectrothèque

Plusieurs algorithmes de comparaison sont utilisés pour retrouver dans une spectrothèque quels sont les spectres les plus semblables à celui que l'on veut identifier. Généralement, la ***recherche est divisée en trois stades*** :

- ***Réduction des données***. Le spectre du composé est ramené à 16 pics au maximum, en donnant la préférence aux pics lourds, plus significatifs que les pics légers. De même, chaque spectre en bibliothèque est réduit à 8 pics.

- **Prérecherche.** On sélectionne les spectres réduits de la spectrothèque, ayant les ***pics aux mêmes positions que dans le spectre réduit du composé, même si l'intensité est différente.***
- **Recherche principale.** Enfin, la sélection précédente est reprise par un algorithme plus fin, qui, à partir de critères de choix ***faisant intervenir intensité, masse et rareté du pic,*** affecte un indice de 0 à 1000 (identité) à chaque spectre, ce qui permet de les classer par similarité croissante. Cet algorithme de pureté n'est pas unique. En modifiant les critères de choix, on peut évidemment affiner la recherche en procédant par recoupement entre divers classements.

Ce procédé est devenu d'usage courant pour l'analyse des composés répertoriés.

Règles de fragmentation

L'identification des composés avec l'aide d'une spectrothèque constitue une aide efficace, mais cette approche peut conduire à des erreurs. C'est pourquoi ***l'interprétation de la nature et l'origine des pics de fragmentation*** en masse reste toujours d'un grand intérêt. Des ouvrages spécialisés y sont consacrés. Elle nécessite une grande expérience. Le chimiste organicien y est généralement bien préparé, car il retrouve les mêmes types d'ions dans les mécanismes réactionnels en phases condensées, à la différence cependant que les ions se déplacent ici dans le vide et sans entrer en collision. Les temps de parcours étant très brefs, ***on peut envisager des espèces très instables.*** Toutes les liaisons n'ont pas la même prédisposition à se couper. En ionisation électronique, l'action commence par l'arrachement d'un électron de la molécule, appartenant à une liaison ou à un doublet libre. A ce stade, la molécule est ionisée, mais non fragmentée. Dans un second temps, l'ion moléculaire va pouvoir évoluer. Ainsi l'ionisation de l'isobutane peut conduire à la perte d'un radical méthyle, le cation isopropyle sera favorisé car il est thermodynamiquement plus stable que le cation méthyle.

Pour les composés qui comportent des hétéroatomes, l'ionisation se porte de préférence sur l'un d'eux. Les modes de décomposition sont plus nombreux. La fragmentation de la butanone fait ainsi apparaître l'ion acétyle 43, l'ion 57 étant 10 fois moins intense.

A côté de ces exemples élémentaires de fragmentation, il existe bien d'autres transformations possibles dans lesquelles les ions se réarrangent, quelquefois suivant des voies très complexes. Toutes ces transformations font l'objet de ***règles semi-empiriques*** qui sont utilisées dans l'étude des composés inconnus et qui servent aussi, plus simplement, à

contrôler les résultats auxquels conduisent les recherches automatisées avec les spectrothèques.

1.6. Spectroscopie IR

Tout d'abord, notons qu'en spectroscopie IR on fera plus souvent référence au **nombre d'onde** d'un rayonnement qu'à sa fréquence ou sa longueur d'onde. Il faut dès lors savoir que le nombre d'onde ($\bar{\nu}$) représente le **nombre d'oscillations de l'onde par unité de longueur** et est ainsi défini comme : $\bar{\nu} = 1 / \lambda$ avec la longueur d'onde dans le vide exprimée en cm. **L'unité du nombre d'onde est donc le cm^{-1} .**

Rappelons à présent que la région IR du spectre comprend la région de longueur d'onde comprise entre environ 0,78 et 1000 μm (ou de nombre d'onde de 12 800 à 10 cm^{-1}). Il est utile, tant sur le plan des applications que sur le plan de l'instrumentation, de diviser cette zone du spectre en trois régions :

- L'infrarouge proche : 12 800 à 4000 cm^{-1}
- L'infrarouge moyen : 4000 à 200 cm^{-1}
- L'infrarouge lointain : 200 à 10 cm^{-1}

Notons également dès à présent que la zone la plus intéressante sur le plan analytique se situe entre 4000 et 670 cm^{-1} .

La spectroscopie IR trouve des applications très étendues sur le plan des **analyses tant qualitatives que quantitatives**. Son utilisation la plus courante est l'identification de composés organiques parce que le spectre d'un composé organique, généralement complexe, représente une de ses propriétés physiques caractéristiques : si l'on excepte le cas des isomères optiques, **deux substances ne possèdent jamais de spectres identiques**.

Outre ses possibilités remarquables comme outil d'analyse qualitative, la spectroscopie IR offre des utilisations intéressantes sur le plan quantitatif : son atout majeur est la **sélectivité** qui rend possible une détermination d'une substance inconnue dans un mélange complexe sans séparation préalable. Ces applications sont cependant limitées, pour divers motifs que nous expliciterons ultérieurement. Les plus importantes d'entre elles se rapportent à la mesure de polluants atmosphériques provenant de processus industriels (autant dire que vous risquez peu d'y être confrontés).

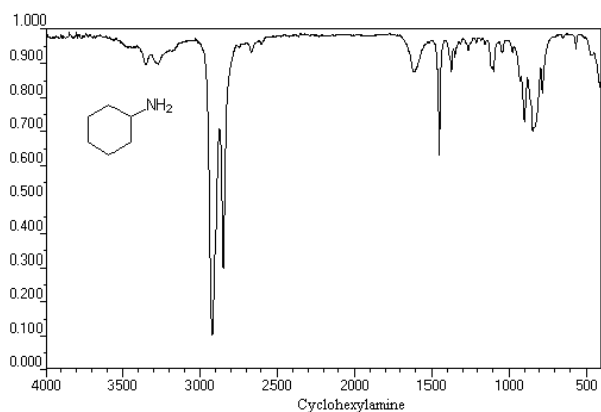


Figure 1.47. : Spectre d'absorption IR de la cyclohexylamine : L'ordonnée est donnée en transmission et l'abscisse est linéaire en nombres d'onde (cm^{-1}). C'est sous cette forme que son habituellement présentés les spectres d'absorption IR, mais il peut arriver que l'ordonnée soit donnée en absorbance et / ou l'abscisse en longueur d'onde.

La figure 1.47 nous servira de base pour faire quelques remarques sur le mode de présentation des spectres IR. **L'ordonnée est généralement donnée en transmission**, bien que certains enregistrements soient représentés en absorbance. D'autre part, **l'abscisse est linéaire en nombre d'onde** et, bien que cette terminologie ne soit pas correcte, les spectroscopistes utilisent fréquemment le terme fréquence en lieu et place de nombre d'onde.

Aspect théorique

Nous avons vu que pour obtenir des transitions électroniques, il est nécessaire de recourir à des énergies dans le visible et l'UV. L'absorption IR est pour sa part confinée principalement à des transitions moléculaire de type vibrationnel et rotationnel. **Pour qu'une molécule puisse absorber une radiation IR, elle doit subir une modification de son moment dipolaire, lors de son mouvement vibrationnel ou rotationnel.** Ce n'est que sous cette condition que le champ alternatif du rayonnement interagira avec la molécule et provoquera un changement d'amplitude du mouvement considéré. Par exemple, la distribution de charge d'une molécule telle que HCl n'est pas symétrique, le moment dipolaire étant déterminé par l'importance de la différence de charge et la distance entre les deux centres de charge. Si la molécule HCl vibre longitudinalement, on observe une fluctuation régulière de son moment dipolaire. Si la fréquence du rayonnement correspond à celle de la fréquence naturelle de vibration de la molécule, un transfert d'énergie se produit : le résultat en est une augmentation de l'amplitude de vibration. De la même manière, la rotation asymétrique autour de leur centre de masse a pour résultat une variation dipolaire asymétrique : de nouveau, une interaction avec le rayonnement incident de fréquence ad hoc est possible.

Notons que **les molécules homopolaires telles que O_2 , N_2 , Cl_2 , etc. ne subissent pas de variation de moment dipolaire lors de leur vibration ou de leur rotation : elles ne peuvent pas absorber dans l'IR.**

Transition de rotation

L'**énergie** requise pour induire un mouvement **de rotation est très faible** : elle correspond au rayonnement de 100 μm ou plus ($\leq 100\text{ cm}^{-1}$). Comme **les niveaux de rotation sont quantifiés** (ce que je vous demande de croire sur parole, à moins que vous ne désiriez vraiment la démonstration), **l'absorption par les gaz dans cette zone de l'IR lointain est caractérisée par des raies discrètes** bien définies pour autant que l'appareillage puisse détecter l'IR lointain et que sa résolution soit suffisante ($< 1\text{ cm}^{-1}$). **Dans les liquides et les solides, les collisions entre les molécules font disparaître cette structure fine et on observe des bandes vibro-rotationnelles plus larges.**

Transition de vibration-rotation

Les **niveaux vibrationnels d'énergie sont aussi quantifiés** (comme nous allons le voir ultérieurement) et les **différences énergétiques entre niveaux correspondent aux régions aisément accessibles du spectre IR** : environ 0,75 à 15 μm ($1300 - 675\text{ cm}^{-1}$). Le spectre IR d'un gaz consiste, en général, en des séries de raies rapprochées, parce qu'il y a plusieurs niveaux rotationnels d'énergie par état vibrationnel. **Par contre, la rotation est inhibée dans les liquides et les solides : dans de tels échantillons, les raies discrètes vibro-rotationnelles disparaissent, le résultat étant des pics vibrationnels quelque peu élargis.** Nos préoccupations se limitent principalement aux spectres de solides, liquides et solutions dans lesquelles les effets rotationnels sont minimaux.

Types de vibrations moléculaires

Les positions relatives des atomes dans une molécule ne sont pas exactement fixées mais fluctuent de manière continue en raison de divers types de vibrations. Pour des molécules diatomiques ou triatomiques, il est aisé de définir le nombre et la nature de telles vibrations et de faire la relation entre celles-ci et les énergies d'absorption. Une telle analyse devient difficile, sinon impossible pour des molécules polyatomiques, non seulement en raison du grand nombre de centres de vibration, mais aussi à cause des interactions entre ces centres de vibration.

Il y a **deux types généraux de vibration : élongation (vibration de valence) et déformation**. Une **élongation** consiste en une **variation de longueur** d'une liaison entre deux atomes, tandis qu'une **déformation** consiste en la **variation d'un angle** entre deux liaisons.

La figure 1.48 représente les divers types de vibration d'un groupe de formule générale XY_2 . Tous ces types de vibration sont possibles dans une molécule contenant plus de deux atomes.

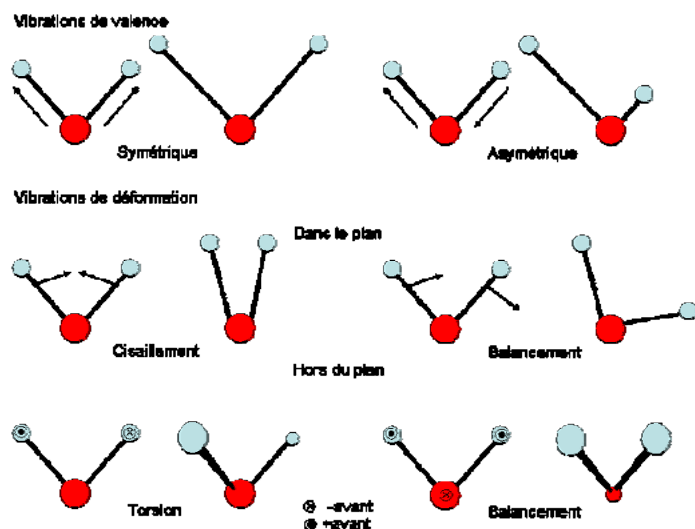


Figure 1.48. : Modes de vibration d'un groupement plan XY_2 : Les schémas du dessus représentent les vibrations de valence (élongation) symétrique (gauche) et asymétrique (droite). Les schémas du milieu représentent les vibrations de déformation, dans le plan, de cisaillement (gauche) et de balancement (droite). Finalement, les schémas du bas représentent les vibrations de déformation, hors du plan, de torsion (gauche) et de balancement (droite).

Aspect pratique

Composition d'un spectromètre d'absorption IR (non FTIR)

Schéma général

Sur le plan des principes, l'instrumentation utilisée en absorption IR est identique à celle utilisée en UV-Vis (figure 1.49). Seuls diffèrent la nature de la source, des matériaux optiques (sur le plan de la transparence, dispersion, résolution, etc.) et des détecteurs. En outre, cette fois, la sélection de la longueur d'onde, se fait plutôt en aval de l'échantillon. Il est à noter que les appareils à transformée de Fourier, dont nous parlerons un peu plus ultérieurement, remplacent également de plus en plus les monochromateurs optiques.

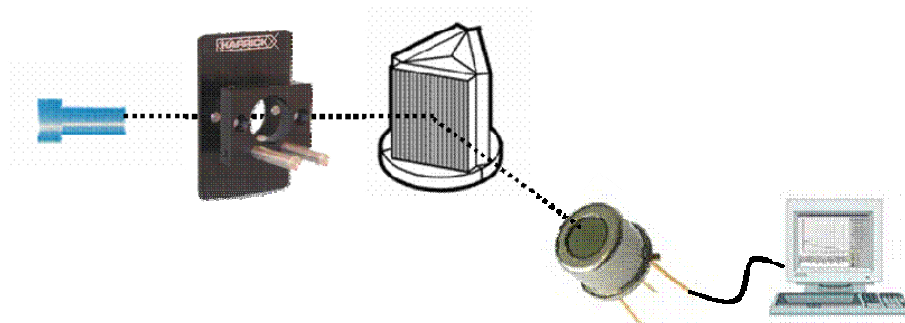


Figure 1.49. : Schéma général d'un spectromètre d'absorption IR : Une source de rayonnement (ici, une lampe), un échantillon (ici, une pastille KBr), un monochromateur (ici, un réseau), un détecteur (ici, un détecteur pyroélectrique) et un système de traitement du signal (ici, un ordinateur).

Sources

Filament de Nernst (Nernst Glower) : Il s'agit d'un cylindre ($l = 20 \text{ mm}$, $\varnothing = 1 \text{ à } 2 \text{ mm}$) d'oxydes de terres rares auquel sont reliés des fils de platine servant de conducteurs électriques. La résistance du système présente un **coefficient de température négatif** (c'est-à-dire que la résistance diminue si la température augmente) : il doit en pratique être chauffé au rouge sombre par une source externe pour que le courant puisse passer avec une intensité suffisante. En raison de ce coefficient de température négatif, le circuit doit nécessairement **limiter le courant de manière à éviter une auto-destruction du système**.

Globar : Il s'agit toujours d'un cylindre ($l = 50 \text{ mm}$, $\varnothing = 5 \text{ mm}$), mais cette fois de SiC chauffé électriquement qui présente sur le système précédent l'avantage d'un **coefficient de résistance positif**. Les connexions requièrent cependant un refroidissement par eau. Les domaines spectraux du filament de Nernst et du Globar sont comparables, sauf dans la région $< 5000 \text{ nm}$ ($> 2000 \text{ cm}^{-1}$) où le Globar fournit un rayonnement d'intensité plus forte.

Fils incandescents : Un fil de nichrome ou de rhodium enroulé en spirale et échauffé électriquement fournit une **source de vie plus longue** qu'un Globar ou un filament de Nernst, mais aussi d'**énergie radiante plus faible**.

Échantillons

Nature et techniques de préparation : Comme nous l'avons vu, les spectres IR sont obtenus le plus souvent à partir de **solutions diluées**, la valeur optimale de l'absorbance étant obtenue par ajustement de la concentration ou de la longueur de la cellule. Malheureusement, en raison de l'origine même des spectres IR, **il n'existe aucun solvant qui soit transparent dans tout le domaine IR**. En conséquence, dans l'IR, on doit souvent utiliser des techniques qui rendent la mesure précise et exacte du coefficient d'absorption molaire difficile voire impossible. Nous discuterons ci-dessous quelques techniques propres à l'absorption IR.

Échantillons gazeux : Le spectre d'un liquide à bas point d'ébullition, ou d'un gaz, peut être obtenu en introduisant l'échantillon dans une cellule préalablement mise sous vide. On dispose ainsi de cellules dont les trajets lumineux peuvent atteindre plusieurs mètres (cellules compactes avec réflexions internes).

Solutions : La figure 1.50 donne la liste des solvants les plus courants utilisés pour l'étude du spectre IR de substances organiques. Cette figure montre clairement qu'aucun solvant ne peut couvrir ne fût-ce que la zone IR moyen. CS₂ et CCl₄ sont assez complémentaires : toutefois CS₂ ne dissout que peu de substances.

L'eau et les alcools sont rarement utilisés, non seulement parce qu'ils absorbent fortement, mais parce qu'ils **attaquent les halogénures alcalins qui constituent les matériaux les plus courants des fenêtres des cellules**. Pour ces raisons aussi, les divers **solvants utilisés doivent être desséchés avant usage**. Notons que pour des solutions contenant un peu d'eau, on peut utiliser des matériaux de fenêtre plus résistants : AgCl ; Irtran-1 (MgF₂), Irtran-2 (ZnS) ; Irtran-4 (ZnSe). En particulier, l'Irtran-2 se travaille bien pour obtenir un poli optique.

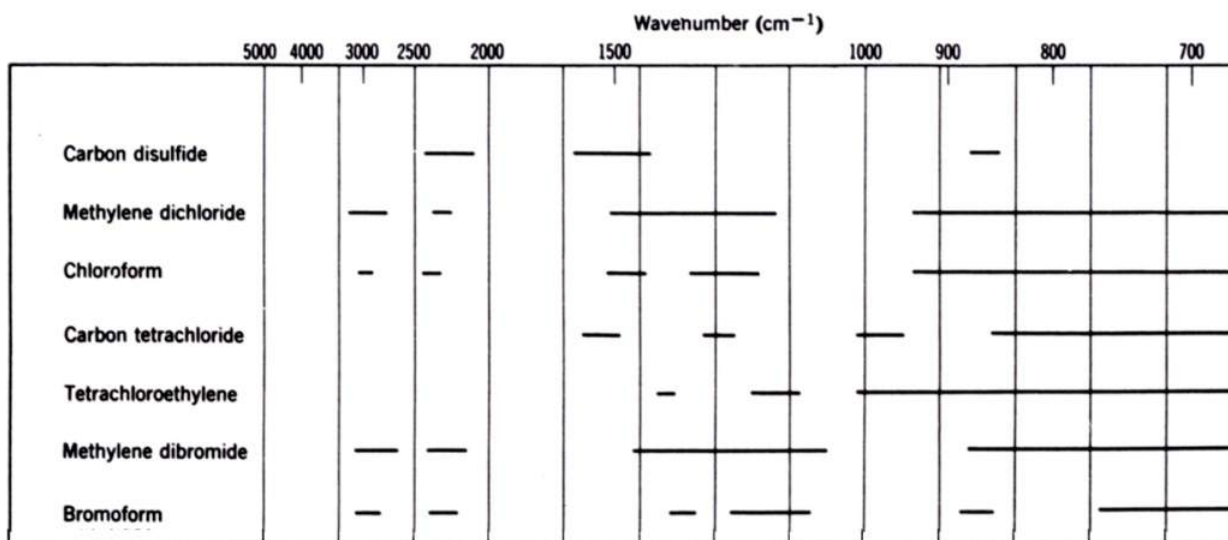


Figure 1.50. : Tableau des solvants les plus courants utilisés en spectroscopie d'absorption IR : Les régions « ouvertes » sont celles pour lesquelles le solvant transmet plus de 25 % de la lumière incidente pour 1 mm d'épaisseur.

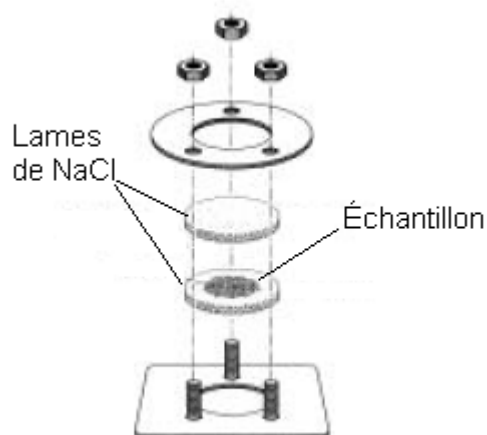
En raison de l'absorption lumineuse par les solvants, les cellules IR ont, en général, **un trajet lumineux court** (quelques centièmes de mm à 1 mm). Ces cellules sont le plus souvent démontables (figure 1.51) et sont constituées de deux lames parallèles de matériau transparent, séparées par une mince feuille de plomb, cuivre, téflon... munie d'un orifice permettant le remplissage. L'épaisseur de cette feuille, ou « spacer », fixe la longueur du trajet optique. Pour des travaux quantitatifs, l'épaisseur des cellules doit être contrôlée : elles s'utilisent par paires lorsqu'on emploie la technique classique de mesure de $\frac{I_{\lambda}'}{I_{\lambda}}$. Notons qu'existent également des cellules d'épaisseur réglable avec précision.



Figure 1.51. : Vue éclatée d'une cuve d'absorption IR pour solutions.

Liquides purs : Quand la quantité d'échantillon est faible ou qu'un solvant adéquat n'existe pas, il est courant d'enregistrer le spectre sur le liquide pur. La technique la plus utilisée (figure 1.52) consiste à presser une goutte de liquide entre deux lames de matériau transparent (NaCl ou KBr sont souvent utilisés). On obtient ainsi une épaisseur assez mal définie de 0,01 mm ou moins. Une telle technique donne de bons résultats en **analyse qualitative**.

Figure 1.52. : Vue éclatée d'un système à lamelles de NaCl : Une goutte d'échantillon liquide est déposée entre deux lamelles de NaCl qui sont ensuite pressées pour former un film de faible épaisseur.



Solides : Pour les échantillons solides qui ne peuvent être dissous dans un solvant adéquat, plusieurs techniques peuvent être envisagées :

- Si la substance est fusible, sans décomposition, on peut en réaliser une **couche mince par fusion sur une lame de NaCl**, par exemple (cette technique est rarement utilisée en pratique).
- Sinon, on réalise une **suspension de l'échantillon dans un milieu non absorbant** dans la zone à étudier. Une condition essentielle pour l'obtention de spectres satisfaisants est que les dimensions des particules en suspension soient plus petites que la longueur d'onde du rayonnement. Si cette condition n'est pas réalisée, les pertes lumineuses par diffusion deviennent importantes. Deux milieux liquides sont couramment utilisés : la paraffine (nujol) ou le perfluorokérosène (fluorolube). Ce dernier milieu est utilisé quand les bandes CH sont susceptibles de gêner. Dans les deux cas, la suspension (2 – 5 mg d'échantillon ; particules < 2 µm) est pressée entre

deux lames transparentes. On peut aussi utiliser la **technique des pastilles** qui consiste à broyer 1 à quelques mg d'échantillon avec 200 mg de KBr sec et à presser le mélange à 1 à plusieurs tonnes par cm^2 pendant quelques minutes de manière à obtenir une pastille homogène. De meilleurs résultats sont obtenus si l'air occlus est éliminé par pressage sous vide. Le disque est utilisé tel quel dans le faisceau lumineux. En dépit des précautions, l'humidité absorbée conduit à l'apparition de bandes à 3400 et 1600 cm^{-1} .

Monochromateurs

Cfr. Spectromètre d'émission atomique. En général, c'est un monochromateur à réseau qui est utilisé dans les spectromètres d'absorption IR.

Exemples de Détecteurs

Thermocouple : Ce type de détecteur est largement utilisé dans l'IR. Sous sa forme la plus simple, le thermocouple est réalisé par jonction de deux pièces d'un métal donné avec les extrémités d'une pièce d'un autre métal ou alliage. **Une différence de potentiel se développe entre les deux jonctions lorsqu'elles se trouvent à des températures différentes.** Contrairement aux détecteurs précédents, les thermocouples ont une réponse non sélective en λ . En pratique, les jonctions utilisées pour la détection dans l'IR sont formées de très fins fils de métal tels que Bi-Ag, Pt-Sb, etc. Pour augmenter la sensibilité, on réalise de telles soudures en série (piles thermoélectriques) avec alternance de soudures chaudes (celles recevant le rayonnement) et froides (référence). Les soudures chaudes sont noircies pour mieux absorber les radiations à mesurer. Elles sont scellées sous vide dans une enceinte munie d'une fenêtre transparente aux radiations à mesurer.

Détecteur de Golay : Il s'agit essentiellement d'un thermomètre à gaz sensible : une enceinte étanche de forme cylindrique contient du xénon et une membrane noircie destinée à absorber le rayonnement incident qui pénètre par une fenêtre transparente à l'IR. L'autre face du cylindre est faite d'un diaphragme flexible dont le côté extérieur est argenté. Un faisceau lumineux est réfléchi sur cette face vers la cathode d'un photo-tube. Lorsque le rayonnement incident pénètre le tube, la membrane noircie s'échauffe et chauffe à son tour le xénon qui, en se dilatant, déforme le diaphragme : la fraction de lumière réfléchie qui frappe la photocathode est modifiée, ce qui produit une variation du courant qui dépend de l'énergie dissipée dans le gaz par le rayonnement IR (figure 1.53). Le détecteur de Golay est

plus coûteux que les autres détecteurs de type thermique, mais n'est **pas plus sensible** dans l'IR proche ou moyen. Il est par contre **supérieur dans le domaine de l'IR lointain**. Le détecteur de Golay a une réponse plus rapide que le thermocouple.

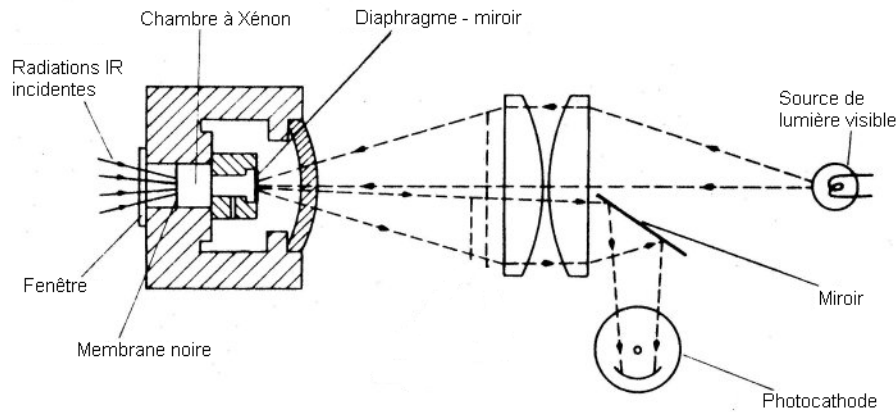


Figure 1.53. : Schéma de la coupe transversale d'une cellule de Golay : Des radiations incidentes IR traversent la fenêtre de la cellule et sont absorbées par la membrane noire. Cette dernière s'échauffe et chauffe le xénon emprisonné dans la cellule. La dilatation de ce dernier modifie la géométrie du diaphragme argenté qui se situe à l'extrémité de la cellule et sur lequel se réfléchit une lumière incidente visible. Ce phénomène entraîne une modification du signal reçu par la photocathode et donc de l'intensité électrique mesurée. Cette différence d'intensité électrique sera donc fonction de la quantité de radiations IR incidentes.

Spectromètre d'absorption IR à transformée de Fourier (IRTF ou, en anglais FTIR = Fourier Transform Spectroscopy)

Le principe de fonctionnement d'un spectromètre IRTF **repose sur l'utilisation d'un interféromètre** (la plupart du temps de type Michelson). Autrefois très chers et réservés aux laboratoires spécialisés, on les retrouve à présent un peu partout.

Comparons à présent la STF (spectroscopie par transformée de Fourier) à la dispersion conventionnelle :

- 1) **L'avantage essentiel de la spectroscopie par transformée de Fourier s'appelle l'avantage de Fellgett.** Dans un instrument dispersif conventionnel, chaque élément de résolution est observé seulement pendant la fraction du temps total d'enregistrement. Le rapport signal sur bruit (S/N) est alors proportionnel à $(T/M)^{1/2}$ où T est le temps total d'enregistrement et M, le nombre d'éléments de résolution observés pendant ce temps T (c'est-à-dire la largeur totale du spectre à enregistrer divisé par la résolution utilisée). Dans un spectromètre à transformée de Fourier, **chacun des éléments de résolution est observé pendant tout le temps d'enregistrement**, puisque toutes les fréquences atteignent le détecteur en continu.

Ici, $M = 1$ et $S/N \propto (T)^{1/2}$. L'avantage théorique entre les deux types de disperseurs est donc de $(M)^{1/2}$.

- 2) Un autre avantage est dénommé l'**avantage de Jacquinot**. Puisqu'il n'y a pas de fente dans spectromètre TF, Jacquinot a montré qu'il est théoriquement possible de **laisser entrer plus de lumière** dans un spectromètre TF que dans un monochromateur classique. En pratique, toutefois, cet avantage est **compensé par d'autres inconvénients** :
 - Il est **nécessaire d'utiliser des collimateurs** (qui réduisent donc la luminosité) pour rendre la lumière aussi parallèle que possible.
 - Le **séparateur présente une forte perte de lumière par réflexion et par absorption**.
- 3) En pratique, ce type d'appareil sera utilisé avec profit surtout pour les **applications demandant une grande sensibilité** (spectroscopie IR par émission, analyse dans l'IR lointain, analyse de gaz, de microéchantillons ou analyses ultra-rapides). Le gain en sensibilité est au moins d'un facteur 10 et un spectre IR peut être enregistré en moins d'une seconde avec une résolution moyenne.

Applications de la spectroscopie d'absorption IR

Analyse qualitative

Nous avons vu que **la fréquence approximative à laquelle un groupe fonctionnel organique tel que C=O, C=C, CH₃, C≡C, etc. absorbe une radiation IR peut être calculée à partir de la masse des atomes et de la constante de force de la liaison**. Ces fréquences appelées fréquences de groupements fonctionnels varient quelque peu d'une molécule à l'autre en raison d'interactions avec d'autres vibrations affectant l'un ou l'autre des atomes du groupement. Cependant, en général, l'effet de telles interactions est fréquemment faible, et dès lors, on peut avec une probabilité élevée, prévoir la zone de spectre dans laquelle on trouvera le pic correspondant à un groupement fonctionnel donné. A ce stade, **on peut donc établir** avec un certain degré de confiance **la présence ou l'absence d'un groupement fonctionnel donné**. Au cours des décennies, on a accumulé une somme importante de données expérimentales concernant la zone de fréquence à laquelle on peut s'attendre, en pratique, à trouver l'absorption de divers groupements fonctionnels. Les tables rassemblent des telles données sous une forme directement utilisable pour l'identification. La figure 1.54 reprend une version simplifiée de ces

nombreuses tables de corrélation qui peut servir de point de départ dans le processus d'identification d'une molécule.

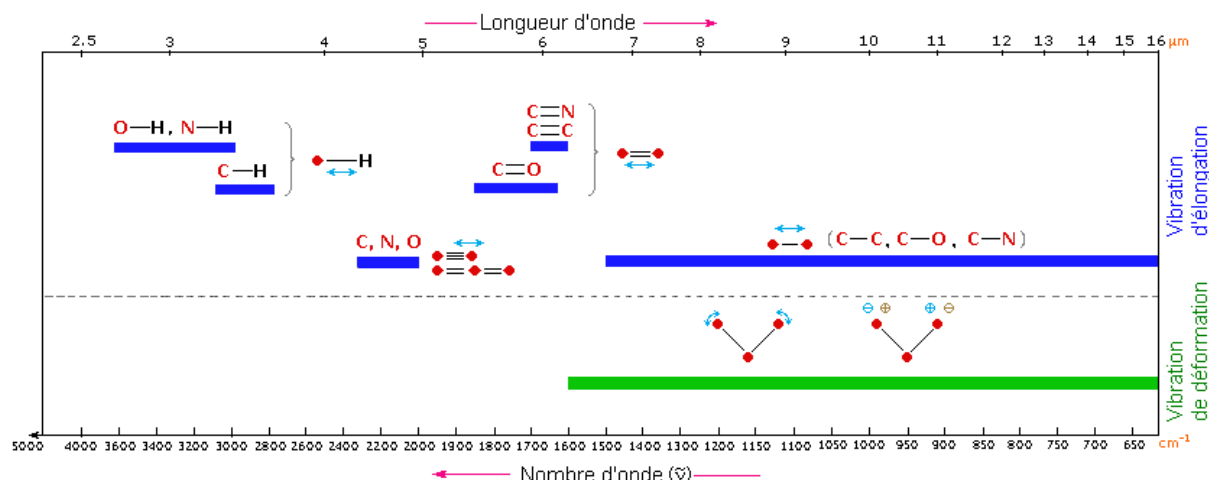


Figure 1.54. : Table de corrélation simplifiée : Les plages d'absorption correspondant à des vibrations d'élongation sont indiquées en haut et les plages d'absorption correspondant à des vibrations de déformation sont indiquées dans le bas.

Le chimiste intéressé à l'identification d'un composé organique examinera d'une manière systématique, certaines **régions bien choisies du spectre**.

Région de vibration de valence de l'atome d'H : $3700 - 2700 \text{ cm}^{-1}$: Des pics d'absorption intenses dans cette région proviennent souvent de la vibration de valence entre H et un autre atome (C, O, N). L'atome **H lui-même est l'espèce qui se déplace** en ordre principal, puisqu'il est beaucoup plus léger que les autres atomes avec lesquels il est susceptible d'être lié : en conséquence, **l'absorption n'est guère affectée par le reste de la molécule**. En outre, la fréquence de cette vibration est beaucoup plus élevée que celle des autres liaisons chimiques et dès lors, l'interaction de cette vibration avec les autres est souvent faible.

- Des pics dans la zone **$3700 - 3100 \text{ cm}^{-1}$** sont souvent dus aux vibrations de valence **O-H et N-H**, les premières apparaissent souvent pour des $\bar{\nu}$ plus élevés. Les bandes **OH sont souvent plus larges que les bandes NH** et apparaissent seulement dans les solvants non polaires en milieu dilué. En effet, les liaisons par ponts hydrogène élargissent les pics et les déplacent vers des $\bar{\nu}$ plus faibles.
- Les vibrations **C-H aliphatiques se trouvent dans la région $3000 - 2850 \text{ cm}^{-1}$** . La plupart des composés aliphatiques ont suffisamment de liaison C-H pour qu'on observe un pic important dans cette zone. **Toute variation structurale affectant la force de liaison C-H sera la cause d'un déplacement du maximum du pic** : par

exemple, la bande C-H dans un groupe Cl-C-H se trouve juste au-dessus de 3000 cm^{-1} comme les C-H des oléfines et des aromatiques. Par contre, la C-H acétylénique se trouve à 3300 cm^{-1} . L'hydrogène d'un aldéhyde -CHO produit un pic distinct dans la zone 2745 – 2710 cm^{-1} . Le remplacement de H par le deutérium provoque un déplacement vers des $\bar{\nu}$ plus faibles par un facteur $\approx \frac{1}{2}$, ainsi que permet de le prévoir la théorie. Cet effet est utilisé pour l'identification des pics de valence C-H.

Région des liaisons triples : 2700 – 1850 cm^{-1} : Un nombre limité de groupes absorbe dans cette région, leur présence est donc aisément visible. On peut citer les zones suivantes :

- C $\equiv$ N : 2250 – 2225 cm^{-1}
- N $^+ \equiv$ C $^-$: 2180 – 2120 cm^{-1}
- C $\equiv$ C : 2260 – 2190 cm^{-1}

Dans cette région sont également situés les pics de vibration X-H, avec X = S, P, Si

- S-H : 2600 – 2550 cm^{-1}
- P-H : 2440 – 2350 cm^{-1}
- Si-H : 2260 – 2090 cm^{-1}

Région des liaisons doubles : 1950 – 1550 cm^{-1} : La vibration de valence C=O absorbe dans cette zone. Cétones, aldéhydes, acides, amides et carbonates ont tous des pics d'absorption aux environs de 1700 cm^{-1} . Les esters, les chlorures d'acide et les anhydrides organiques absorbent vers 1770 – 1725 cm^{-1} . Le processus de conjugaison tend à abaisser le pic d'absorption d'environ 20 cm^{-1} . Au vu de ce grand nombre de possibilités, on réalise qu'il est fréquemment **impossible de déterminer la nature d'un groupe C=O uniquement sur la base de l'absorption dans cette zone** ; cependant, l'examen d'autres régions spectrales permet parfois de lever le doute : c'est ainsi que les **esters ont une forte bande de valence C-O-R à 1200 cm^{-1}** tandis que les **aldéhydes**, comme nous l'avons déjà vu, présentent une **bande C-H juste au dessus de 2700 cm^{-1}** . Les pics d'absorption des vibrations de valence C=C et C=N sont situés dans la zone 1690 – 1600 cm^{-1} . Des informations précieuses relatives à la structure des oléfines peuvent être déduites de la position exacte de tels pics. La zone **1650 – 1450 cm^{-1} est importante en ce qui concerne les dérivés aromatiques**. Les composés aromatiques présentant peu de substituants possèdent 4 pics aux environs de 1600, 1580, 1500 et 1460 cm^{-1} . Le nombre et la dispersion de ces substituants produisent des modifications spectrales prévisibles, mais indépendantes de la nature des substituants.

Région de 400 à 1650 cm^{-1} : Dans cette région sont situées les bandes de vibration de valence des liaisons simples C-C et C-X (X = O, N, S, halogènes) ainsi que les bandes des modes de déformation de nombreuses liaisons simples. La position de ces bandes est très sensible aux changements de structure, si bien que leur ensemble peut être considéré comme caractéristique d'une substance bien définie. En particulier, **le domaine spectral**

compris entre 650 et 1350 cm⁻¹, appelée région des empreintes, présente un spectre complexe qui résulte d'interactions entre liaisons voisines : il dépend donc de la structure même du squelette de la molécule. L'interprétation complète du spectre dans cette zone est rarement possible en raison de sa complexité. Cependant, cette complexité même conduit à un spectre caractéristique de chaque substance, ce qui est extrêmement utile pour l'identification de la substance par comparaison. Quelques groupements fonctionnels importants ont, en outre, des vibrations caractéristiques dans cette zone, notamment :

- Vibration de valence de C-Cl entre 700 et 800 cm⁻¹.
- Vibration de valence de C-O-C des esters et des éthers vers 1200 cm⁻¹.
- Des groupements organiques tels que SO₄²⁻, PO₄³⁻, NO₃⁻, CO₃²⁻ absorbent également en dessous de 1200 cm⁻¹.

En analyse fonctionnelle, c'est-à-dire pour identifier des groupements, les tables et les règles de corrélation donnent d'excellents résultats, à condition de procéder par recoupements en utilisant toutes les régions du spectre, ce qui permet de faire les contrôles nécessaires ; par exemple, nous avons vu qu'une raie vers 1700 cm⁻¹ est caractéristique d'un groupe carbonyle. La présence additionnelle d'une bande forte vers 1200 cm⁻¹ permet d'affirmer qu'on a affaire à un ester. La situation est toute différente si on veut identifier sans ambiguïté une substance pure ou une substance dans un mélange, ou contrôler la pureté d'une substance.

Il est clair que dans le domaine de **l'identification d'une substance pure**, les tables de corrélation ne constituent que le premier pas vers la solution. Une identification sans ambiguïté doit reposer sur la connaissance d'autres propriétés telles que la température de fusion, d'ébullition, l'indice de réfraction, la densité, l'analyse élémentaire, etc. A ce stade, le problème est grandement simplifié et sa résolution est aisée si on dispose d'une bibliothèque de spectres. Dans ces conditions, la spectroscopie d'absorption IR constitue une des méthodes les plus rapide, sûre et bon marché pour identifier une substance inconnue.

La spectroscopie IR permet également d'identifier une substance dans un mélange. Il arrive, en effet, fréquemment en synthèse organique, qu'une réaction ne donne pas un produit pur, mais un mélange parfois complexe d'isomères, par exemple. Dès lors, connaissant le spectre des différents isomères purs, il est possible de déceler sans ambiguïté les isomères présents dans un mélange, en utilisant les bandes caractéristiques de chacun d'eux.

Finalement et dans la même optique, la spectroscopie IR permet de facilement **tester la pureté des substances** solides et des liquides, comme les solvants, par exemple. Le contrôle est réalisé partiellement sur un appareil à double faisceau : en comparant

l'échantillon dans la cellule de mesure avec la substance pure dans la cellule de référence, seules les bandes des impuretés apparaissent. En général, on peut dire que la limite de détection atteinte est loin d'être aussi basse qu'en absorption UV. En moyenne, on ne dépasse guère le dixième de pourcent en poids pour une épaisseur de cuve de 1 cm. Il existe cependant des cas favorables, comme la recherche d'une impureté fortement absorbante présente dans un solvant qui l'est peu.

Analyse quantitative

En principe, l'analyse quantitative par absorption IR **repose**, comme dans le cas de l'absorption atomique et de l'absorption UV-Vis., **sur la loi de Beer-Lambert**. En pratique, toutefois, la loi de Beer-Lambert est, le plus **souvent** dans le cas présent, **sujette à des écarts pour les raisons suivantes** :

La condition de monochromaticité : difficile à respecter parce que

- les **bandes d'absorption IR** sont nettement **plus fines** que les bandes d'absorption UV-Vis.
- les **sources IR émettent peu d'énergie** et l'ensemble des composants optiques transmet moins bien la lumière, si bien que l'on est obligé, pour obtenir un signal suffisant au niveau du détecteur, d'utiliser des bandes passantes qui ne sont pas de largeur faible vis-à-vis de la bande d'absorption. Les courbes analytiques résultantes ne sont pas droites.

La lumière diffuse (parasite) dans le monochromateur : peut atteindre un niveau gênant. En effet, surtout aux grandes longueurs d'onde, l'énergie de la source devient de plus en plus faible, alors que la lumière totale entrant dans le monochromateur est élevée : la lumière parasite est proportionnelle à cette lumière totale. Il existe toutefois des moyens techniques pour améliorer la situation.

La planéité et le parallélisme des fenêtres : difficile à obtenir.

Sensibilité à l'environnement : Fonction de la concentration du soluté, de la nature du solvant, etc.

Dès lors, en absorption IR quantitative, on emploie le plus souvent des courbes d'étalonnage empiriques, mais on préfère en général avoir recours à une autre technique qui se prête mieux aux analyses quantitatives (comme l'absorption UV-Vis, par exemple).

La chromatographie et l'électrophorèse.

2.1. Introduction

Définition

La chromatographie, **méthode d'analyse physico-chimique**, sépare les constituants d'un mélange (les solutés) par **entraînement au moyen d'une phase mobile** (liquide ou gaz) **le long d'une phase stationnaire** (solide ou liquide fixé), grâce à la répartition sélective des solutés entre ces deux phases. Chaque soluté est donc soumis à une **force de rétention** (exercée par la phase stationnaire) **et une force de mobilité** (due à la phase mobile).

Les différents types de techniques chromatographiques

La **classification** des chromatographies peut se faire **en fonction des mécanismes de séparation**. Les facteurs qui interviennent dans le partage des molécules à séparer entre les phases fixe et mobile sont : la solubilité dans un solvant liquide, la taille (la forme), la polarité, la charge électrique, la présence de groupements d'atomes formant des sites particuliers. Les différents types de chromatographie résultent du fait que l'on a privilégié l'effet de l'un de ces facteurs, mais **l'exclusivité d'un mécanisme n'est jamais totale** au cours d'une séparation chromatographique.

Chromatographies en phase liquide (CPL ou CL ou encore LC pour liquid chromatography en anglais)

Dans ce cas, la phase mobile est un liquide. Selon la nature de la phase stationnaire, on distingue :

Les chromatographies de partage

La chromatographie de partage : C'est une chromatographie liquide-liquide. La phase stationnaire est un liquide fixé sur un support inerte (ex. : de l'eau sur la cellulose d'un papier). Cette chromatographie est ainsi dénommée car elle est basée sur le partage du soluté dans les deux phases liquides.

La chromatographie d'exclusion : On l'appelle également chromatographie d'exclusion-diffusion, tamisage moléculaire, gel-filtration ou perméation de gel. La phase stationnaire est un solide poreux : les grosses particules sont exclues de la phase fixe, en revanche, les petites particules incluses diffusent dans les pores du gel.

Les chromatographies d'adsorption

La chromatographie d'adsorption : C'est une chromatographie liquide-solide. La phase stationnaire est un adsorbant solide polaire.

La chromatographie d'adsorption en phase inverse : C'est une chromatographie liquide-solide dans laquelle la phase stationnaire est apolaire.

La chromatographie sur échangeurs d'ions : La phase stationnaire est un échangeur d'ions constitué par une résine porteuse de groupements ionisés négativement ou positivement, exerçant des interactions de type électrostatique avec les solutés ioniques du milieu.

La chromatographie d'affinité : La phase stationnaire est un support macromoléculaire chimiquement inerte, sur lequel est greffé un effecteur qui présente une affinité biologique (bio-affinité) pour un soluté de l'échantillon à analyser (affinité enzyme-substrat, ligand-récepteur, antigène-anticorps).

Chromatographies en phase gazeuse (CPG ou CG, ou encore GC pour Gas chromatography en anglais)

La phase mobile est un gaz appelé gaz vecteur ou encore gaz porteur. On distingue dans ce cas :

La chromatographie gaz-liquide : C'est une chromatographie de partage. La phase stationnaire est un liquide fixé par imbibition d'un support inerte.

La chromatographie gaz-solide : C'est une chromatographie d'adsorption. La phase stationnaire est un solide adsorbant.

En résumé

Les différents principes de chromatographie résultent du fait que l'on a privilégié un des facteurs suivants, afin de séparer des composés constituant un mélange :

Facteur	Technique chromatographique
<i>Solubilité dans un solvant liquide</i>	<i>Chromatographie de partage</i>
<i>Taille et forme</i>	<i>Chromatographie d'exclusion</i>
<i>Polarité</i>	<i>Chromatographie d'adsorption et d'adsorption en phase inversée</i>
<i>Charge électrique</i>	<i>Chromatographie par échange d'ions</i>
<i>Groupement d'atomes formant des sites particuliers</i>	<i>Chromatographie d'affinité</i>

Les différentes types de technologies en chromatographie

Colonne

Une colonne de verre, plastique ou métal est remplie de phase stationnaire, souvent sous forme de sphérules très petites. L'écoulement de la phase mobile s'effectue par gravité, sous pression légère, ou encore sous haute pression (Chromatographie Liquide Haute Pression = CLHP, dont nous parlerons plus en détail ultérieurement).

Théorie de la CL sur colonne (notions de base)

Caractéristiques de l'élution

La représentation graphique de l'élution d'un composé (figure 2.1), exprimée en concentration en fonction du temps ou en fonction du volume de l'effluent est une courbe de **distribution typiquement gaussienne**. La mesure de la concentration peut s'effectuer par la mesure de l'absorbance, la fluorescence, etc...

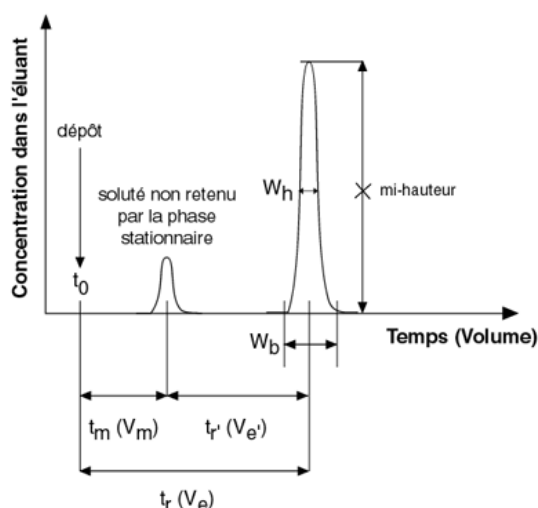


Figure 2.1. : Représentation graphique de l'élution d'un composé (chromatogramme) : t_0 correspond au début de l'injection, V_m au volume mort de la colonne, t_m au temps mort, V_e est le volume d'élution d'un composé (aussi appelé V_r pour volume de rétention), t_r est le temps de rétention (ou encore d'élution t_e) d'un composé. V_e' est le volume d'élution réduit, t_r' est le temps de rétention réduit, W_b la largeur du pic à la base et W_h la largeur du pic à mi-hauteur.

Il est important de noter qu'il est **possible de déterminer les volumes en fonction du débit et du temps**, en effet, $V = d.t$, avec d = débit (ex. : $V_e = d.t_r$). Dès lors dans la suite de notre discussion, **on parlera indifféremment, par exemple, de temps de rétention et de volume d'élution**, puisqu'à débit donné, l'un est directement proportionnel à l'autre.

Le temps de rétention t_r (le volume d'élution V_e) est le temps (le volume) que met la substance, de l'injection jusqu'à la sortie de la colonne. Ce paramètre dépend beaucoup de l'éluant, autrement dit de la phase mobile. Ainsi, un constituant peut être beaucoup moins retenu par l'ajout d'un éluant d'une plus grande force. De plus, la rétention d'une substance dépend du choix de la phase stationnaire.

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

En soustrayant ce temps mort du temps de rétention, on obtient le temps de rétention relatif t_r' , appelé aussi temps de rétention réduit. **Ce temps de rétention réduit t_r' mesure le temps passé par la substance sur la phase stationnaire**, et il est donc lié au phénomène de rétention. De même, il est bien entendu possible de déterminer un volume d'élution réduit $V_{e'}$ en soustrayant à au volume d'élution V_e le volume mort V_m .

$$V_{e'} = V_e - V_m \text{ et } t_r' = t_r - t_m$$

Coefficient de distribution

Soit K , le coefficient de distribution du composé entre la phase stationnaire et la phase mobile :

$$K = C_s / C_m$$

avec C_s = concentration à l'équilibre du soluté dans la phase stationnaire et C_m = concentration à l'équilibre du soluté dans la phase mobile.

Facteur de capacité

Afin de pouvoir comparer les chromatogrammes de séparations obtenues sur des colonnes différentes, avec des conditions d'éluants différentes, on utilise une grandeur sans dimension appelée facteur de capacité, qui permet de s'affranchir des paramètres géométriques d'une colonne. Noté K' , le facteur de capacité est défini très simplement à l'aide de la relation $K' = t_r' / t_m$ dans laquelle t_r' désigne le temps de rétention réduit, dont nous avons parlé plus haut et t_m le temps mort. Comme précédemment, au lieu d'utiliser le temps de rétention et le temps mort pour définir le facteur de capacité, il est possible d'utiliser le volume d'élution V_e d'un composé et le volume d'élution V_m d'une substance inerte (le solvant, par exemple). K' est alors obtenu par la relation $K' = (V_e - V_m) / V_m$. Lorsque $K' = 0$, le composé n'est pas retenu sur la phase stationnaire. Lorsque K' est inférieur à 1 et d'une façon plus générale, pour les faibles valeurs de K' , cela signifie que les composés ne sont que très peu retenus sur la colonne. Les pics correspondants sortent très près du pic inerte.

Le domaine optimal de séparation se situe généralement pour un K' variant de 1 à 15. Cela correspond à un temps de rétention plus long et à un élargissement du pic. K' varie avec la force d'élution du solvant : quand elle augmente, K' diminue.

Plateaux théoriques

Sur le modèle de la distillation, on considère que la colonne de chromatographie est constituée par un empilement de plateaux appelés plateaux théoriques. **Un plateau théorique est défini comme le plus petit volume de colonne où l'équilibre de distribution du soluté entre phases fixe et mobile est réalisé**, ou, en d'autres termes, un volume dans lequel la distribution du soluté entre les deux phases est toujours celle définie par K' .

On définit V_h comme étant le volume équivalent de phase mobile dans le plateau théorique et N le nombre de plateaux théoriques dans la colonne. Le volume d'élution V_e est alors égal à $N.V_h$. On peut représenter la migration du soluté à travers la colonne, comme le déplacement dans la phase mobile (en équilibre avec la phase fixe) d'une couche très mince de soluté le long de la colonne.

L'effet de diffusion brownienne (et de la diffusion de soluté entre les phases fixe et mobile), qui est relativement rapide dans la phase mobile se superpose à ce mouvement. Ceci explique que **plus un composé est retenu dans la colonne**, plus la diffusion est efficace et **plus le pic d'élution est large**, ce qui explique que l'on cherche en général à accélérer l'élution... en dehors du fait que l'on gagne du temps par la même occasion.

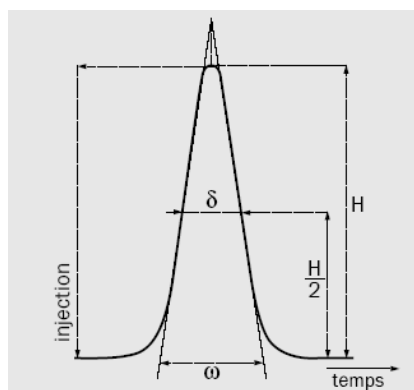


Figure 2.2. : Représentation graphique d'un pic d'élution :

La forme du pic permet de déterminer certains paramètres tels que la largeur à mi hauteur (δ) ou la largeur à la base (ω). Ces paramètres permettent de calculer le nombre de plateaux d'une colonne, caractéristique qui reflète l'efficacité de cette colonne.

Il est possible de démontrer (mais nous le ferons pas) que W_b (ω), la largeur du pic à la base (figure 5.9), est égal à $\frac{4.t_R}{\sqrt{N}}$. Donc, **plus le nombre de plateaux est important, plus le pic est fin**, par contre, **plus le temps de rétention est grand, plus la pic est large** (ce qui correspond bien à ce que nous venons de discuter ci-dessus).

Surface des pics

La surface des pics, c'est-à-dire l'intégrale de l'aire sous la courbe d'un pic d'élution, permet de mesurer la concentration d'une substance, pour autant que la réponse du système soit proportionnelle à la concentration de l'échantillon.

Séparation des pics

Si on purifie plusieurs composés, on peut finalement définir deux nouveaux paramètres :

Coefficient de sélectivité (α)

$$\alpha = (V_{e2} - V_m) / (V_{e1} - V_m) = t_{r2} / t_{r1} = K'2 / K'1$$

α rend compte de l'efficacité de la séparation de deux pics voisins.

Si $\alpha = 1$, cela signifie que le système utilisé ne permet pas de séparer les composés analysés. La valeur minimale de α est 1,1. En dessous, il vaut mieux changer d'éluant ou de phase stationnaire. α ne prend pas en compte la largeur des pics. Aussi définit-on le coefficient de résolution de 2 pics (R).

Coefficient de résolution de 2 pics (R)

Le but d'une analyse chromatographique est d'obtenir des pics séparés. La séparation entre deux pics est d'autant meilleure que la résolution R est grande. Par définition, la résolution est le quotient entre la différence des temps de rétention entre les deux pics et la moyenne des largeurs des pics à la base.

$$R = 2.(V_{e2} - V_{e1}) / (W_{b1} + W_{b2})$$

Dans les bonnes séparations, les valeurs de R sont supérieures à 1 et idéalement comprises entre 1,4 et 1,6. C'est en effet pour la valeur de 1,5 qu'il y a un retour à la base suffisant entre les deux pics. Au-delà de cette valeur, seul le temps d'analyse est augmenté, sans qu'il y ait aucune information supplémentaire intéressante de fournie. Cela dit, même des valeurs de $R = 0,5$ permettent de donner des informations sur le nombre de composés présents dans le mélange, mais ne permettent plus de les quantifier correctement.

Plaque

Une plaque, sur laquelle est fixé le support solide, sous forme d'une mince pellicule, est trempée dans un bain de phase mobile, dans une cuve fermée, permettant la saturation de l'air par la phase mobile. Cette dernière remonte le long de la plaque par capillarité.

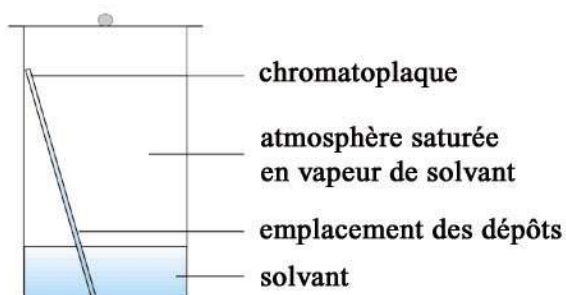


Figure 2.3. : Schéma d'un montage à chromatographie liquide-liquide ascendante : La plaque de papier (cellulose) qui sert de support à la phase aqueuse (phase fixe) est représentée de côté. C'est au bas de cette dernière, juste au-dessus du niveau de solvant (phase mobile) que sont déposés les échantillons sous forme de micro-gouttes, à

Rapport frontal

On appelle rapport frontal, R_F (ou « référence front », « coefficient de migration »), le **rapport Distance parcourue par le soluté / Distance parcourue par le solvant**. Le schéma de la figure 2.4 montre comment calculer le R_F dans le cas d'une chromatographie liquide ascendante.

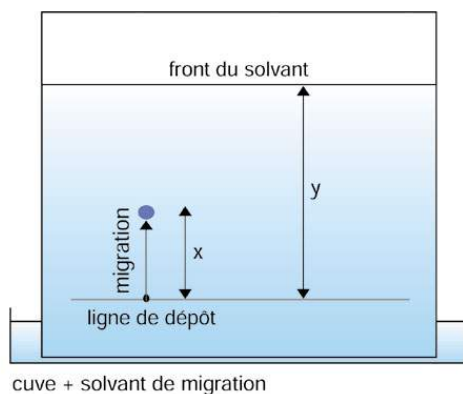


Figure 2.4. : Schéma montrant comment déterminer le rapport frontal d'une substance : On mesure la distance x parcourue par la substance à partir de la ligne de dépôt. On mesure également la distance y parcourue par le solvant à partir de la ligne de dépôt, jusqu'au front de solvant. Le rapport x / y toujours inférieur à 1 représente le rapport frontal de la substance (R_F).

Un **soluté très soluble dans la phase fixe** aura un **R_F faible**, alors qu'un **soluté très soluble dans la phase mobile** aura un **R_F élevé** et proche de 1.

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** (figure 2.5).

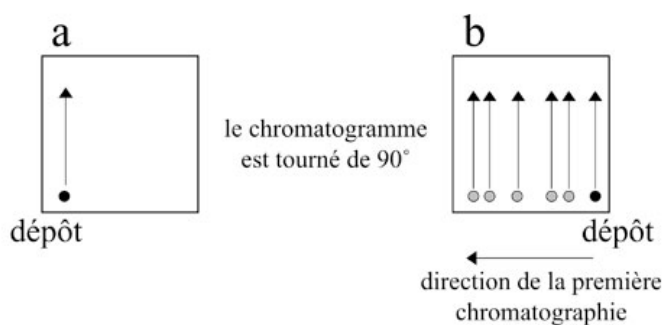


Figure 2.5. : Chromatographie liquide-liquide bidimensionnelle :
Comme indiqué en (a), on commence par réaliser la chromatographie de façon classique avec un certain système de solvants. Nous aurons donc une première séparation. La plaque est ensuite tournée à 90° et une nouvelle élution est réalisée avec un autre système de solvants (b).

2.2. La chromatographie de partage

Principe

Cette chromatographie liquide-liquide est fondée sur la répartition différentielle de chacun des solutés entre deux liquides non miscibles, l'un constituant la phase stationnaire, l'autre la phase mobile. C'est une technique essentiellement qualitative. Cette technique est un peu comparable à une extraction liquide-liquide.

Théorie de la partition

La distribution d'un soluté A entre deux solvants non-miscibles, l'un aqueux (S_{aq}), l'autre organique (S_{org}), relève de l'équilibre $A_{S_{aq}} \rightleftharpoons A_{S_{org}}$. La constante d'équilibre, qui est appelée « **coefficient de partage** » ou « **coefficient de distribution** », est égale à $K = \frac{[A_{S_{org}}]}{[A_{S_{aq}}]}$. C'est **l'équation de Nernst** pour le partage d'une substance entre deux phases liquides non miscibles, avec $[A_{S_{org}}]$: la concentration en soluté A dans la phase organique et $[A_{S_{aq}}]$: la concentration en soluté A dans la phase aqueuse. En général, le soluté est plus miscible dans le solvant organique que dans le solvant aqueux et K est donc supérieur à 1.

La transposition de cette partition d'un composé entre deux phases liquides dans un système chromatographique est rendue possible par la **fixation de l'un des solvants sur un support inerte**, l'autre solvant constituant la phase mobile (figure 2.3). Un soluté très soluble dans la phase fixée migrera lentement, la force de rétention prédominant sur la force d'entraînement. A l'inverse, un soluté soluble dans la phase mobile migrera rapidement.

Solvants

Les deux solvants sont caractérisés par leur **différence de polarité** et leur **non miscibilité**. Généralement, le solvant fixe est polaire et très souvent, ce sera l'eau. Le solvant mobile sera quant à lui non polaire et constitué d'un mélange choisi selon les nécessités de la séparation.

Technologie

Comme nous l'avons déjà indiqué, c'est une technique essentiellement qualitative.

- Sur colonne : La colonne est remplie d'un support inerte imprégné du solvant fixe, le tout constituant la phase stationnaire. Or, **les supports sont rarement totalement inertes**, il est donc difficile de déterminer ce qui relève du partage et de l'adsorption (dont nous parlerons ultérieurement). Autrement dit, **les solutés vont être séparés selon deux mécanismes : le partage et l'adsorption**.
- Sur papier : En chromatographie ascendante ou descendante. Ici aussi l'intervention du papier ne peut être négligée : on assistera à un **mélange de phénomènes d'adsorption et de partage**.
- Sur couche mince : le support inerte du liquide qui constituera la phase fixe est coulé sur une plaque de verre. Les solvants migreront par capillarité.

2.3. La chromatographie d'exclusion

Principe

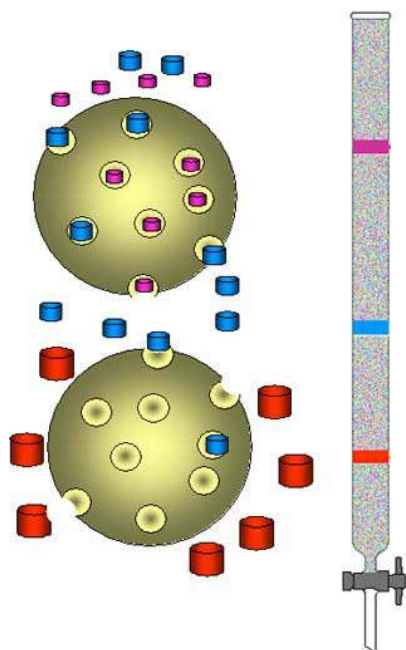


Figure 2.6. : Schéma illustrant le principe de la chromatographie d'exclusion : Les plus petites molécules peuvent pénétrer dans de nombreux pores, se répartissant entre le gel et la phase mobile, ce qui rend leur trajet plus lent à parcourir et les fait éluer en dernier. Les molécules de taille moyenne peuvent pénétrer seulement dans quelques pores, la répartition entre le gel et la phase mobile est plus rapide que pour les petites molécules, le trajet parcouru est moins long et elles sont éluées plus rapidement. Finalement, les grosses molécules ne peuvent pénétrer dans les pores du gel (elles sont exclues), il n'y a donc pas de répartition entre la phase mobile et le gel, leur trajet est donc réduit au minimum et elles sont éluées en premier.

Cette technique permet la **séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme**. On utilise pour cela des **granules de gel poreux**. 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. **Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires**. Il existe une relation linéaire entre le volume d'élution et le logarithme de la masse moléculaire. L'ensemble de ces considérations est illustré schématiquement dans la figure 2.6.

Types de gels

- **Gels hydratés** (les plus utilisés) : le Séphadex™ (G10 à G200) qui sont des polysides bactériens de type dextran et le Sépharose™ (agarose). Le gain d'eau correspond au nombre de grammes d'eau fixés par gramme de substance sèche.
- **Gels permanents** : Ce sont des copolymères organiques ou bien des minéraux (silice). Ici, des effets d'adsorption s'ajoutent au tamisage moléculaire.

Représentation des résultats

- Soit on porte le logarithme de la masse moléculaire en fonction du volume d'élution, comme indiqué dans la figure 5.5 : $\log MM = f(V_e)$.

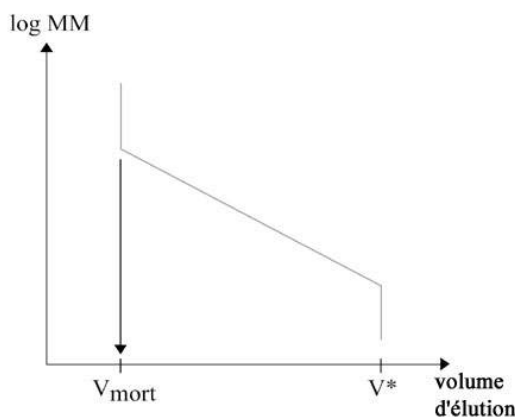


Figure 2.7. : Graphique du log de la masse moléculaire en fonction du volume élué : Les grosses molécules, totalement exclues sont toutes éluées les premières, au niveau du volume mort. Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement et finalement, les petites molécules, totalement incluses, sont éluées en même temps au niveau du volume V^* .

Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et sont donc toutes éluées les premières, au niveau du volume mort (V_m). Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses dans le gel, leur migration est gênée. Une molécule totalement incluse sera éluée avec un volume $V^* = V_m + V_i$, 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.

Théorie de la chromatographie d'exclusion

On considère une colonne de volume totale V_t remplie d'un gel solvaté : $V_t = V_m + V_i + V_g$, où V_m est le volume mort, c'est-à-dire le volume d'eau externe aux granules, V_i est le volume d'eau interne aux granules et V_g est le volume du gel.

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

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

2.4. La chromatographie d'adsorption

Principe

Cette chromatographie liquide-solide est basée sur la répartition des solutés entre l'adsorbant fixe et la phase liquide mobile. Chacun des solutés est soumis à une force de rétention (par adsorption) et à une force d'entraînement par la phase mobile. L'équilibre qui en résulte aboutit à une migration différentielle des solutés de l'échantillon à analyser, ce qui permet leur séparation.

Adsorption vs absorption

L'adsorption est un phénomène de surface par lequel des molécules se fixent sur la surface d'un adsorbant, selon divers processus plus ou moins intenses. Le phénomène inverse, par lequel les molécules adsorbées sur une surface s'en détachent se nomme la désorption. Il existe différents types d'adsorption :

- **L'adsorption physique ou physisorption** met en jeu des **liaisons faibles**, du type forces de Van der Waals. Elle est en général réversible et un équilibre de partage s'établit entre la phase mobile et la phase fixe.
- **L'adsorption chimique ou chimisorption** met en jeu des **liaisons fortes** dont l'énergie est comparable à celle de formation des liaisons chimiques. Elle est souvent irréversible (formation de liaisons covalentes) ou difficilement réversible (formation de liaisons ioniques) et engendre une couche monomoléculaire.

L'absorption, par contre, est un phénomène de profondeur, par lequel une substance s'incorpore dans une autre substance.

Les adsorbants

Ce sont des **solides très divisés** (l'adsorption est un phénomène de surface), ainsi, 1 g d'alumine pour chromatographie peut représenter une surface de l'ordre de 100 m².

On peut distinguer :

- Les adsorbants à faible capacité d'adsorption, comme le talc ou le carbonate de sodium.
- Les adsorbants forts, comme le gel de silice, l'alumine ou le charbon actif.

Certains adsorbants présentent une forte polarité électrique, comme le gel de silice ou l'alumine, alors que d'autres, comme le charbon actif ou les phases inverses (dont nous parlerons plus en détail ultérieurement) ont une faible polarité.

Les solvants

Pour un système chromatographique donné (caractérisé par une phase stationnaire, une température, une pression et un soluté), **le pouvoir éluant dépend de la polarité du solvant**. Prenons, par exemple, une phase stationnaire constituée d'un adsorbant polaire (le gel de silice), d'un soluté polaire adsorbé et d'un solvant polaire (la propanone). Le solvant polaire possède un pouvoir éluant élevé, fortement adsorbé, il déplace le soluté. En revanche, un solvant apolaire comme l'éther de pétrole possèdera un mauvais pouvoir éluant, mais entraînera un soluté apolaire. Le tableau suivant reprend quelques **solvants classés dans l'ordre croissant de polarité (série éluotropique)**.

Éther de pétrole	Dichlorométhane	Propan-1-ol
Cyclohexane	Éther diéthylique	Éthanol
Tétrachlorométhane	Trichlorométhane	Méthanol
Trichloroéthène	Éthanoate d'éthyle	Eau
Toluène	Pyridine	Acide éthanoïque
Benzène	Propanone	

Technologie

La chromatographie d'adsorption est appliquée selon différentes techniques :

- **Sur colonne** : ouverte à pression ambiante, en flash chromatographie, à moyenne pression, en CLHP (chromatographie liquide haute performance ou haute pression).
- **Sur couche mince** : le gel adsorbant (cellulose, silice) est coulé sur une plaque (verre, aluminium, plastique), mélangé à un liant (plâtre).

2.5. La chromatographie d'adsorption en phase inversée

Principe

C'est une chromatographie d'adsorption liquide-liquide dans laquelle **la phase stationnaire se distingue par son apolarité**. Elle est constituée, la plupart du temps, par des silices apolaires greffées (figure 2.8). Il existe des greffons apolaires de tailles différentes, de 2 à 18 atomes de carbone (C2 à C18), donc de polarité différentes.

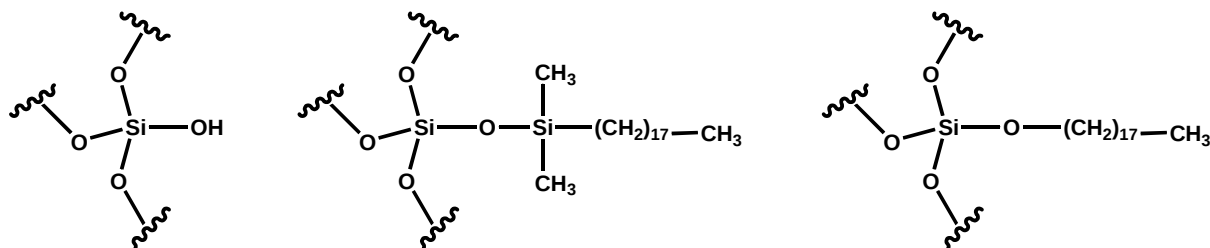


Figure 2.8. : Phase normale et phase inverse : De gauche à droite sont représentées : Une silice non greffée (phase normale), une silice greffée organosilanée de type C18 (phase inverse) et finalement, une silice greffée par une chaîne aliphatique de type C18 également (phase inverse).

Technologie

Dans la pratique, cette chromatographie **ne s'applique qu'en CLHP** (Chromatographie Liquide à Haute Performance ou Pression) que l'on désigne souvent sous son sigle anglais HPLC (pour High Pressure Liquid Chromatography). Cette technique s'applique bien à la **séparation de petites molécules peu polaires** : lipides, acides aminés, peptides.

Notion de paire d'ions

Les composés ioniques tels que A^- ou C^+ se séparent mal dans ce type de chromatographie, d'où l'utilisation d'une technique appelée paire d'ions : on forme un ensemble neutre et apolaire tel que (A^- / X^+) ou (C^+ / Y^-) qui est chromatographié.

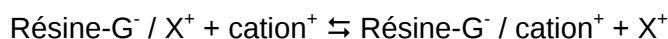
2.6. La chromatographie sur échangeurs d'ions

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

C'est **une résine qui échange réversiblement des cations**, elle est donc **chargée négativement**. Le groupement négatif, habituellement la base conjuguée d'un acide (carboxylique ou sulfonique), est lié à la résine (souvent un polymère organique) de façon covalente et est en général sous forme protonnée avant utilisation (c'est donc le cation H^+ qui est alors échangé).

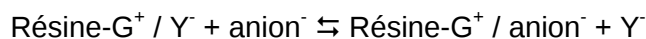


Le tableau suivant reprend les caractéristiques des deux types de résines cationiques les plus utilisées.

Résine	Groupement	Régénérateur	pH d'utilisation	Cations échangés
<i>Fortement acide</i>	$-SO_3H$	HCl ou H_2SO_4 en excès (3 éq.)	1-13	<i>Métaux lourds</i> (ex. : Na^+ , Cu^{2+})
<i>Faiblement acide</i>	$-CO_2H$	HCl ou H_2SO_4 (1 éq.)	4-13	<i>Cations à valences multiples</i>

Résine anionique

C'est une résine qui **échange réversiblement des anions**, elle est donc **chargée positivement**. Le groupement positif, habituellement une amine ou un ammonium est lié à la résine (souvent un polymère organique) de façon covalente.



Le tableau suivant reprend les caractéristiques des deux types de résines anioniques les plus utilisées.

Résine	Groupement	Régénérateur	pH d'utilisation	Anions échangés
<i>Fortement basique</i>	$-N^+(CH_3)_3$	$NaOH$ en excès (3 éq.)	1-12	<i>Anions acides faibles et forts</i>
<i>Faiblement basique</i>	$-N(CH_3)_2$	HCl ou H_2SO_4 (1,5 éq.)	1-4	<i>Anions d'acides forts</i>

Technologie

La chromatographie par échange d'ions se pratique le plus souvent **sur colonne**, mais la méthode peut être transposée sur **couche mince**. Du **papier** échangeur d'ions est

également commercialisé. Enfin, l'échange d'ions peut être **réalisé en « batch »** : la résine est mise en suspension dans la solution et agitée mécaniquement.

Capacité de rétention d'un échangeur d'ions

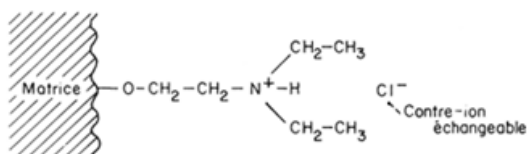
C'est le nombre de millimoles (mmol) d'ions (monovalents) que la résine peut échanger par unité de masse. On l'exprime par gramme de résine sèche (ou moins souvent par unité de volume : par ml de résine humide).

Exemples de résines échangeuses d'ions

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

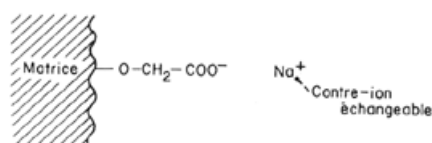
Echangeurs anioniques :

– le DEAE-polyoside (diéthylaminoéthyle), échangeur anionique faible :

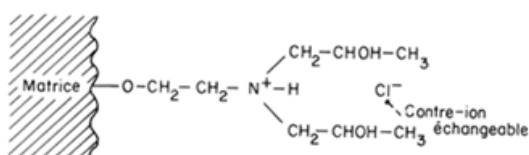


Echangeurs cationiques :

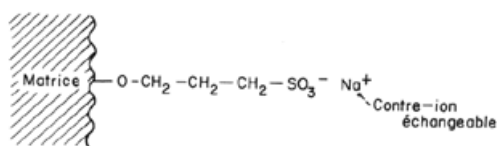
– le CM-polyoside (carboxyméthyle) : échangeur cationique faible :



– le QAE-polyoside (quaternaire aminoéthyle), échangeur anionique fort :



– le SP-polyoside (sulfopropyle) : échangeur cationique fort :



2.7. La chromatographie d'affinité

Principe

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'affinité sont utilisés :

- Affinité enzyme – substrat
- Affinité ligand – récepteur

- Affinité antigène – anticorps

Très souvent la molécule fixée sera sur le substrat, le ligand ou l'anticorps. Ceci permettra de purifier l'enzyme, le récepteur ou l'antigène, respectivement.

Etapes d'une chromatographie d'affinité

Etape de fixation

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

Etape de purification

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

Etape d'élution

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

L'ensemble de ces trois étapes est schématisé dans la figure 2.9.

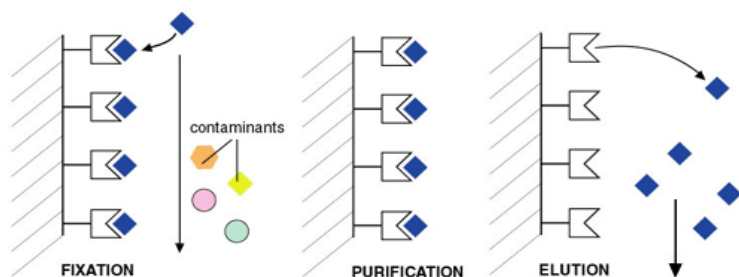


Figure 2.9. : Schéma des étapes de purification par chromatographie d'affinité : A l'étape de fixation, le composé ayant une affinité pour la colonne y est retenu. Pendant l'étape de purification, le rinçage avec du tampon permet d'éliminer les contaminants. Finalement, lors de l'élution, le composé désiré est récupéré.

Phase stationnaire

Le gel d'affinité est constitué d'un effecteur fixé par covalence à un support (carboxyméthylcellulose, SephadexTM, gel de polyacrylamide) par l'intermédiaire d'un bras de fixation (« spacer » en anglais), le plus souvent constitué d'une **chaîne carbonée de longueur variable, choisie de manière à limiter les contraintes stériques**. Les effecteurs peuvent être de différents types :

- **Affinité enzyme-substrat** : substrat, analogues, inhibiteurs réversibles, effecteurs allostériques, coenzymes.
- **Affinité ligand-récepteur** : hormones, peptides, analogues peptidiques.

- **Affinité antigène-anticorps** : haptènes, antigènes, anticorps.

Elution

Elle peut être réalisée de différentes façons :

- Tampon de **pH différent** de celui ayant permis la charge → changement de l'état d'ionisation de la protéine → désorption.
- Tampon de **force ionique différente** de celle ayant permis la charge → changement de conformation de la protéine.
- **Compétition avec un ligand libre**.

2.8. La Chromatographie Liquide à Haute Performance

C'est en fait une chromatographie sur colonne, mais à haute pression, ce qui permet d'éviter toute perte de charge et de maintenir un **débit constant**. Hormis la chromatographie de partage, tous les types de chromatographie vus dans ce chapitre peuvent être adaptés à cette technique (exclusion, adsorption en phase normale et inverse, échange d'ions et affinité). Tous ces phénomènes sont directement liés à la surface de la phase stationnaire solide. Plus cette dernière est importante, plus il y a d'interactions avec le soluté et plus la séparation sera bonne. Il est donc **intéressant d'utiliser des particules de phase stationnaire de la plus petite taille possible (meilleur empilement, plus grand rapport surface / volume)**. Pour augmenter la surface de contact entre la phase mobile et la phase fixe, on peut également simplement **allonger la colonne**, ce qui augmentera l'efficacité. Par contre, on ne désire **pas de pertes de charges trop importantes**, ni augmenter trop le **temps d'analyse**. L'ensemble de ces considérations **explique l'usage d'une haute pression** dans ce système. Cela dit, il est impossible de simplement pousser à l'infini la pression exercée dans la colonne, à cause de considérations mécaniques (écrasement de la phase stationnaire, entre autre).

C'est une technique extrêmement intéressante et complémentaire à la CG, puisqu'elle permet l'étude de mélange dont les composants sont peu volatils ou qui se dégradent à haute température. Etant donné l'importance croissante de cette technique dans la plupart des laboratoires, nous allons nous attarder un peu sur elle.

Instrumentation

Dans tous les appareils CLHP, on retrouve un ensemble de modules reliés entre eux par des tubes de faible diamètre. Une, ou plusieurs pompes assurent le débit du solvant d'élution. En aval de l'injecteur se trouvent la ou les colonnes où s'effectuera la séparation,

puis au bout de la chaîne se trouve le détecteur (figure 2.10). Par la suite, nous allons aborder un peu plus en détail chacun des composants essentiels d'une CLHP.

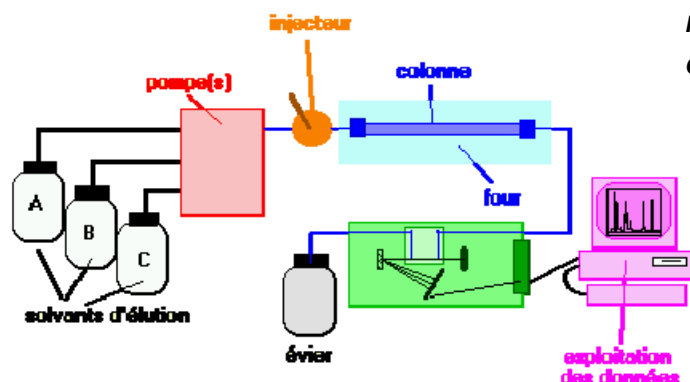


Figure 2.10. : Schéma général d'un système

CLHP : Les modules principaux sont :

- Pompe(s) : qui peu(ven)t être équipé(es) d'un système à gradients.
- Injecteur : qui peut être relié à un passeur automatique d'échantillons.
- Colonne : thermorégulée ou non, pouvant contenir différents types de phase.
- Le détecteur : ici un UV, mais d'autres sont possibles.

Pompes

Nous avons vu que la CLHP fonctionnait à **débit constant**, hors, une simple pompe ne permet que d'avoir un débit pulsé, puisqu'il y a une phase d'aspiration du solvant, puis une phase d'expulsion du solvant. Dès lors que le débit de la pompe est pulsé, la ligne de base ne sera pas continue, ce qui ne nous intéresse pas. En pratique, donc, on travaille avec des systèmes de pompage plus complexe, tel que celui représenté dans la figure 2.11. La came de forme cardioïde fait fonctionner les **deux pistons, en quelque sorte, en opposition de phase, de sorte que le débit total, constitué de la somme des débits de chaque piston est continu.**

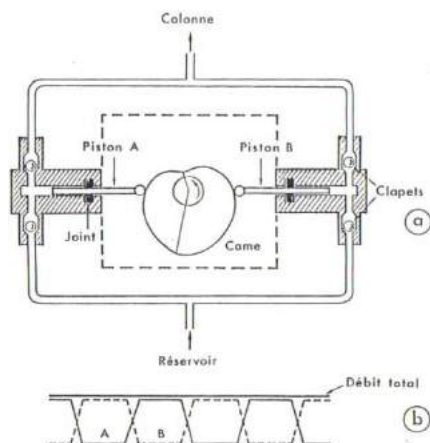


Figure 2.11. : Schéma général d'une pompe à

deux têtes : Les deux têtes sont montées en opposition et actionnées par une came en forme de cardioïde. En (b) sont illustrés les profils du débit délivré par chacun des deux pistons A et B, ainsi que le débit total. On remarque que le fonctionnement en opposition de phase des deux têtes de pompes permet d'obtenir un débit global constant.

Les pompes actuelles permettent également, souvent, de réaliser des **gradients de concentration d'éluant**. Ainsi, il est possible, par exemple de passer graduellement d'un éluant très polaire (ex. : eau) à un éluant moins polaire (ex. : acétonitrile). Cette possibilité permet d'envisager la **séparation de substances de polarités très différentes**.

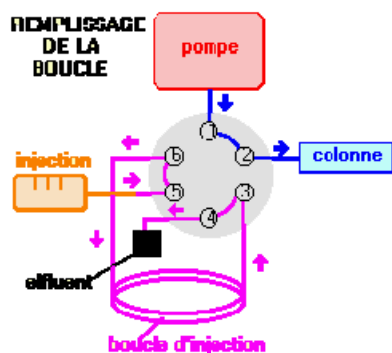
Que ce soit durant le pompage tout simplement, dans la chambre de mélange ou encore dans la colonne elle-même, **si les solvants ne sont pas dégazés, il peut se former**

des bulles à l'intérieur du système, ce qui peut provoquer l'**apparition de pics fantômes**, le **désamorçage de la pompe**, etc... Il convient donc d'éliminer au maximum l'azote et l'oxygène qui peuvent être présents dans les solvants. Pour cela, il existe plusieurs techniques :

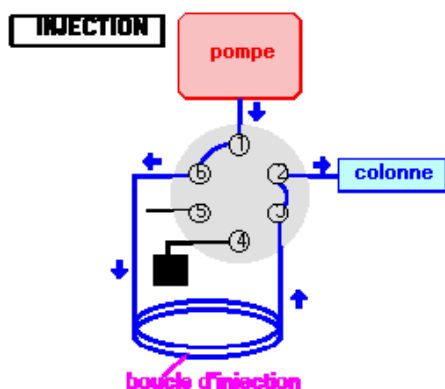
- **Barbotage à l'hélium** : ce gaz, très peu soluble, permet de déplacer l'oxygène et l'azote dans la plupart des solvants.
- **Filtration sous vide** : cette technique permet en outre de se débarrasser des petites impuretés qui pourraient se trouver dans le solvant. Il convient toutefois d'éviter de filtrer des mélanges de solvants dans lesquels un des composants serait fortement volatil, puisqu'il risquerait, alors, d'y avoir un changement important de la composition du mélange.
- **Bain ultrasonique** : permet d'éliminer environ 50 % de l'air contenu dans la phase mobile.
- **Tube poreux** : cette technique consiste à faire passer la phase mobile dans un tube poreux au travers d'une enceinte sous vide. Le tube poreux étant conçu pour ne laisser passer que les gaz, l'éluant est progressivement dégazé.

Injecteur

Il est constitué d'une vanne haute pression (manuelle ou non) à plusieurs voies dont le fonctionnement se déroule en deux étapes :



1. **Remplissage de la boucle** : le solvant d'élution circule librement de la pompe (en 1) à la colonne (en 2). L'injection est réalisée (en 6) dans la boucle (tuyau métallique enroulé en boucle et de volume connu, typiquement de l'ordre de 10 µl). Le surplus de solvant est évacué dans l'effluent, communément appelé l'évier (en 4).



2. **Injection de l'échantillon** : On bascule la vanne par action d'un levier et le solvant va alors balayer la boucle (de 1 à 4) et entraîner l'échantillon dans la colonne.

Colonne

La colonne est généralement un **tube en acier de 5 à 30 cm** de longueur et de **diamètre de l'ordre de 5 mm**. La **phase stationnaire est constituée de grains sphériques calibrés de diamètre allant de 5 à 10 μm** . La nature de la phase est fonction du type de chromatographie liquide que l'on souhaite réaliser (exclusion, adsorption, ...).

Détecteurs

Types de détection

Il existe en gros deux types de détections basés :

- Sur les **propriétés générales** (solvant + soluté) ; ex. : indice de réfraction, conductivité, constante diélectrique, etc.
- Sur les **propriétés des solutés** ; ex. : UV, radioactivité, etc.

Principaux paramètres

Bruit : Qui se définit comme la variation du signal de sortie d'un détecteur non attribuable au passage du soluté dans la cellule.

- a) bruit **à court terme** : zigzags sur la ligne de base
- b) bruit **à long terme** : pics et vallées
- c) **dérives** : déviation constante de la ligne de base vers le haut et le bas de l'échelle.

Sensibilité :

a) **absolue** : mesurée par un déplacement sur tout l'échelle de l'enregistreur lorsque la sensibilité du détecteur est maximale sans interférence de bruit de fond.

b) **relative** : concentration minimale de soluté détectable pour un signal au moins égal à deux fois la hauteur du bruit de fond.

La sensibilité peut changer avec la nature du bruit de fond (type de détecteur), avec le débit (polarographie) et la température ambiante. En outre, le volume mort, l'élargissement des pics dans la cellule et les raccords peuvent augmenter la quantité minimale détectable d'un échantillon.

Linéarité : Région où il y a une proportion linéaire entre le signal de sortie et la concentration du soluté.

Spectroscopie dans l'UV et le Vis.

Mesure l'absorbance absolue d'un solvant + soluté ou la différence d'absorbance entre le solvant et le solvant + soluté (en présence d'une cellule de référence) à la longueur d'onde fixe de 254 ou 280 nm, ou à longueur d'onde variable entre 190 et 800 nm, ou à longueurs d'onde multiples lorsqu'on utilise une barrette de diodes (cfr. Chapitre consacré à la spectroscopie). Les cuvettes doivent être construites de façon à empêcher la production de faisceaux parasites et à éviter la formation de bulles d'air. La figure 2.12 illustre une de ces cuvettes.

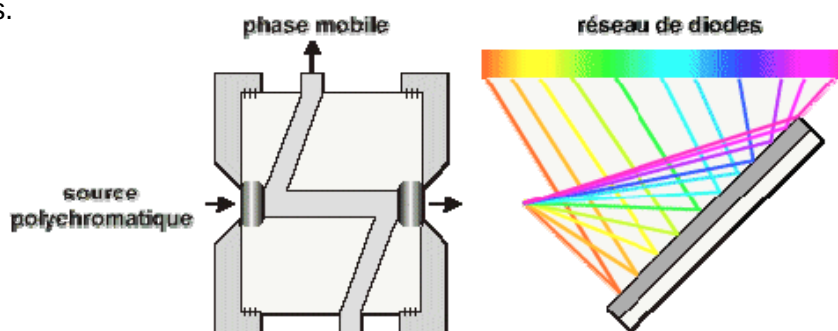


Figure 2.12. : Schéma d'une cuvette de détecteur UV-Vis. : On voit que la forme en Z du conduit dans lequel circule l'éluant permet de suivre l'absorbance de ce dernier en continu avec un trajet optique relativement important (ce qui ne serait pas le cas d'une simple lecture sur la « tranche » du tube). A noter que les fenêtres de la cellule sont en quartz.

Les avantages du détecteur UV-Vis sont nombreux :

- **Sensibilité** : Détection de substances de concentrations de l'ordre de $5 \cdot 10^{-7}$ à $5 \cdot 10^{-8}$ M par l'utilisation de cuvettes de volume aussi petit que 5 μ l pour une trajectoire optique de 1 cm.
- **Sélectivité** : Il est possible de choisir une ou des longueurs d'ondes qui permettront de voir apparaître le pic correspondant à certaines substances choisies plutôt que toutes. Les détecteurs pouvant mesurer l'absorbance à quatre longueurs d'onde simultanément ou ceux à **barrettes de diodes** permettent de **s'assurer de l'homogénéité d'un pic et ainsi se rendre compte d'une possible coélution**.
- Renseignements spectraux sur les substances par le spectre UV (réseau de diodes).
- Peu sensible aux variations de débit et de température.
- Utilisation et entretien facile.
- Peut être utilisé en mode gradient d'élution.

Il possède toutefois également quelques défauts :

- Les substances doivent être chromophores.
- Les facteurs de réponse sont différents pour chaque composé.

Fluorimétrie

Mesure l'énergie de fluorescence d'un soluté excité par une radiation ultraviolette. L'émission de lumières est mesurée à angle droit du faisceau d'excitation. Ce procédé sert pour les composés fluorescents ou les dérivés fluorescents de certains composés.

Avantages :

- Encore plus sensible que le détecteur UV-Vis.
- Très spécifique.
- Peu sensible aux variations de débit et de température.
- Peut être utilisé en mode gradient d'élution.

Inconvénients :

- Les substances doivent être fluorescentes.
- Sensibilité à l'oxygène dissous dans la phase mobile (quench = désactivation)

Spectrométrie de masse

Cfr. 3^{ème} BBM.

2.9. Les chromatographies en phase gazeuse

Principe

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.

La chromatographie gaz-solide (adsorption)

La phase stationnaire est un solide adsorbant (gel de silice, alumine, etc.). 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.

Instrumentation

Un appareil de chromatographie en phase gazeuse **comporte trois parties** : **injecteur, colonne et détecteur** (figure 2.13) à travers lesquels un gaz vecteur entraîne les substances d'un mélange à séparer. **Le gaz vecteur le plus utilisé est l'hélium**, les autres sont l'hydrogène, l'azote ou l'argon. Il doit être très pur et surtout ne contenir ni oxygène, ni eau. Le débit du gaz est ajusté par un régulateur.

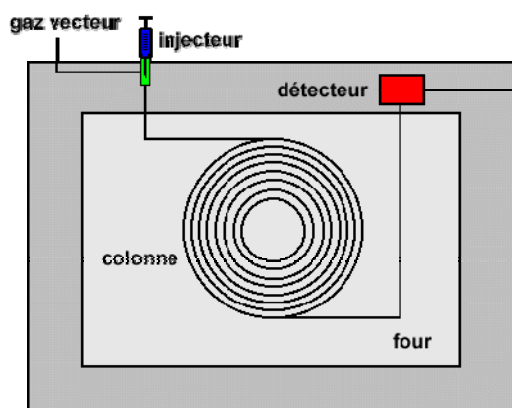


Figure 2.13. : Schéma d'un appareil à chromatographie en phase gazeuse.

Échantillons

Les limites de sensibilité sont, selon les appareils, de l'ordre du nanogramme et même du picogramme. 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,...

Injecteur

Il sert à l'introduction du mélange à analyser dans la colonne. Cette opération est faite :

- A l'aide d'une **microseringue** pour les liquides et les solutions.
- A l'aide d'une **vanne à boucles** pour les mélanges gazeux.

En règle générale, la **chambre d'injection doit être à une température plus élevée que celle de la colonne pour faciliter l'évaporation des échantillons**. La température

idéale est celle qui est 20° plus élevée que le point d'ébullition de la substance la moins volatile.

Le **choix de l'injecteur est dicté par le type de colonne** utilisée (remplie ou capillaire) **et** par la **nature des produits à séparer** (leur résistance à la décomposition lorsqu'ils sont soumis à de hautes températures).

Il y a essentiellement **deux techniques d'injection**, si on ne tient pas compte de la vanne à boucles : la **vaporisation directe « dans la colonne » et l'introduction dans la colonne d'une fraction de ce qui est injecté (split / splitless)**. Cette dernière technique est utilisée avec les colonnes capillaires.

Pour éviter les décompositions catalytiques causées par les métaux qui composent le corps de l'injecteur, on y place un tube de verre dans lequel est introduit le mélange à analyser.

Injection à chaud avec vaporisation directe dans le corps de l'injecteur

Ce type d'injection (figure 2.14) présente l'inconvénient de favoriser la décomposition des substances fragiles car la température de l'injecteur est passablement plus élevée que celle de la colonne. Il est surtout utilisé avec les colonnes remplies.

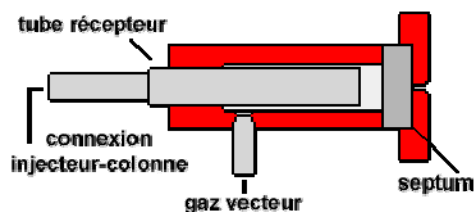


Figure 2.14. : Injecteur avec vaporisation directe à chaud : Remarquez la simplicité de l'accessoire.

Injection à chaud « dans la colonne » avec vaporisation directe

Évite la décomposition des substances sensibles au niveau de l'injecteur mais présente deux inconvénients :

- L'obstruction de la seringue parce qu'elle risque de piquer dans la phase stationnaire.
- La perte de phase stationnaire dans la section de colonne qui se trouve dans l'injecteur.

Injecteur split / splitless

Les injections sur colonnes capillaires ou mégabores doivent obéir à trois critères importants :

- Garantir la composition du mélange (fiabilité).

- Ménager la colonne.
- Maintenir la reproductibilité des injections (précision).

Ce type d'injecteur (figure 5.20) ne laisse entrer dans la colonne qu'une petite partie du volume injecté. Cette fraction est ajustable et peut atteindre 1 / 200. Il est aussi équipé d'une purge de septum qui joue deux rôles :

- Celui de compenser l'augmentation de volume lors de l'évaporation de l'échantillon.
- Celui de laisser sortir le surplus de gaz provenant de l'injection précédente.

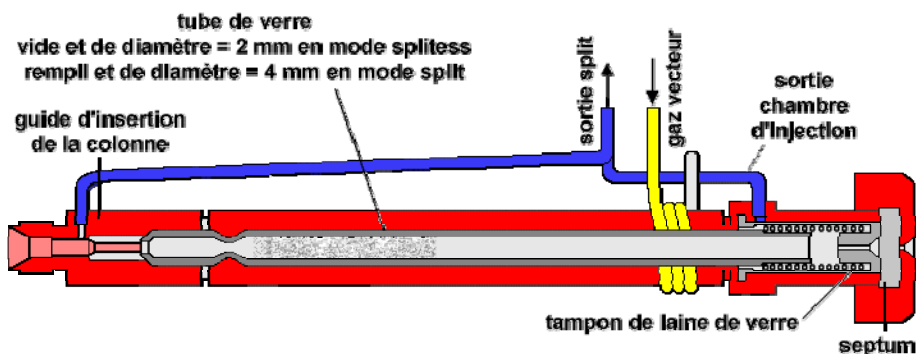


Figure 2.15. : Injecteur split / splitless du modèle 8310 de la compagnie Perkin-Elmer.

Injection à froid suivie d'une brusque montée de la température

Cette méthode est utilisée lors de la séparation de **substances très fragiles**. Cette technique permet la condensation à l'entrée de la colonne de produits qui ne supportent pas les hautes températures des injecteurs conventionnels. Une fois l'injection faite, la température de l'injecteur est très rapidement élevée de façon à ne chauffer les substances injectées que sur un temps beaucoup plus court que celui passé dans l'injecteur à chaud.

La température

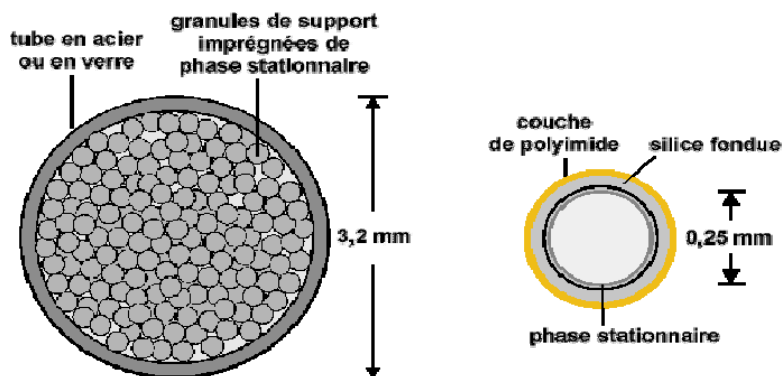
On adopte généralement une température **légèrement supérieure au point de vaporisation du constituant le moins volatil**. D'un point de vue technique, la colonne est maintenue dans un four à bain d'air thermostaté.

Les colonnes

Elles peuvent être **métalliques, en plastique** pour des séparations à basse température, **en verre** et joints Téflon. Diverses formes ont été utilisées : **rectilignes, en U, en spirales** (la plus répandue).

Il existe **deux grands types** de colonnes avec des variantes (figure 2.16) :

- Les **colonnes remplies ou à garnissage** (packed).
- Les **colonnes capillaires** (open tubular)



Caractéristiques des colonnes remplies ou à garnissage (packed)

- Diamètre interne : 1/8 " (3,2 mm) ou 1/4 " (6,4 mm).
- Longueur : 0,5 à 3 mètres.
- Tube : acier inoxydable (assez inerte et bon conducteur de chaleur) ou verre (inerte mais mauvais conducteur de chaleur).

Garnissage pour chromatographie gaz-solide :

- Granulé polymérique de gel de silice traitée à très haute température ou par un procédé hydrothermique par lequel il est possible d'obtenir des pores de dimensions voulues. La surface de ce matériel poreux peut atteindre 500 m² / g.
- Polymère organique du type éthylvinylbenzène-divinylbenzène qui possède des pores dont le diamètre varie de 7.5 à 800 µm.

Garnissage pour chromatographie gaz-liquide :

C'est un support solide poreux et inerte imprégné d'un liquide non volatil, qui constitue la phase stationnaire et qui peut être de nature diverses, comme nous le verrons ultérieurement. Il est **en général constitué de gel de silice**, qui peut être **active**, si il possède beaucoup de groupements -Si-OH libres **ou désactivée** si on le fait réagir avec du dichlorométhylsilane ou du diméthylsilazane. Il est en général lavé à l'acide pour enlever les oxydes métalliques, en particulier les oxydes de fer et lavé par une base pour permettre la chromatographie de substances basiques.

Caractéristique des colonnes capillaires

- Diamètre interne : de 0,1 à 2 mm.
- Longueur : de 15 à 100 m.
- Tube : silice fondue recouverte d'une mince couche de polyimide.

Choix des phases stationnaires

Ce choix se fait en fonction de la nature des substances à séparer.

Molécules	Exemples	Phases stationnaires
		<i>SPB-octyl</i>
Non polaires	Hydrocarbures normaux (<i>n</i> -alcanes)	Poly(méthylsiloxane), SE-30 SPB-5, PTE-5, SE-54
Polaires	Alcools, éthers, thiols, amines, acides carboxyliques, esters et cétones	Poly(méthylphénylsiloxane) Poly(cyanopropylméthylsiloxane) PEG, Carbowax 10, 20M Poly(cyanopropylsiloxane)
Polarisables	Alcènes aromatiques	Poly(cyanopropylphénylsiloxane) TCEP

Les détecteurs

Détecteur à ionisation de flamme (FID pour Flame Ionization Detector)

Des ions sont formés par la flamme provenant de la combustion de l'hydrogène dans l'air. Si une **substance carbonée** (organique) est présente dans cette flamme, le **nombre d'ions formés augmente** considérablement. La buse du brûleur étant une des bornes d'un circuit et une électrode collectrice l'autre, les ions produits captés par cette dernière permettent le passage du courant et indique par le fait même la présence d'un soluté (figure 2.17). La réponse du détecteur FID est proportionnelle à la masse du soluté qui passe dans le brûleur.

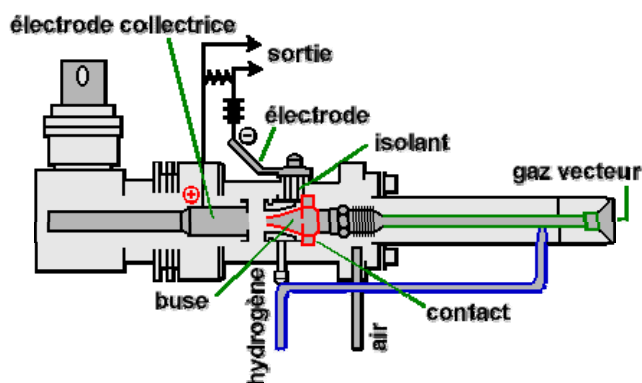


Figure 2.17. : Détecteur FID du modèle 8310 de la compagnie Perkin-Elmer.

Ce type de détecteur possède les caractéristiques suivantes :

- Très sensible.
- Montre une réponse linéaire en fonction de la masse de soluté.

- Sensible aux changements de température et de débit.
- Non sélectif – universel.
- Destructif (les substances sont brûlées).

Ce détecteur, bien qu'économique et universel, ne donne aucun renseignement sur la nature des substances détectées, le temps de rétention n'étant pas une caractéristique spécifique d'un composé. C'est pourquoi, la tendance actuelle est de coupler des spectromètres de masse aux chromatographes en phase gazeuse.

Détection par spectrométrie de masse

Cfr. 3^{ème} BBM

2.10. L'électrophorèse de zone

Principe

Lorsqu'une particule est placée dans un milieu fluide, elle est soumise à **deux forces**, celle de **sédimentation**, qui est la force gravitationnelle **et** la force opposée, qui est la **force de friction** et qui est proportionnelle à la vitesse de la particule. Ces forces agissent dans des directions opposées et **finissent par se compenser**, menant à un mouvement uniforme de la particule dans le milieu liquide (c'est à dire que la particule se déplace à une vitesse constante).

Si le champ gravitationnel est remplacé par un **champ électrique**, une macromolécule peut y répondre de deux façons différentes. Si la **molécule** est **chargée**, elle **va migrer** dans le champ électrique, vers l'électrode de charge opposée. C'est le **principe** sur lequel repose l'**électrophorèse**. Si la molécule a une distribution de charge asymétrique (c'est à dire possède un moment dipolaire permanent), la molécule va tendre à s'orienter dans un champ électrique. Ce principe fournit les bases des techniques de biréfringence électrique et de dichroïsme. Nous ne discuterons toutefois que de l'électrophorèse.

Considérons le simple cas d'une *particule chargée* (+Q) se déplaçant dans un champ électrique (E) dans un milieu non conducteur, tel que l'eau. Si la particule se déplace à une **vitesse constante** vers l'électrode négative, la **force nette (F_{tot})** s'exerçant sur la particule est **nulle** (puisque $F = m.a$, et que l'accélération de la particule (a) est nulle à vitesse constante). Deux forces sont exercées sur la particule, l'une F_E est la **force exercée par le champ électrique** sur une particule chargée, laquelle s'exerce dans la même direction que le déplacement de la particule, et l'autre, F_f est la **force de friction** qui tend à freiner le déplacement vers l'électrode négative, et donc s'exerce dans la direction opposée au

déplacement. Dès lors $F_{tot} = F_E + F_f = 0$ (1) où $F_E = QE$ (2) est la force électrique et $F_f = -fv$ (3) est la force de friction, avec v , la **vitesse de la particule** et f , une constante appelée **coefficient de friction**.

L'équation (3) montre que la force F_f s'opposant au déplacement vers l'électrode négative est proportionnelle à la vitesse de la particule. Il paraît, en effet, intuitivement logique de s'attendre à ce que **la force de friction s'opposant au mouvement augmente lorsque la vitesse augmente**. Le coefficient de friction dépend de la taille et de la forme de la molécule. Plus la **molécule** est **grande**, plus le **coefficient de friction** est **grand**. Il peut être démontré que le **coefficient de friction pour une particule sphérique** est donné par $f = 6 \pi \eta R_s$ (4) où η est la **viscosité** et R_s (rayon de Stokes) est le **rayon de la sphère hydratée**. De (1), (2) et (3), on déduit que $F_E = F_f$, c'est à dire $QE = fv$. Donc $v/E = Q/f = U =$ **mobilité électrophorétique** ou encore, $U = v/E = Q/6 \pi \eta R_s$ (6).

C'est pourquoi la mobilité électrophorétique U est **proportionnelle à la densité de charge** (charge/taille, Q/R_s) de la particule. Les macromolécules de différentes densités de charge peuvent donc être séparées par électrophorèse.

Cette discussion se rapporte au cas le plus simple, puisque **en réalité**, il y a des **contre-ions** dans la solution qui forment un nuage entourant la macromolécule chargée, lequel "protège" partiellement la macromolécule chargée du champ électrique E .

Les électrophorèses modernes sont conduites dans des gels solides (p. ex. polyacrylamide), qui sont formés à partir de solutions d'acrylamide liquide après addition d'un agent de polymérisation, comme nous le verrons un peu plus en détail ultérieurement. Le gel solide est poreux aux molécules de solvant et de soluté et sert de milieu pour l'électrophorèse, tout en aidant à éliminer les forces de convection dans le liquide, qui interféreraient avec la séparation.

Une **complication qui affecte la description** de l'électrophorèse que nous venons de faire, dans les gels de polyacrylamide, résulte du fait que les gels ont des pores à travers lesquels les macromolécules se déplacent. Les molécules les plus petites peuvent passer plus facilement à travers les pores que les grosses molécules, il y a donc un effet de tamisage additionnel qui contribue à la mobilité effective. Cet **effet de tamisage du gel** tend à **augmenter le pouvoir de résolution** de cette technique.

Y a-t-il un moyen d'obtenir des informations sur la masse moléculaire, en plus de la détermination de la pureté, sur un seul gel ? Qu'arrivera-t-il si deux protéines différentes, de même masse moléculaires et de même charge totale nette, mais ayant des formes différentes, sont analysées sur un seul gel d'acrylamide ? Celle qui possède la **forme la plus allongée** (rayon de Stokes élevé) aura la **plus faible mobilité électrophorétique** ($U = Q/6 \pi \eta R_s$). Un R_s plus élevé **va également rendre plus délicate la pénétration dans les pores**.

Donc, la mobilité électrophorétique et les effets de tamisage vont tous deux rendre le déplacement de cette protéine anormalement lent et donc lui donner une masse moléculaire apparente plus élevée.

On peut **également** imaginer le **problème** que va poser l'analyse de **deux protéines globulaires de différentes tailles, mais avec des différences de charges qui compensent**, de sorte que les deux protéines vont migrer à la même vitesse dans le gel. Une **technique permettant d'éviter ces problèmes** consiste à réaliser **l'électrophorèse dans des conditions dénaturantes**, ce dont nous allons parler ultérieurement.

En résumé, la technique **d'électrophorèse permet**, entre autre, de :

- Déterminer le **nombre de sous-unités d'une protéine** et de déterminer leur **masse respective**
- D'évaluer le **degré de purification** d'une protéine
- De **séparer des protéines pour** les révéler par la technique de **Western blot** (réaction avec un ou plusieurs anticorps) par exemple.
- De séparer des protéines sur des **gels bi-dimensionnels**, selon 2 paramètres : point isoélectrique (isofocalisation), puis masse molaire
- De **séquencer l'ADN**
- De déterminer la **taille de fragments d'ADN**
- De **séparer des acides nucléiques** pour les analyser par la technique de **Northern blot (ARN) ou de Southern blot (ADN)**
- D'établir le **profil de restriction** (hydrolyse par des enzymes de restriction) de fragments d'ADN
- ...

Gel d'électrophorèse des protéines en conditions dénaturantes

La technique du gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes ("sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis" ou SDS-PAGE) a été décrite par Ulrich Laemmli en 1970. **On fait bouillir** un mélange de protéines, pendant environ 3 minutes *en présence* :

- D'un **détergent** anionique fort (agent dénaturant) : le sodium dodécyl sulfate (SDS). Ce détergent se lie et **dénature** la plupart des protéines, avec environ 1,4 g de SDS lié par gramme de protéine (soit environ 1 SDS / 2 acides aminés). Comme il y a une charge négative par molécule de SDS, sa liaison **masque** toutes **les charges de la protéine**, et lui confère une charge globale négative élevée. En outre, les complexes protéine/SDS ont généralement une forme allongée cylindrique. Comme la quantité de SDS lié par unité de masse de la protéine est constante, la **densité de charge globale de toutes les protéines est similaire**, donc la mobilité électrophorétique est

seulement déterminée par les effets de tamisage. Le SDS élimine également les différences dues à la forme des protéines au niveau des effets de tamisage, puisque toutes les protéines ont la même forme générale cylindrique. La **mobilité** devient **seulement** une **fonction de la masse moléculaire** de la protéine, et non de sa forme.

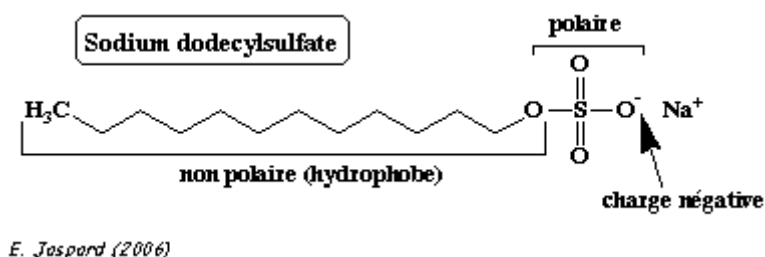


Figure 2.18. : Sodium dodécylsulfate (SDS) : Détergent anionique possédant une tête hydrophile de type sulfate et une queue lipophile carbonée.

- D'un **agent réducteur** : le β -mercaptoéthanol qui **réduit les ponts disulfures**, ce qui permet une dénaturation complète des protéines et leur permet d'adopter la forme cylindrique dont nous venons de parler. Des masses moléculaires apparentes peuvent être obtenues sous des conditions non réductrices, mais elles ne doivent être considérées que comme des estimations. L'analyse de protéine à la fois en présence et en absence d'agent réducteur peut fournir des informations importantes sur la structure des sous-unités d'une protéine. Une protéine multimérique dont les sous-unités sont maintenues ensembles par des ponts disulfures peut être résolue en ses différents composants individuels lorsque l'agent réducteur est ajouté. Si les sous-unités sont maintenues ensemble par des attractions intermoléculaires non covalentes, les protéines vont éluer de la même façon dans des conditions dénaturantes (ce qui va éliminer les interactions des sous unités), en présence ou en absence d'agent réducteur. Pour déterminer la composition en sous unités d'une protéine, lorsqu'elles sont maintenues ensembles par des interactions non covalentes, l'électrophorèse doit être réalisée en absence d'agent dénaturant.

En résumé :

- Les protéines sont dénaturées : elles ont perdu leur structure tridimensionnelle native
 - Les protéines n'ont plus de ponts disulfures : elles sont sous une forme monomérique
- Les protéines de l'échantillon sont ensuite séparées par une électrophorèse sur **gel de polyacrylamide** en présence de SDS. C'est un gel réticulé obtenu par polymérisation :
- D'**acrylamide** qui forme des chaînes
 - Et de **bis-acrylamide** qui pontre les chaînes d'acrylamide.

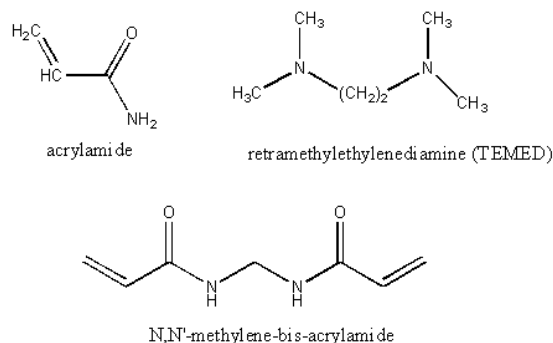


Figure 2.19. : Différentes molécules intervenant dans la formation des gels de polyacrylamide :

- Acrylamide : monomère
- TEMED : catalyseur de polymérisation
- Bis-acrylamide : agent de réticulation

La réaction de polymérisation est :

- Amorcée par la formation de radicaux libres par le **persulfate d'ammonium** (APS)
- Catalysée par le **TEMED** (N,N,N',N'-tétraméthyl-1-2-diaminométhane)

Rappelons-nous que plus le pourcentage d'acrylamide est élevé, plus la densité des chaînes est élevée et les mailles du réseau sont serrées. En conséquence :

- Plus le pourcentage d'acrylamide est élevé, moins les molécules volumineuses peuvent migrer
- Une protéine globulaire (assimilable à une sphère) migre d'autant moins que sa masse molaire est élevée.

Pourcentage d'acrylamide	Gamme de séparation en kDa
7,5	45 – 400
10	22 – 300
12	13 – 200
15	2,5 - 100

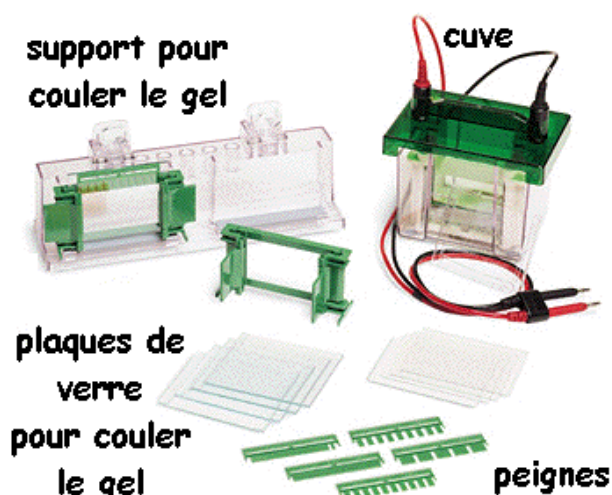


Figure 2.20. : Matériel nécessaire pour couler un gel électrophorétique :

- Plaque de verres, entre lesquelles le gel sera coulé.
- Support pour couler les gels, sur lequel seront fixées les plaques de verre.
- Peignes qui permettent la formation de puits lors de la polymérisation.
- Cuve à l'intérieur de laquelle la migration des protéines pourra avoir lieu une fois le gel polymérisé et les échantillons chargés.

Le **gel** est **coulé**, **en deux étapes**, entre des plaques de verre fixées sur un support. La partie **inférieure** du gel, appelé "**gel de migration**" (running gel) est celui au niveau duquel la **séparation** va avoir lieu. Son **pH** se situe habituellement vers **8,7** et sa **concentration en acrylamide** (**entre 7 et 15 %**, en général) dépend de la taille des

protéines que l'on désire analyser. La **partie supérieure** du gel, dans lequel un peigne est enchâssé pour former des puits, est appelé "**gel de concentration**" (stacking gel). Son **pH** se situe vers **6,5** et sa **concentration en acrylamide** est de l'ordre de **2 à 4 %** seulement.

L'utilité d'un gel divisé en **deux parties** réside dans le fait que les protéines vont se déplacer rapidement dans le gel de concentration et s'accumuler à l'interface avec le gel de migration avant de pénétrer ce dernier. Cela accroît la concentration des protéines avant qu'elles n'entrent dans le gel de migration, ce qui **augmente la résolution**. Comment cela marche-t-il ?

Lorsque les électrodes sont branchées, les ions glycine, de la partie supérieure du réservoir à pH environ 8,7 (cf. composition du tampon d'électrophorèse ci-dessous), qui ont, à ce pH, une charge partielle moyenne négative, entrent dans le gel de concentration. Les ions du tampon du gel de concentration continuent de se déplacer dans le gel de concentration, mais les ions **glycines**, eux, lorsqu'ils se trouvent à pH 6,5, deviennent des zwitterions avec une charge nette de zéro et donc **cessent de se déplacer**. La **résistance électrique** dans le gel de concentration **augmente** alors, puisque le nombre d'ions se déplaçant à travers le gel de concentration diminue. Pour maintenir le courant constant dans le circuit, il va y avoir une **augmentation locale du potentiel** dans le gel de concentration (puisque suivant la loi de Ohm, $V = iR$). Cela va provoquer une migration rapide des protéines et leur accumulation dans une tranche très étroite juste derrière les ions Cl^- dans le gel de concentration (lesquels sont en front de migration, puisqu'ils possèdent la plus grande densité de charge et mobilité électrophorétique de tous les ions se trouvant dans le gel de concentration). Les protéines ne vont pas dépasser les ions Cl^- puisque s'ils le faisaient, ils seraient immédiatement ralentis, ne se trouvant plus dans une zone appauvrie en porteurs de charges et donc de haut potentiel.

A l'interface gel de concentration / gel de migration, **les protéines ne peuvent toutes se déplacer à la même vitesse à cause de l'effet de tamisage** du gel plus concentré et donc elles se séparent dans le gel de migration. La glycine finit par entrer dans le gel de migration, si on suppose qu'elle est totalement chargée à pH 8,7, dépasse les protéines et comble la déficience de charge qui était apparue dans le gel de concentration.

Après polymérisation du gel, le peigne est retiré formant ainsi des puits. La taille et le nombre de dents des peignes sont variables, ce qui permet de déposer des volumes allant de 20 μ l à 200 μ l d'échantillon de protéines à séparer. Les plaques de verre contenant le gel polymérisé sont placées dans une cuve d'électrophorèse.

Du tampon d'électrophorèse conducteur (électrolytes) est mis dans la cuve et la migration s'effectue sous l'action d'un champ électrique :

- Tampon d'électrophorèse : Tris 50 mM – Glycine 0,2 M – SDS 0,1 % - pH 8,3 – 8,8

- Tris : nom commun du 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol
- Glycine : acide faible
- Voltage : 100 – 150 V

Les échantillons de protéines dénaturées sont déposés dans les puits. La plupart des protéines n'absorbent pas la lumière dans les longueurs d'onde visibles, elles ne seront donc pas visibles durant la migration. Pour s'assurer que les protéines ne soient pas éluées dans le réservoir inférieur (analyse trop longue) **un colorant anionique** de faible masse moléculaire, le **bleu de bromophénol**, est ajouté aux protéines avant qu'elles ne soient placées sur le gel. L'électrophorèse est arrêtée lorsque le colorant approche de l'extrémité inférieure du gel de migration.

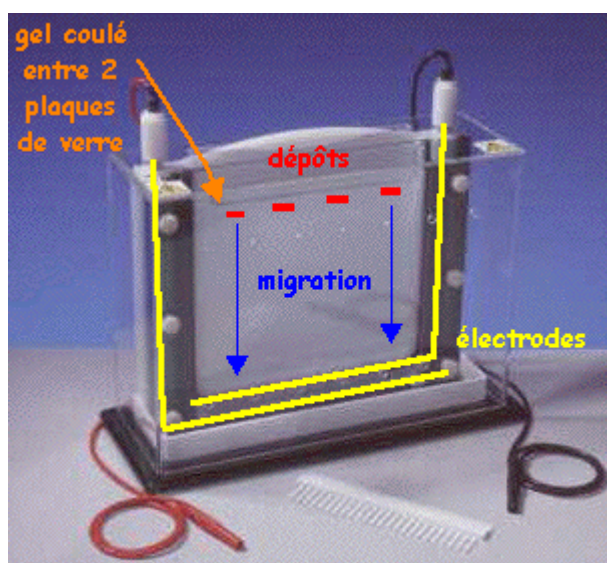


Figure 2.21. : Schéma de la migration des protéines :

- En rouge, fond du puits où sont déposées les échantillons.
- Les protéines, chargées négativement, migrent vers l'électrode positive (en bas).

A noter également que l'on ajoute un peu de **glycérine à l'échantillon** de protéines pour rendre cette solution plus dense que le tampon, ce qui va lui permettre de se déposer dans le fond du puits plutôt que de diffuser dans le tampon d'électrophorèse.

Après migration, le gel est démoulé. Les protéines sont fixées dans le gel par une solution qui contient du méthanol et de l'acide acétique. Les protéines sont **révélées par** une coloration : par exemple avec le **bleu de Coomassie** ou le **nitrate d'argent** (10 à 50 fois plus sensible). On peut également modifier les protéines avec un marqueur fluorescent ou radioactif, avant séparation par électrophorèse, ce qui augmente encore la sensibilité.

On obtient différentes bandes pour chaque puits. La masse molaire des protéines est déterminée à l'aide de marqueurs qui sont des protéines standards de masses molaires connues. Exemple de marqueurs :

- Myosine (205 kDa)
- b-galactosidase (116 kDa)
- Phosphorylase (97,4 kDa)

- Albumine (66 kDa)
- Ovalbumine (45 kDa)
- Anhydrase carbonique (29 kDa)

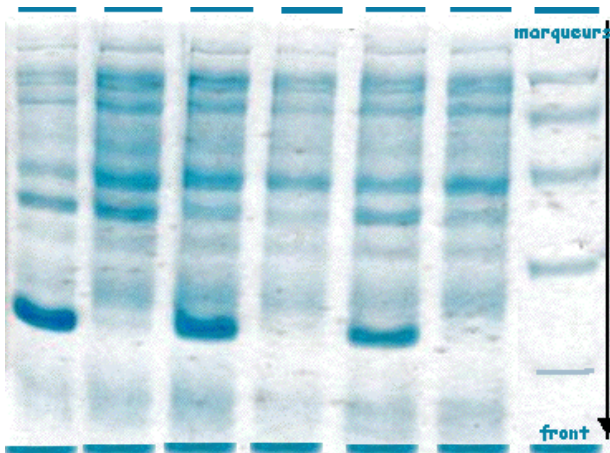
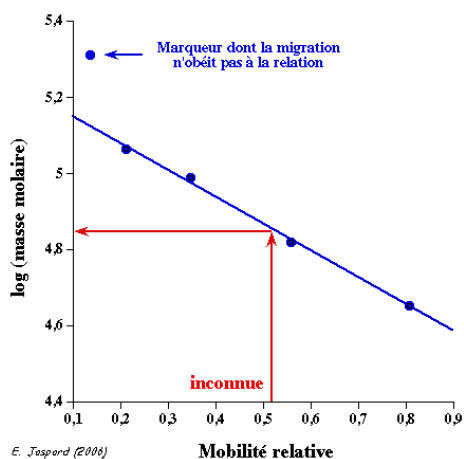


Figure 2.22. : Exemple de gel coloré au bleu de coomassie : A noter, dans le dernier puits, le marqueur de masse moléculaire et dans le fond de chaque puits, le bleu de bromophénol qui marque le front de solvant.

Détermination de la masse molaire d'une protéine



La mobilité relative est le rapport entre la distance de migration d'une bande et la distance de migration du front de migration.

La droite $\log(\text{masse molaire}) = f(\text{mobilité relative})$ permet de déterminer la masse molaire d'une protéine inconnue.

Variations sur le thème de l'électrophorèse

Electrofocalisation

Dans cette technique, un **gradient de pH** est établi à l'intérieur du gel de polyacrylamide. Ce gradient est établi par préélectrophorèse d'une série de molécules de faibles masses moléculaires contenant des groupes aminos et carboxyles appelés ampholytes. Lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique, la plus négative des espèces va se concentrer à l'électrode positive, alors que la plus positive va se concentrer à l'électrode négative. Les ampholytes intermédiaires vont se répartir entre eux, avec comme résultat global une migration des ampholytes vers leur point isoélectrique et l'établissement d'un gradient linéaire de pH dans le gel. **Une protéine analysée** sur ce type de gel **va migrer jusqu'au pH correspondant à son point isoélectrique** et s'y arrêter.

Electrophorèse à 2D

Cette technique consiste typiquement à soumettre les protéines à une électrofocalisation dans un gel de polyacrylamide coulé dans un tube cylindrique étroit. Après cette électrophorèse, le tube de gel est enlevé et placé au dessus d'un gel de concentration et soumis à une SDS-PAGE classique dans une direction de 90° par rapport à l'expérience d'électrofocalisation initiale. Si les protéines sont obtenues à partir de cellules marquées à la ^{35}Met , un gel 2 D représentant toutes les protéines produites par une population cellulaire donnée, peut être obtenu.

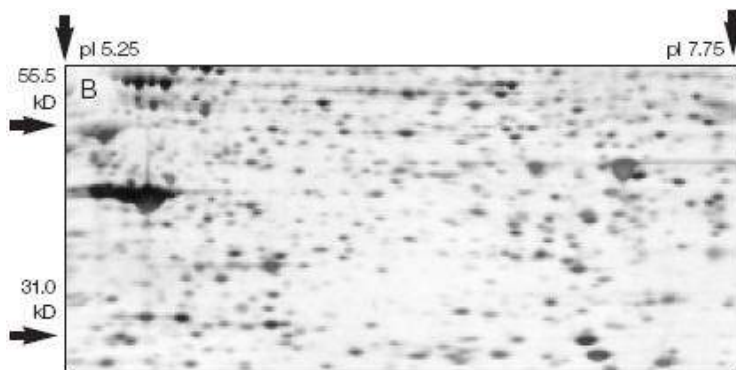
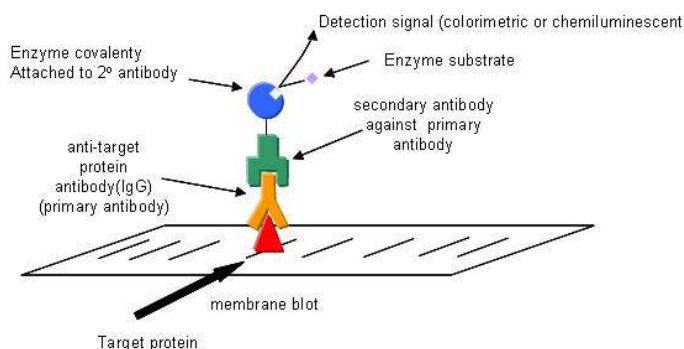


Figure 2.23. : Exemple de gel 2D.

Western blot :

Après une électrophorèse standard sur plaque, le gel est recouvert d'une membrane de nitrocellulose. Le sandwich de gel et de membrane est remplacé dans une chambre d'électrophorèse, de sorte que les protéines migrent du gel vers la nitrocellulose, où elles se lient irréversiblement. La membrane peut alors être ôtée et trempée dans une solution contenant un anticorps de la protéine d'intérêt. Ce complexe protéine-anticorps, formé sur la membrane peut alors être détecté par ajout d'un anticorps marqué et qui se lie sur le premier anticorps utilisé (celui qui est à présent lié à la protéine d'intérêt).

Figure 2.24. : Schématisation du principe de fonctionnement du western blot :



- La protéine d'intérêt est fixée sur une membrane de nitrocellulose.
- Un anticorps primaire (anti-protéine cible) se fixe sur la protéine.
- Un anticorps secondaire (anti-anticorps primaire), sur lequel est greffé une enzyme ou un fluorophore se fixe sur l'anticorps primaire.
- L'enzyme ou le fluorophore est à l'origine du signal permettant de détecter la présence de la protéine d'intérêt.

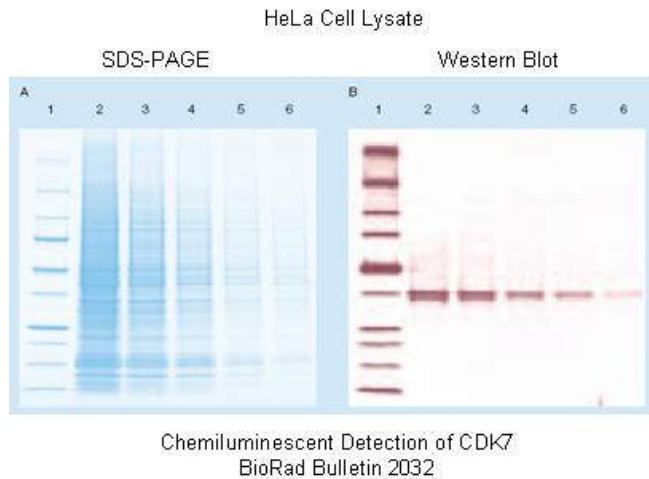


Figure 2.25. : Exemple de résultat que l'on peut obtenir avec un western blot :

- A gauche, le gel coloré au bleu de Coomassie.
- A droite, le résultat du western blot correspondant.

Gel d'électrophorèse d'ADN

La séparation de brins d'ADN ou d'ARN par électrophorèse repose sur le **même principe que** celle des **protéines**, si ce n'est que cette fois, c'est la charge négative des groupes phosphates portés par l'ADN et l'ARN qui provoquent leur migration vers l'électrode positive. Pour le séquençage de l'ADN et pour les analyses de **brins de petites tailles**, on peut utiliser des gels de **polyacrylamide**, comme pour les protéines, par contre, en général, pour de **simples analyses** de restrictions ou pour évaluer le résultat d'une PCR, on préférera utiliser des **gels d'agarose**.

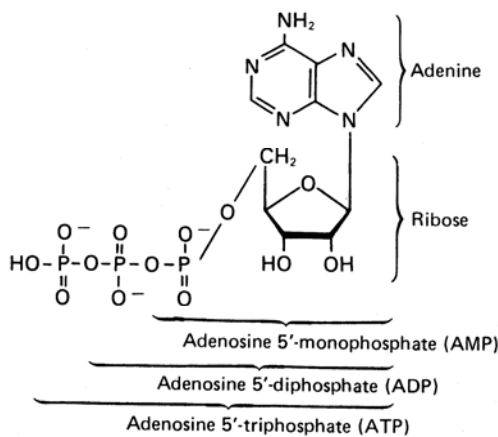


Figure 2.26. : Structure de l'ADN :

La charge négative due aux phosphates permet au brin de migrer vers l'électrode positive lors de l'électrophorèse.

Outre l'utilisation d'un gel d'agarose à la place d'un gel de polyacrylamide, l'autre différence notable entre la séparation de protéines et la séparation d'ADN par électrophorèse réside dans la géométrie de la cuve à électrophorèse, qui est, en général, horizontale dans le cas de l'ADN.

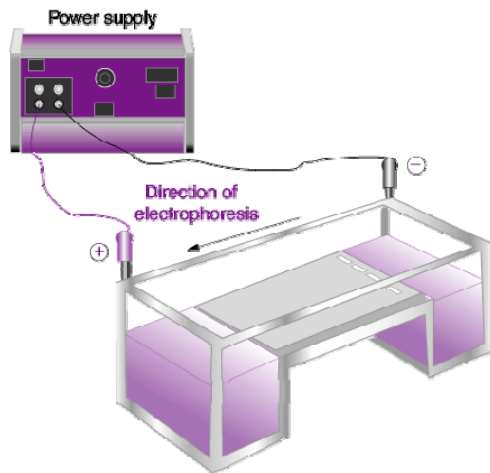


Figure 2.27. : Electrophorèse d'ADN :
Le gel d'agarose est déposé à l'horizontale.

Agarose et facteurs affectant la migration

On utilise en général un gel de **1 à 2 % M/V** (1 à 2 g d'agarose pour 100 ml de volume final). L'augmentation de la concentration en agarose dans le gel réduit la vitesse de migration et permet la séparation de fragments d'ADN de plus petite taille.

Le potentiel, lui, affecte la vitesse de migration. Plus le potentiel est élevé, plus la migration est rapide. Toutefois, il convient de limiter l'intensité du potentiel pour éviter une augmentation trop importante de la température du gel pouvant provoquer sa fonte.

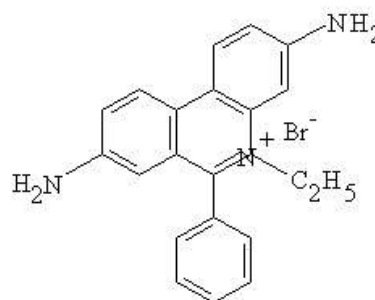
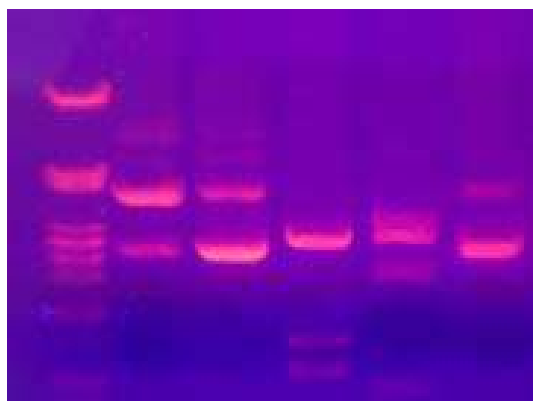
Le facteur le plus important est toutefois la longueur de la molécule d'ADN, ce qui permet la **séparation en fonction de la taille**. A noter que, comme pour les protéines, la **conformation de l'ADN** est un facteur **également important**. Ainsi, pour éviter les problèmes liés à ce paramètre, on ne sépare en général sur gel d'agarose que de l'ADN linéaire. La conformation d'ADN plasmidique non digérée par une enzyme de restriction migre à différentes vitesses (du plus lent au plus rapide) : ADN circulaire, ADN linéaire et ADN superenroulé.

Applications et avantages

- Estimation de la **taille d'un fragment d'ADN** après une digestion par des enzymes de restriction.
- **Analyse** d'ADN ou d'ARN après amplification **PCR**
- Séparation de fragments ADN digérés avant **Southern blot** ou d'ARN dans le cas du **Northern Blot**
- **Préparation aisée et rapide** des gels d'agarose
- **Pas de dénaturation** des échantillons
- Agarose plus **ferme** que le gel de polyacrylamide
- Les **échantillons peuvent être récupérés** en vue d'analyses supplémentaires.

Révélation de l'ADN

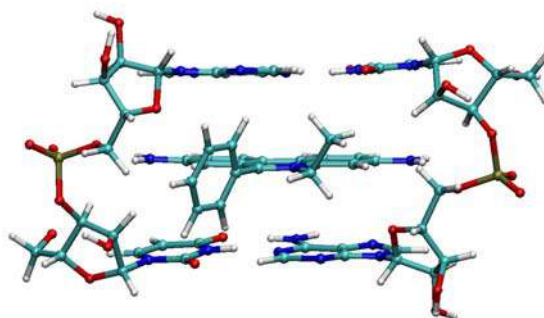
La méthode la plus utilisée est la révélation au **bromure d'éthidium** (BET), qui est un **agent d'intercalation fluorescent** couramment utilisé comme marqueur d'acides nucléiques en laboratoire de biologie moléculaire. Lorsqu'il est exposé à des rayonnements UV, il prend une coloration rouge-orangée, 20 fois plus intense lorsqu'il est lié à l'ADN. Cet effet est dû à l'augmentation de l'hydrophobie de l'environnement.



Ethidium Bromide

Figure 2.28. : Bromure d'Ethidium :

- En haut à gauche : exemple de révélation au bromure d'éthidium.
- En haut à droite : structure du bromure d'éthidium.
- A droite : Schématisation de l'intercalation du bromure d'éthidium au sein de l'ADN.



2.11. L'électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire (EC) est une technique séparative plus récente que la chromatographie, qui correspond à une amélioration technologique considérable de la méthode d'électrophorèse de zone, dont nous venons de parler, grâce aux acquis de la CLHP.

Elle se caractérise par un **grand pouvoir de séparation**, une excellente **sensibilité**, et par la possibilité de **quantifier** aussi bien les petites molécules que les biomolécules pour lesquelles la CLHP est beaucoup moins performante. Utilisée en divers modes, l'électrophorèse capillaire prend le nom d'ionophorèse lorsqu'il s'agit de l'analyse des ions inorganiques. En bref, elle a considérablement étendu le champ d'application de l'électrophorèse à bandelette, dont elle permet d'éliminer les tâches manuelles associées à la manipulation des gels, ainsi que l'étape subséquente de scannérisation des électrophorégrammes.

Généralités

Dans cette technique, le gel classique est remplacé par un **tube capillaire** ouvert à ses extrémités, en verre de silice (quartz fondu, verre extrêmement pur appelé parfois Silice UV) de très faible diamètre (30 à 100 μm) d'une longueur variant de 0,3 à 1 m et rempli d'une solution tampon. Les extrémités plongent dans **deux réservoirs d'électrolyte**, auxquels on applique une **différence de potentiel** pouvant atteindre 30 kV pendant le temps nécessaire.

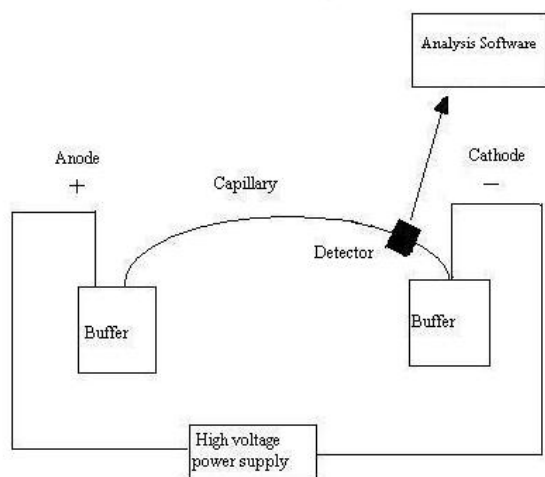


Figure 2.29. : Schéma général d'une électrophorèse capillaire : Un tube capillaire dont les extrémités sont plongées dans des réservoirs contenant des électrolytes et soumis à une différence de potentielle importante.

L'intensité du courant, dans ces conditions, ne dépasse pas 100 μA , soit une puissance dissipée d'un maximum de 3 W, ce qui limite l'échauffement du capillaire qui doit néanmoins être placé dans une enceinte thermostatée. L'électrolyte est un mélange soigneusement filtré et dégazé contenant divers additifs.

Un **détecteur** est placé un peu avant l'extrémité du capillaire. En mode de **détection UV**, le capillaire sert directement de cellule de mesure de l'absorbance. On évite ainsi tout volume mort et le mélange des composés séparés. Le trajet optique étant extrêmement faible, on peut l'augmenter en utilisant un capillaire avec bulbe ou en faisant la détection à l'intérieur d'un Z, mais ces deux procédés diminuent bien entendu la résolution de la méthode. On peut également réaliser une **détection électrochimique**, des électrodes étant alors insérées dans le capillaire. Finalement, la détection peut se faire par **spectrométrie de masse**.

Mobilité électrophorétique et flux électrostatique

Dans ce paragraphe, nous allons voir comment la théorie, que nous avons brièvement développée dans la section consacrée à l'électrophorèse de zone, s'applique à l'électrophorèse capillaire.

Les particules en suspension dans un liquide, de même que les molécules solvatées, peuvent porter une charge électrique résultante dont la grandeur et le signe dépendent de la

nature du milieu et en particulier de son pH. Cette charge provient de la fixation, à leur surface, d'ions contenus dans le milieu tampon. Pour des ions de tailles comparables, les vitesses de migration sont plus grandes s'ils sont porteurs de charges plus importantes. Pour chaque ion, la vitesse de migration résulte de l'équilibre entre la force électrique F_E qui s'exerce dans le champ E sur la particule de charge Q ($F = QE$), et les forces de frottement qui dépendent de la viscosité η du milieu. Pour les ions minéraux, les temps de migration dépendent de leur conductivité limite équivalente.

En électrophorèse capillaire, on observe que les constituants d'un mélange se **séparent** dans le temps par effet de **deux facteurs** principaux appelés **mobilité électrophorétique** et **flux électro-osmotique**, qui sont définissables pour les ions, les molécules, les particules ou les micelles.

Mobilité électrophorétique

La mobilité (ou migration) électrophorétique U_e **correspond au déplacement des molécules chargées, dans un électrolyte supposé immobile**, vers les électrodes de signe opposé. U_e correspond au quotient de la vitesse de migration de l'ion, v_e , par la valeur du champ électrique, E . $U_e = v_e/E = v_e \cdot L/V$, où L représente la longueur du capillaire et V la différence de potentiel appliquée à ses extrémités. U ($\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) s'obtient à partir d'une mesure expérimentale faite au départ d'un électrophorégramme. On affecte à la mobilité U_e le signe (+) ou (-) selon la nature de la charge portée; elle est nulle pour une espèce sans charge nette.

Flux électro-osmotique

Le second paramètre qui contrôle le mouvement des solutés est appelé flux électro-osmotique U_{os} . Il est **dû à l'écoulement de l'électrolyte** par effet de la paroi interne du capillaire, qui est tapissée de **groupements silanols** qui se déprotonnent si le pH est supérieur à 2 pour former une **couche polyanionique fixe**. Les cations du milieu tampon, qui viennent recouvrir la paroi, **se mettent en mouvement dès qu'un champ électrique est appliqué** au capillaire. **Les ions du tampon et les ions H^+** (sous forme d'ions H_3O^+) **entraînent les molécules électrolytiques de l'échantillon. Ainsi, même un anion peut se déplacer vers l'électrode négative**. Ce déplacement de l'électrolyte, produit par la charge des ions et le potentiel appliqué, peut être contrôlé en modifiant la tension, le pH ou en introduisant des additifs.

On définit U_{os} par une relation calquée sur la précédente, v_{os} représentant la vitesse électro-osmotique des molécules neutres de la phase mobile : $U_{os} = v_{os}/E = v_{os} \cdot L/V$.

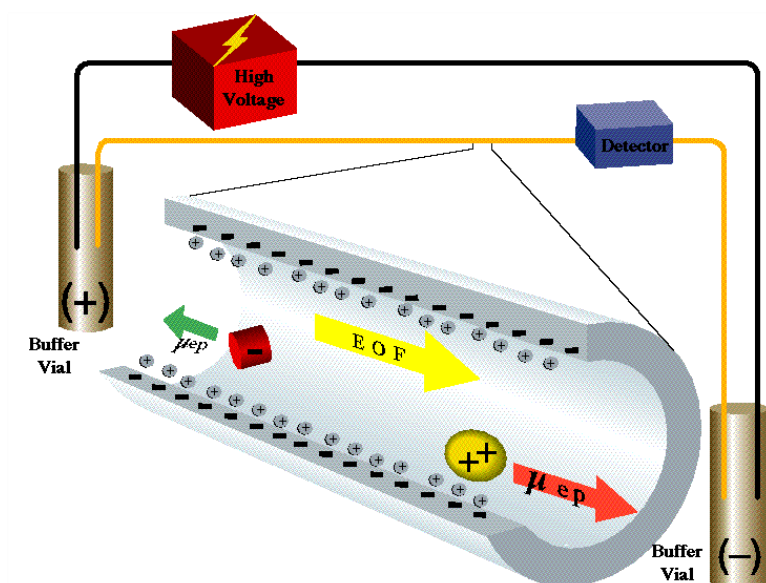


Figure 2.30. : Schématisation de la création du flux électro-osmotique.

Pour calculer U_{os} on doit déterminer v_{os} . Celle-ci est obtenue à partir du temps de parcours que met un marqueur neutre pour traverser le capillaire. On choisit une molécule organique, non polaire au pH de l'électrolyte utilisé et facilement détectable par absorption dans le proche UV, par exemple.

Dans les appareils d'électrophorèse capillaire, on met à profit le flux électro-osmotique pour **imposer à l'ensemble des espèces chargées de l'échantillon une même direction de migration** dont le sens va de l'anode (+) vers la cathode (-). L'accroissement de vitesse du flux électro-osmotique v_{os} diminue l'écart entre les temps d'arrivée des ions, allant dans le même sens, au niveau du détecteur.

L'emploi de tubes capillaires en silice fondue, partiellement désactivés par un revêtement interne, permet de moduler le flux électro-osmotique. Ainsi, avec une paroi rendue hydrophobe, comme en CLHP, par un traitement avec un alkylsilyle, les protéines deviennent séparables, alors qu'elles ont tendance à rester accrochées à la paroi lorsque celle-ci n'est pas traitée. A la limite, on peut ne récupérer qu'une seule catégorie d'ions, en fonction de la direction du champ appliqué.

Mobilité apparente

Le flux électro-osmotique, responsable d'une circulation de la phase mobile vers la cathode (-), est donc à prendre en compte pour évaluer la vitesse réelle de migration des molécules chargées. On observe que chaque ion a une vitesse apparente v_{app} facilement mesurable à partir de laquelle on définit une **mobilité électrophorétique apparente U_{app}** telle que : $U_{app} = U_{os} + U_e$. En désignant par L , la longueur du capillaire, et par V la tension appliquée, le temps de migration t est donné par :

$$t = \frac{L^2}{U_{app} V}$$

Expression que l'on retrouve facilement à partir de $U_{app} = v_{app} \cdot L/V$ et $v_{app} = L/t$.

Pour simplifier la compréhension de ce phénomène, on pourrait assimiler la migration des molécules dans le capillaire à une course de natation dans une rivière dont le courant serait la transposition du flux électro-osmotique. Si les nageurs vont à leurs vitesses propres d'un point amont à un point aval, ils arriveront moins séparés dans le temps que s'ils remontent le courant de l'aval vers l'amont. Si le courant est moins rapide que la vitesse des nageurs, ils effectueront le même parcours, mais en mettant plus de temps. Enfin deux troncs d'arbres (transposition de molécules neutres) partis au même instant arriveront sans que soit modifiée la distance les séparant.

Instrumentation

Pour introduire l'échantillon dans le capillaire, deux procédés d'injection sont utilisés :

- **L'injection hydrostatique** consiste à plonger l'extrémité du capillaire dans la solution échantillon et provoquer une aspiration à l'autre extrémité, ou à exercer une pression sur la solution échantillon. Ce mode d'injection n'est ***pas utilisable en électrophorèse sur gel***.
- **L'injection par électro-migration** est obtenue en immergeant quelques secondes l'extrémité du capillaire dans le mélange échantillon, au contact d'une électrode parcourue par une haute tension, dont on choisit la polarité. Par opposition avec le procédé précédent, ce mode d'injection provoque une action discriminante sur les composés présents qui conduit à faire une ***prise d'essai non représentative de la composition de l'échantillon de départ***.

Électrophorèse en veine liquide ou en solution libre

Procédé classique caractérisé par un capillaire rempli soit avec un tampon de pH acide (phosphate ou citrate) ou basique (borate), soit avec un ampholyte (molécule possédant une fonction acide et une fonction basique). Le flux électro-osmotique croît avec le pH de la phase liquide.

Électrophorèse capillaire sur gel

C'est l'électrophorèse de zone actualisée. Le capillaire est rempli avec un électrolyte contenant un gel qui stabilise le milieu contre le phénomène de convection et limite la

diffusion. La **séparation résulte des effets conjoints de l'électrophorèse et de la chromatographie par perméation de gel**. La résolution s'en trouve grandement améliorée.

Électrophorèse capillaire électrocinétique micellaire

Cette variante, encore appelée chromatographie électrocinétique, s'avère utile pour les molécules qui ont tendance à migrer sans séparation. On ajoute dans la phase mobile un détergent cationique ou anionique, tel le SDS, pour former des micelles. Ces infimes gouttelettes, non miscibles à la solution dont la surface est polaire, emprisonnent les composés neutres plus ou moins efficacement par affinité du type hydrophile/hydrophobe.

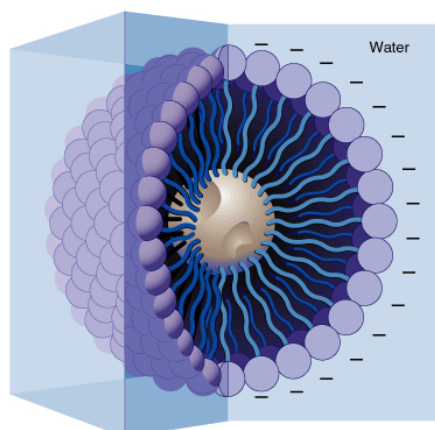


Figure 2.31. : Structure d'une micelle.

Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

Électrophorèse à focalisation isoélectrique

Cette technique est comparable à l'électrofocalisation, dont nous avons parlé dans la section consacrée à l'électrophorèse de zone, qui consiste à créer un gradient de pH dans le capillaire avec un mélange ampholyte. Dans un premier temps, les composés migrent jusqu'au point où le pH de l'électrolyte a la même valeur que leurs potentiels isoélectriques (pI). Ensuite, on change l'électrolyte pour déplacer l'ensemble des produits séparés vers le détecteur. Les résolutions élevées, observées avec ce procédé, permettent de séparer des peptides dont les pI ne diffèrent que de 0,02 % d'unité de pH.

Performances de l'électrophorèse capillaire

Les électrophorégrammes, dont l'aspect est identique aux chromatogrammes, servent aussi à calculer les mêmes paramètres de séparation (facteurs de capacité, sélectivités, résolutions). L'efficacité peut être déterminée, soit graphiquement à partir d'un pic, soit à partir du coefficient de diffusion D du soluté :

$$N = \frac{L^2}{s^2} \text{ ou } N = \frac{U_{\text{app}} V}{2D}$$

L'efficacité peut atteindre 400 000 plateaux par mètre. La relation ci-dessus montre qu'elle croît avec la différence de potentiel appliquée et que les macromolécules, dont les facteurs de diffusion sont normalement plus petits que pour les petites molécules, conduisent à de meilleures séparations.

La ***mise au point*** d'une séparation ***revient à trouver un milieu tampon adapté*** au problème à résoudre. L'électrophorèse capillaire est comparable à la chromatographie liquide quant aux performances. Elle complète utilement cette dernière pour les séparations de protéines, d'enzymes, de sucres et d'oligonucléotides. La sensibilité est très grande : on connaît des exemples de détection de quelques milliers de molécules vraies. La ***quantité requise d'échantillon est très faible*** et la consommation de réactifs ou de solvants est négligeable.

Enfin, il est possible de ***réunir électrophorèse capillaire et spectrométrie de masse*** en ligne, ce qui a donné un intérêt accru à cette méthode pour l'analyse des composés biologiques. L'effluent du capillaire est mélangé à un électrolyte d'appoint avant d'être nébulisé, ionisé et enfin introduit dans le spectromètre de masse.