



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

Université des Frères Mentouri-Constantine 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie et Ecologie Végétale



Méthodes analytiques appliquées à l'environnement

Master II

**Ecologie fondamentale et
appliquée**

Conçu et rédigé par :

Dr. ZEGHAD NADIA

Année universitaire

2021/2022

Tables des matières

Partie I : Techniques chromatographiques

Chapitre I : Généralités sur la chromatographie

1. Généralités	1
2. Classification des chromatographies	1
1.1. Classification fondée sur la nature de la phase mobile	1
1.2. Classification fondée sur les modalités adaptées pour immobiliser la phase stationnaire.....	2
1.3. Classification fondée sur les phénomènes physicochimiques à base de la séparation.....	2

Chapitre II : Chromatographie sur couche mince

1. Principe de la technique.....	6
2. Mise en œuvre pratique.....	8

Chapitre III : Chromatographie sur colonne

1. Principe de la technique.....	12
2. Choix de l'éluant.....	12
3. Choix de la phase stationnaire.....	13
4. Mise en œuvre pratique.....	13

Chapitre IV : Chromatographie en phase gazeuse

1. Définitions.....	16
2. Principe.....	16
3. Appareillage.....	16

Chapitre V : Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

1. Principe	22
2. Appareillage.....	24

Partie II : techniques spectrométriques

Chapitre I : Spectrométrie d'absorption moléculaire UV-VIS

1. Principe de la technique	29
2. Spectrophotomètre mono-faisceau.....	30
3. Loi de Beer-Lambert.....	30
4. Limitations de la loi de Beer-Lambert.....	31
5. Application de la spectrophotométrie	31
6. Mise en œuvre pratique.....	31

7. Précautions à prendre lors du remplissage des cuves.....	32
Chapitre II : Photométrie à flamme	
1. Définition	33
2. Principe.....	33
3. Appareillage.....	34
4. Préparation des échantillons	35
5. Applications	36
Chapitre III : Spectrophotométrie d'absorption atomique à flamme et au four graphite	
1. Qu'est-ce qui est mesuré ???.....	38
2. Principe et appareillage.....	38
3. Principales application.....	42
Chapitre IV : Spectrométrie de masse	
1. Définition.....	43
2. Principe et appareillage.....	43
3. Utilisation.....	47

Liste des figures

Figure 1 : Résine échangeuse de cations (cationique).....	3
Figure 2 : Résine échangeuse d'anions (anionique).....	3
Figure 3 : Schéma de tamisage moléculaire.....	4
Figure 4 : Représentation d'un gel d'exclusion.....	4
Figure 5 : Schéma de principe de la chromatographie d'affinité.....	5
Figure 6 : Schéma représentatif d'une CCM.....	7
Figure 7 : Schéma représentatif d'une cuve de chromatographie.....	8
Figure 8 : Technique de préparation d'un tube capillaire	8
Figure 9 : Elution d'une plaque de chromatographie sur couche mince.....	9
Figure 10 : Révélation d'une plaque de CCM de silice sous UV à 254 nm et 366 nm	10
Figure 11 : Schéma représentatif du rapport frontal.....	10
Figure 12 : Calcul du rapport frontal.....	11
Figure 13 : Schéma d'une colonne de chromatographie.....	12
Figure 14 : Quelques étapes décrivant la préparation d'une chromatographie sur colonne.....	15
Figure 15 : Exemple d'élution d'un composé par une chromatographie sur colonne	15
Figure 16 : Appareil de chromatographie en phase gazeuse.....	17
Figure 17 : Schéma représentatif d'un injecteur.....	18
Figure 18 : Injecteur à vaporisation directe.....	18
Figure 19 : Les colonnes chromatographiques remplies et capillaires.....	19
Figure 20 : Les colonnes chromatographiques utilisées en chromatographie phase gazeuse.....	19
Figure 21 : Configuration d'une chromatographie en phase gazeuse.....	21
Figure 22 : Configuration d'une chromatographie en phase gazeuse.....	21
Figure 23 : Principe d'une HPLC.....	22
Figure 24 : Principe de fonctionnement d'une chaîne d'HPLC	23
Figure 25 : Appareil de Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC).....	23
Figure 26 : Représentation schématique d'un appareil de Chromatographie en Phase Liquide.....	24
Figure 27 : Exemple d'une colonne d'HPLC.....	25
Figure 28 : Particules solides de Silice composant la phase stationnaire d'une colonne d'HPLC.....	25

Figure 29 : Présentation d'un détecteur.....	27
Figure 30 : Spectre électromagnétique.....	29
Figure 31 : Spectrophotomètre UV-VIS.....	29
Figure 32 : Principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre mono-faisceau.....	30
Figure 33 : Photométrie à flamme.....	33
Figure 34 : Schéma d'un photomètre de flamme.....	34
Figure 35 : Schéma d'un Photométrie à flamme.....	35
Figure 36 : Schéma représentatif de principales disciplines de la spectroscopie.....	37
Figure 37 : Spectrophotomètre d'absorption atomique	37
Figure 38 : Absorption, émission et ionisation d'électrons.....	38
Figure 39 : Principaux éléments d'une spectroscopie d'absorption atomique.....	39
Figure 40 : Composition générale d'une lampe à cathode creuse.....	39
Figure 41 : Etapes d'atomisation.....	39
Figure 42 : Schéma d'un spectrophotomètre d'absorption atomique de flamme.....	40
Figure 43 : Schéma d'un spectrophotomètre d'absorption atomique avec four en graphite.....	41
Figure 44 : Principe de Spectrométrie de masse.....	44
Figure 45 : Principe de l'électrospray.....	45
Figure 46 : Exemple de spectre d'ionisation.....	47
Figure 47 : Exemple d'un spectre en ionisation par impact électronique du cholestane	48
Figure 48 : Schéma d'un spectromètre de masse	48

***Partie I : Techniques
chromatographiques***

2. Généralités

Les méthodes chromatographiques sont des méthodes de séparation mettant en jeu différents processus physicochimiques. Historiquement, l'apparition de ces techniques remonte à 1903, date à laquelle le botaniste russe M. Tswett a réalisé la séparation de pigments végétaux de la chlorophylle sur une colonne remplie de carbonate de calcium avec l'éther de pétrole. La séparation du mélange en différentes bandes colorées a donné son nom à la méthode chromatographique (du grec *Khroma* qui signifie couleur). Des évolutions ont suivi la première expérience de Tswett. Citons parmi importantes, l'apparition de :

-**1938** : la chromatographie sur couche mince (Ismailov et Shraiber) ;

-**1939** : la chromatographie par échange d'ions (Samuelson) ;

-**1941** : la chromatographie de partage liquide-liquide (Martin et Syngé) ;

-**1952** : la chromatographie en phase gazeuse sur colonne remplies (James et Martin) ;

-**1959** : la chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire (Golay) ;

-**1962** : la chromatographie en phase supercritique (Klesper) ;

-**1968** : la chromatographie en phase liquide haute performance (Gidding et Kirkland).

L'origine de l'efficacité des techniques chromatographiques réside incontestablement dans le fait que les constituants du mélange à résoudre entrent dans une suite continue d'un nombre considérable d'équilibres avec deux phases :

*L'une **stationnaire**, appelée **phase fixe** ;

*L'autre dite **mobile** qui parcourt la première avec une vitesse déterminée

3. Classification des chromatographies

3.1. Classification fondée sur la nature de la phase mobile

On distingue :

- ✓ La chromatographie liquide ;
- ✓ La chromatographie gazeuse ;
- ✓ La chromatographie en phase supercritique.

3.2. Classification fondée sur les modalités adaptées pour immobiliser la phase stationnaire

On distingue :

- ✓ La chromatographie sur papier ou couche mince
- ✓ La chromatographie sur colonne

3.3. Classification fondée sur les phénomènes physicochimiques à base de la séparation

3.3.1. Partage

La chromatographie de partage est une méthode de séparation de molécules par chromatographie suivant leur migration/répartition différentielle dans deux phases liquides. La phase stationnaire est liquide et la phase mobile l'est aussi, les liquides doivent donc être non miscibles.

3.3.2. Adsorption

La chromatographie d'adsorption (fixation des molécules dissoutes par la phase solide) est une technique de chromatographie liquide-solide 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 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. On distingue :

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

3.3.3. Echangeurs d'ions

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. Le principe de la chromatographie ionique est basé sur les propriétés des résines échangeuses d'ions qui permettent une fixation sélective des anions ou des cations présents dans une solution. Sur la résine échangeuse d'ions conditionnée sous forme d'une colonne chromatographie circule en permanence un éluant. La solution à analyser est injectée et les ions sont fixés sélectivement sur la colonne. Les ions sont ensuite progressivement décrochés en fonction de leur taille, leur charge et leur degré d'hydratation. Chaque espèce ionique est séparée et est détectée par conductimétrie à la sortie de la colonne. La concentration de l'espèce dans la solution est directement proportionnelle à la conductivité. Des colonnes différentes sont utilisées pour analyser les anions et cations.

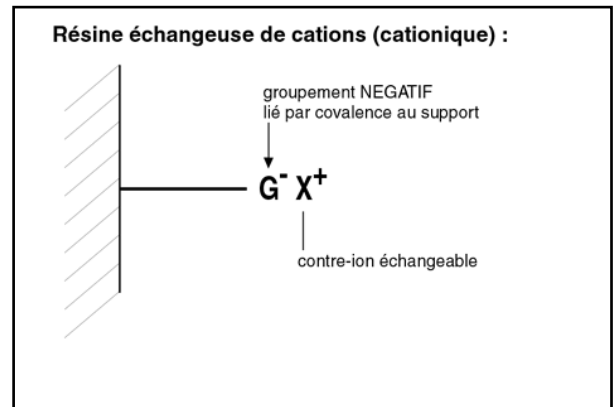


Figure 1 : Résine échangeuse de cations (cationique)

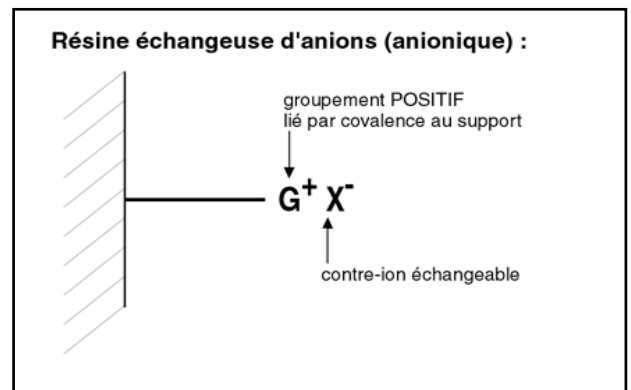


Figure 2 : Résine échangeuse d'anions (anionique)

3.3.4. Exclusion-diffusion

Ce type de chromatographie est encore appelé : tamisage moléculaire, gel-filtration ou perméation de gel. Cette technique permet la séparation des molécules en fonction 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 éluées les premières. Les petites et les 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'élué et le logarithme de la masse moléculaire.

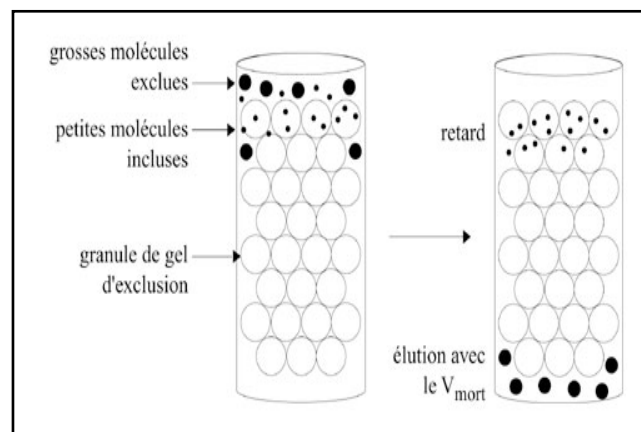


Figure 3 : Schéma de tamisage moléculaire

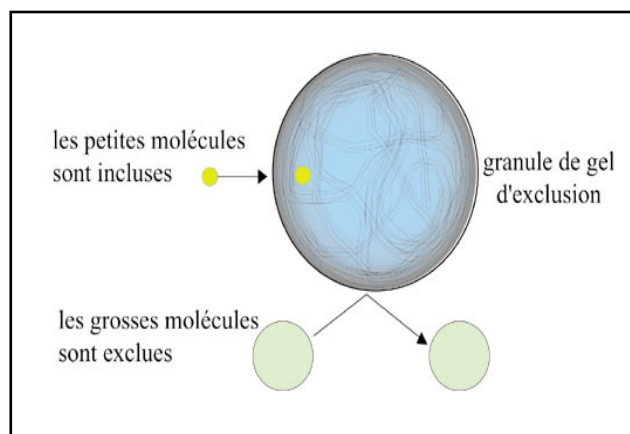


Figure 4 : Représentation d'un gel d'exclusion

3.3.5. Chromatographie d'affinité

La chromatographie d'affinité est une technique de chromatographie qui permet de séparer un composé en utilisant des interactions biologiques entre un ligand spécifique (greffé sur une matrice macromoléculaire) et son substrat, en l'occurrence la molécule à isoler. Sa principale application industrielle est la purification des anticorps monoclonaux (anticorps produits naturellement par une même ligné de lymphocyte B activés ou plasmocytes). Dans la chromatographie d'affinité, 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 le substrat, le ligand, ou bien l'anticorps. Ceci permettra de purifier l'enzyme, le récepteur ou l'antigène, respectivement.

Les principales étapes d'une chromatographie d'affinité sont :

1/ Etape de FIXATION : Le mélange de molécules contenant le composé à purifié 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.

2 - Etape de PURIFICATION : En continuant à faire passer du tampon dans la colonne, toutes les molécules contaminantes sont éliminées et éluées.

3 - Etape d'ELUTION : La molécule purifiée est décrochée de la colonne et est recueillie dans l'éluât.

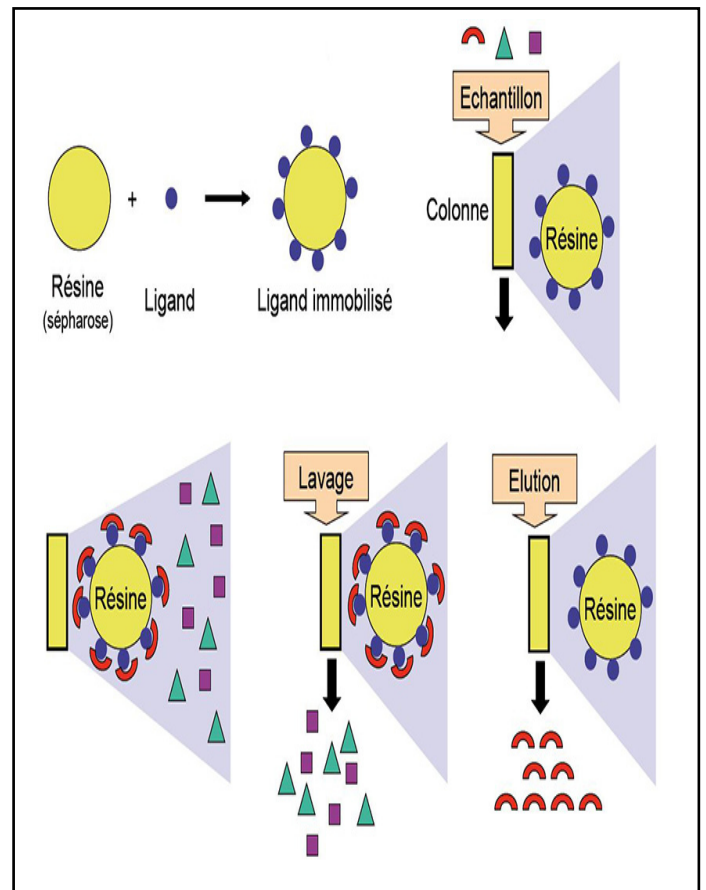


Figure 5 : Schéma de principe de la chromatographie d'affinité

Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique d'analyse qualitative. Elle a pour but de **séparer** les produits d'un mélange et permet d'**identifier** un composé, de **vérifier** sa **pureté** ou de **suivre l'avancement** d'une réaction en analysant des prélèvements successifs du milieu réactionnel afin de mettre en évidence l'apparition de produits et/ou la disparition des réactifs.

1. Principe de la technique

Considérons un mélange de composés que l'on souhaite séparer. Lors d'une CCM, le mélange est déposé sur un solide poreux adsorbant appelé **phase stationnaire** qui recouvre une plaque rigide inerte. La partie inférieure de cette plaque est mise en contact avec un solvant appelé **phase mobile** qui monte **par capillarité** : on parle d'**élution** et la **phase mobile** est appelé **éluant**.

Lors de l'élution, les différents composés du mélange migrent plus ou moins haut sur la plaque du fait de la compétition entre trois phénomènes :

1. **Adsorption des composés** sur la phase stationnaire ;
2. **La solubilisation des composés** avec l'éluant ;
3. **L'adsorption de l'éluant** sur la phase stationnaire (qui remplace les composés adsorbés sur la phase stationnaire est les pousse alors vers le haut) (Bernard et al., 2012)

Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve chromatographique, l'éluant monte à travers la phase stationnaire. Mais, en fonction de sa densité, de sa solubilité dans la phase mobile et des forces électrostatiques retenant le composant sur la phase stationnaire, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse dans l'absorbant. Le contenant sera une cuve chromatographique, à savoir un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche.

On va devoir gérer 3 éléments bien définis :

1. **La phase mobile, également appelée éluant** : c'est un solvant (ou un mélange de solvants), qui progresse le long d'une phase dite « stationnaire », fixée sur un support, en entraînant les composants de l'échantillon. Selon le type d'analyse à réaliser, le choix de l'éluant sera variable :

- ✓ **Pour les hydrocarbures** : hexane, éther de pétrole ou benzène.
 - ✓ **Pour des groupements fonctionnels courants** : hexane ou éther de pétrole, mélangés en proportions variables avec du benzène ou de l'éther diéthylique.
 - ✓ **Pour des composés polaires** : éthanoate d'éthyle, propanone ou méthanol.
2. **La phase stationnaire**: c'est une couche d'environ 0.25 mm de gel de silice (un adsorbant parmi d'autres) qui est fixée sur une plaque de verre (ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium, voire même sur une feuille de papier), à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté (plâtre), l'amidon ou un polymère organique. Après le dépôt de l'échantillon sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant. Par ordre d'importance décroissante, les adsorbants employés en CCM sont le gel de silice, l'alumine, le kieselguhr et la cellulose.
3. **L'échantillon** : il est mis en solution (2 à 5 %) dans un solvant volatil, qui n'est pas forcément le même que l'éluant : les plus utilisés sont le trichlorométhane (chloroforme), la propanone ou le dichlorométhane. La solution (1 cm³ max.) est déposée sur la plaque, à environ 1 cm de la partie inférieure.

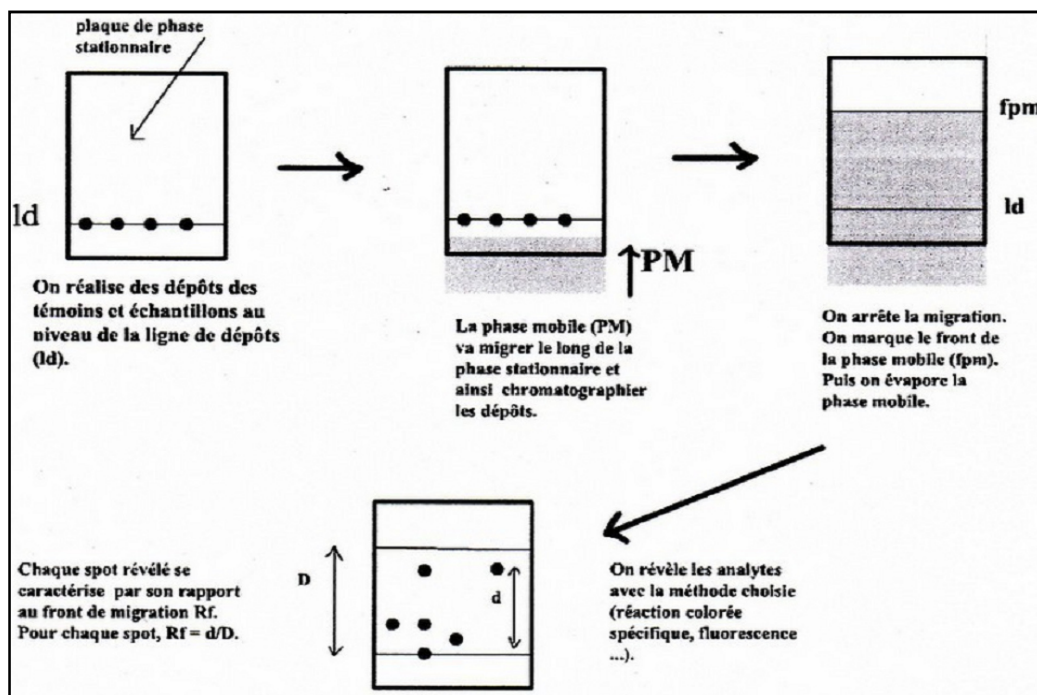


Figure 6 : Schéma représentatif d'une CCM

2. Mise en œuvre pratique

2.1. Préparation de la plaque : à environ 1 cm du bas, sur la face recouvrante de Silice, tracer un trait (**ligne de dépôt**) au crayon sans rayer la surface. Figurer les endroits où seront déposés les différents échantillons.

2.2. Préparation de la cuve : remplir la cuve avec l'éluant de sorte à avoir un demi-centimètre de hauteur de liquide. Fermer la cuve afin de la **saturer en vapeur d'éluant** (la plaque est alors placée dans un environnement homogène)

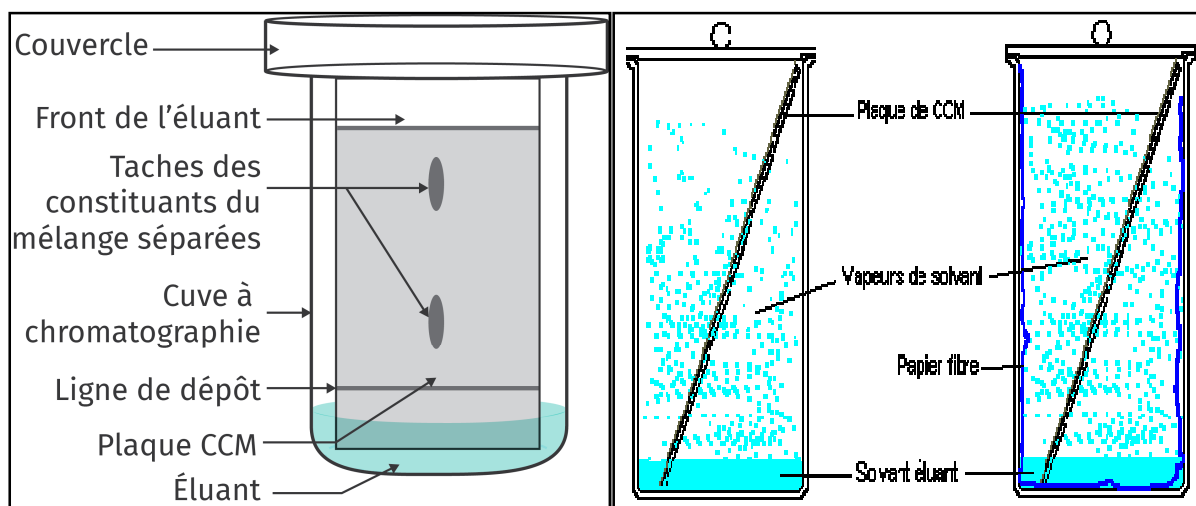


Figure 7 : Schéma représentatif d'une cuve de chromatographie

2.3. Dépôts des échantillons dilués : chaque échantillon à analyser est **dissous** s'il est solide ou dilué s'il est liquide dans un solvant très volatil (souvent de l'acétone). Les dépôts sont réalisés à l'aide d'un **tube capillaire** (fig.7), placé perpendiculairement à la plaque de silice. Les taches doivent être distantes du bord d'environ un centimètre et espacées entre elles d'au moins un demi-centimètre.

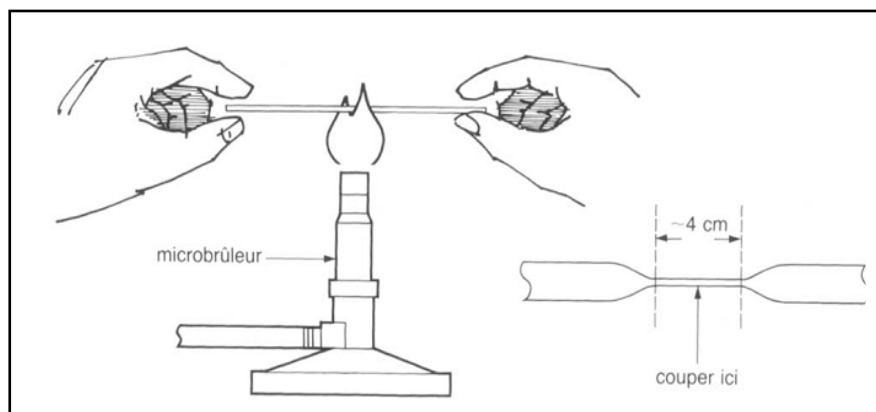


Figure 8 : Technique de préparation d'un tube capillaire

2.4.Introduction dans la cuve : introduire la plaque verticalement dans la cuve à l'aide d'une pince pour éviter de toucher la plaque avec des doigts. Seul le bas de la plaque, **en dessous de la ligne de dépôt**, plonge dans le liquide.

2.5.Elution : l'éluant migre lentement du bas vers le haut de la plaque par capillarité. **Ne pas déplacer la cuve** pendant l'élution, sous peine de provoquer des irrégularités dans la montée de l'éluant. Lorsque **le front de l'éluant** arrive à environ 1cm du haut de la plaque, la retirer de la cuve. Par un crayon repérer immédiatement ce front et faire sécher la plaque (l'éluant s'évapore).

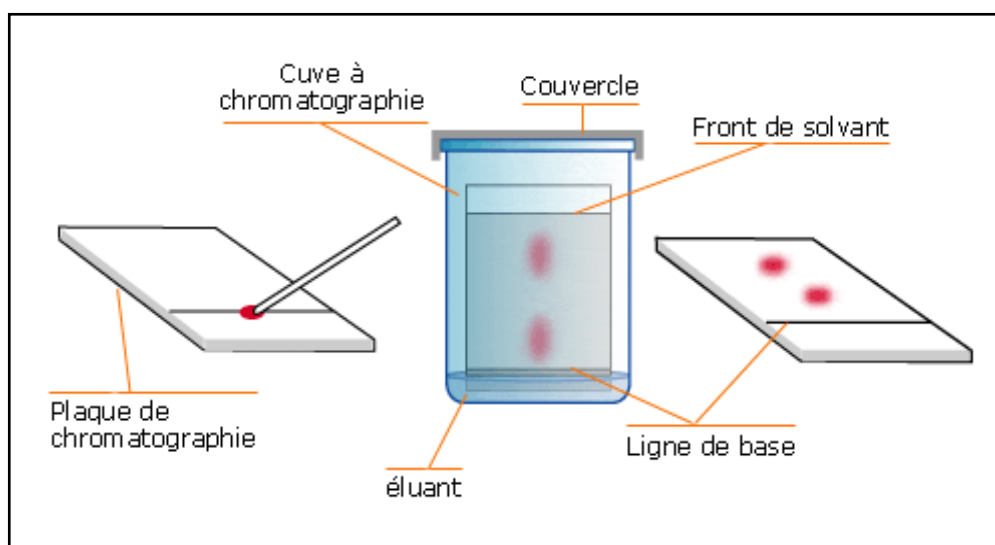


Figure 9 : Elution d'une plaque de chromatographie sur couche mince

2.6.Révélation : il faut maintenant mettre en évidence les espèces chimiques entre la ligne de dépôt et le front de l'éluant.

- ✓ **Révélation visuelle :** si les molécules absorbent dans le visible, les taches colorées sont directement observables à l'œil. Dans le cas contraire, il faut **rendre visible** c'est-à-dire révéler la position des espèces chimiques. Les plaques de silice communément utilisées sont couvertes d'un **indicateur fluorescent**. Sous irradiation UV ($\lambda=254\text{nm}$) (radiation verte). Dès lors qu'un composé déposé sur la plaque absorbe le rayonnement UV, il masque la surface fluorescente. On observe alors à cet endroit une tache sombre qui correspond à une absence de fluorescence de l'indicateur. La position des taches est indiquée au crayon.

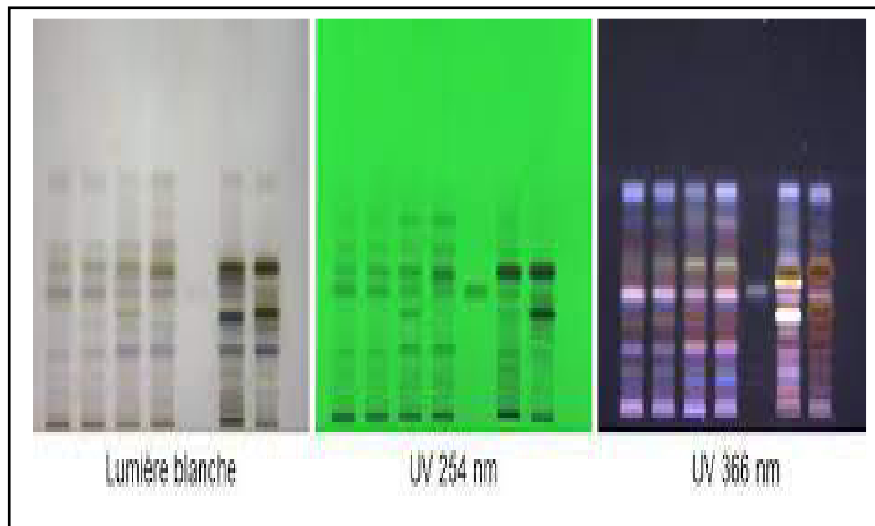


Figure 10 : Révélation d'une plaque de CCM de silice sous UV à 254 nm et 366 nm

- ✓ **Révélation chimique** : si les molécules absorbent peu vers 254 nm, on utilise un agent chimique qui va réagir avec les composés souvent par oxydation, en faisant apparaître les taches colorées.

Interprétation : l'interprétation d'une CCM consiste à comparer les hauteurs relatives des différentes taches. Pour chaque espèce chimique révélée, on peut quantifier l'éluion en calculant le rapport frontal R_f définie par : $R_f = d/D$ où d est la distance entre la ligne de dépôt et le centre de la tache et D la distance entre la ligne de dépôt et le front de l'éluant. Le rapport frontal est caractéristique du comportement d'une espèce chimique avec un éluant et une phase stationnaire donnée.

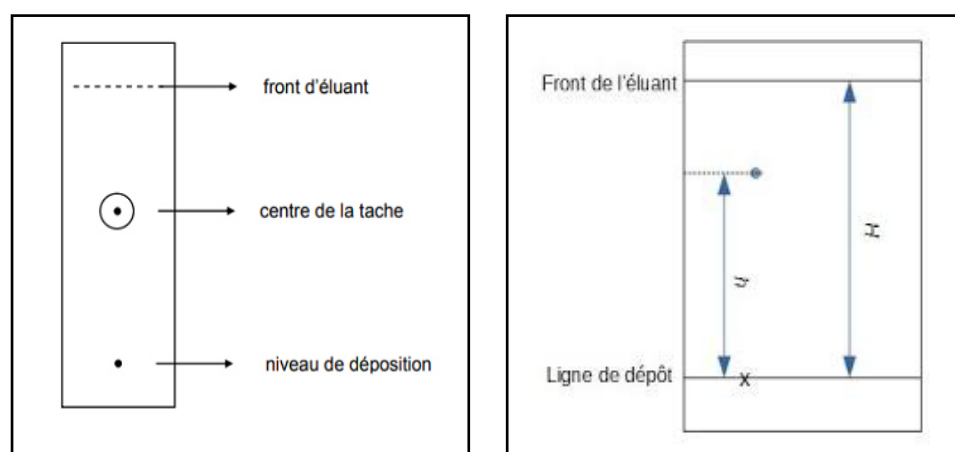


Figure 11 : Schéma représentatif du rapport frontal

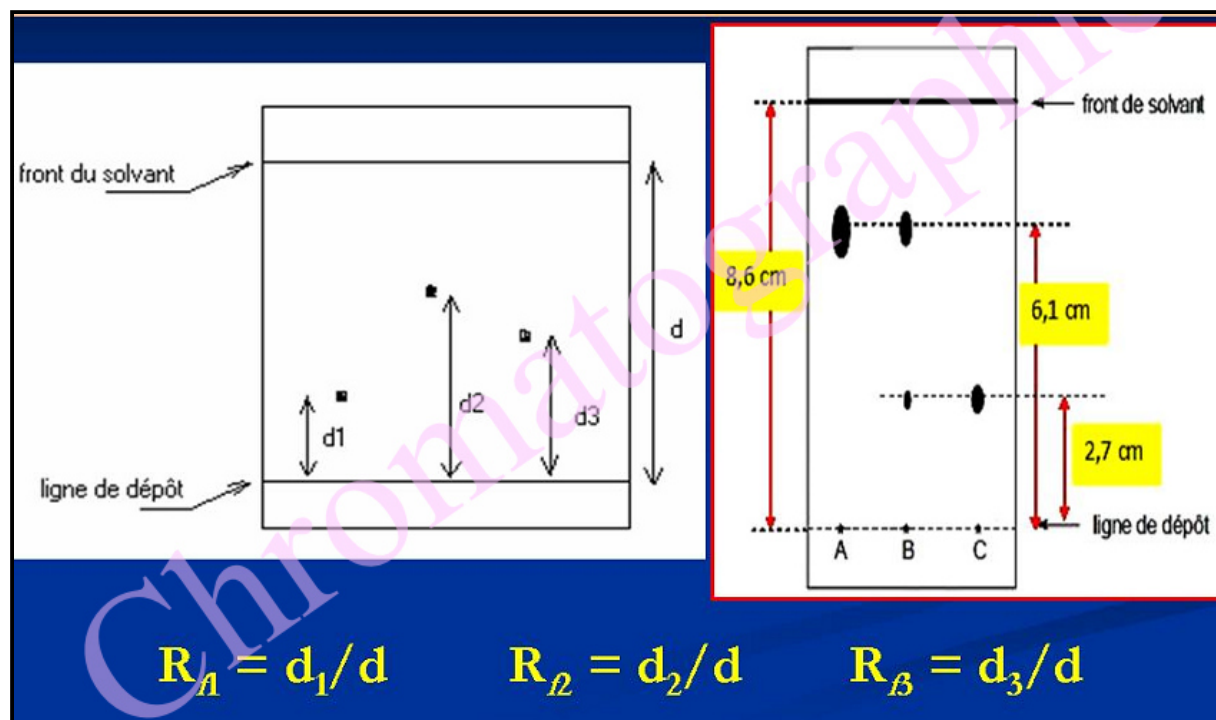


Figure 12 : Calcul du rapport frontal

Chromatographie sur colonne

La chromatographie sur colonne est une **méthode de purification** couramment utilisés en chimie organique afin de séparer les constituants d'un mélange. Contrairement à la chromatographie sur couche mince (CCM) qui est une technique essentiellement analytique.

1. Principe de la technique

La séparation des produits d'un mélange repose sur **les mêmes principes que la CCM**, à savoir leurs affinités relatives pour une **phase mobile** et une **phase stationnaire**. Lors d'une chromatographie sur colonne, l'adsorbant placé dans la colonne constitue la phase stationnaire tandis que **l'éluant** qui se déplace par gravité (et parfois sous l'effet d'une surpression) constitue la **phase mobile**.

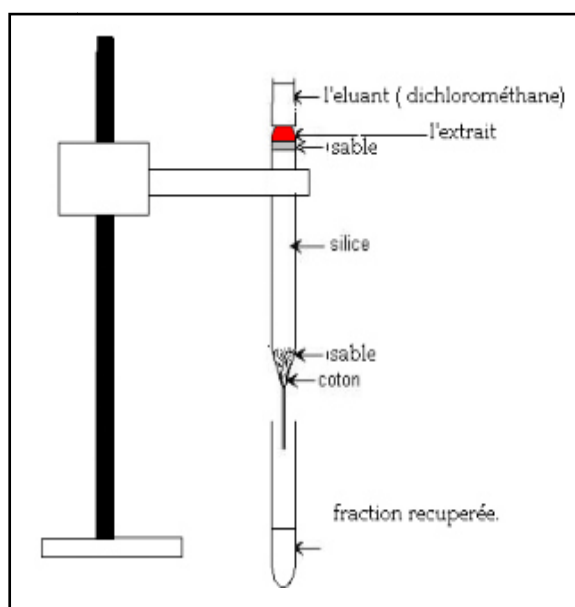


Figure 13 : Schéma d'une colonne de chromatographie

2. Choix de l'éluant

Comme en chromatographie sur couche mince, l'éluant est choisi en fonction de la nature des molécules à séparer. Des **mélanges de différents solvants** peuvent être réalisés pour ajuster la polarité de l'éluant. Avant d'entreprendre une chromatographie sur colonne, des CCM sont réalisées avec des éluants différents afin de déterminer les conditions de séparation optimales. Une bonne séparation nécessite que :

-Les composés ne migrent pas au-delà du **premier tiers de la plaque**

-Les taches soient **suffisamment séparées** tout en restant dans le premier tiers de la plaque.

Si l'éluant est un mélange de solvants, la séparation peut être réalisée soit en utilisant le même mélange tout au long de l'élution, soit en augmentant graduellement la polarité de l'éluant au cours de l'élution : on réalise alors un gradient de polarité. Cette méthode permet d'entraîner successivement l'ensemble des composés présents dans le mélange.

3. Choix de la phase stationnaire

3.1. Propriétés acido-basique des adsorbants

On distingue principalement deux types d'adsorbants : **la silice** et **l'alumine**. La silice possède un caractère **acide** alors que l'alumine existe sous des formes **acide, basique ou neutre**.

3.2. Quantité d'adsorbant utilisée

La quantité d'adsorbant utilisée dépend principalement de deux facteurs : **la masse de l'échantillon à purifier** et **la difficulté de la séparation**.

4. Mise en œuvre pratique

4.1. Préparation de l'adsorbant

L'adsorbant n'est pas introduit en poudre dans la colonne mais sous la forme d'un gel (mélange d'adsorbant et d'éluant). Le gel est préparé en ajoutant par **petites portions** l'adsorbant dans un bécher contenant l'éluant. Le mélange est homogénéisé à chaque ajout à l'aide d'une baguette de verre. Le gel obtenu doit être suffisamment fluide pour pouvoir couler sur les parois de la colonne lors de son remplissage.

L'adsorbant en poudre est composé de grains de taille micrométrique, son inhalation est dangereuse. Il est nécessaire de porter un masque et de travailler sous hotte.

4.2. Remplissage de la colonne

- ✓ Placer un petit **morceau de coton** au fond de la colonne afin de retenir contenu. Le tasser légèrement avec une baguette en verre. **Fixer fermement** la colonne de chromatographie, robinet fermé, en s'assurant de sa **verticalité**.
- ✓ Verser approximativement 5 cm d'éluant dans la colonne.
- ✓ Ajouter environ 1 cm de sable. La couche de sable permet d'obtenir une couche d'adsorbant horizontale.
- ✓ Introduire une première portion de gel. Faire couler le **gel lentement sur les parois** afin de ne pas déformer la couche de sable.

- ✓ **Tapoter** continuellement les parois de la colonne pour assurer un tassement efficace du gel et obtenir un adsorbant homogène. Ouvrir le robinet pour évacuer le surplus d'éluant sans assécher la silice. A l'aide d'une pipette Pasteur, rincer les parois avec de l'éluant afin d'entraîner le gel qui pourrait y adhérer.
- ✓ Ajouter le reste de gel par petits portions. Vérifier que la couche supérieure d'adsorbant est **parfaitement horizontale** et qu'il n'y a **ni fissure ni bulle d'air**. Toute hétérogénéité compromet l'efficacité de la séparation en modifiant la vitesse de migration en fonction de la distance à l'axe de la colonne.
- ✓ Ajuster le niveau de l'éluant à 2 ou 3 cm au dessus de la colonne supérieure d'adsorbant puis ajouter environ 1cm de sable. Tapoter la colonne pour tasser le sable.

Il est important de ne jamais laisser la colonne s'assécher. Dans le cas contraire, des canaux peuvent se former et créer ainsi des chemins préférentiels pour le passage des composés à purifier.

4.3. Dépôt du mélange à purifier

Que le mélange à purifier soit liquide ou solide, il est préalablement dilué dans un minimum de solvant d'élution (le moins polaire). Le dépôt est ensuite réalisé en suivant les étapes décrites ci-dessous

- ✓ Ajuster le niveau d'éluant de façon à **affleurer la surface du sable**
- ✓ A l'aide d'une pipette Pasteur, réaliser le dépôt **le plus près possible de la surface de sable** en touchant la paroi de la colonne avec extrémité de la pipette. Faire pivoter circulairement l'extrémité de la pipette sur la paroi de manière à obtenir un dépôt cylindrique fin et uniforme.
- ✓ Ouvrir le robinet de la colonne jusqu'à l'assèchement du sable pour que le dépôt pénètre dans la couche d'adsorbant. S'il y a une quantité importante à déposer à déposer, faire pénétrer entre chaque dépôt.
- ✓ Si besoin, ajouter, à l'aide d'une pipette Pasteur, le minimum d'éluant de façon à laver les parois. Faire à nouveau pénétrer dans l'adsorbant
- ✓ Ajouter quelques centimètres d'éluant à l'aide d'une pipette Pasteur en contact avec les parois de la colonne. les ajouts ultérieurs peuvent être effectués plus rapidement avec un erlenmeyer (tout en prenant garde à ne pas perturber la couche supérieure d'adsorbant).

4.4.Elution

- ✓ Régler le débit en bas de colonne au goutte à goutte (1 à 2 gouttes par seconde)
- ✓ Recueillir des fractions de volume constant dans des tubes numérotés
- ✓ Au cours de l'éluion, des CCM sont réalisées sur les fractions recueillies afin **d'identifier** les composés présents
- ✓ Dans le cas de l'utilisation d'un gradient de solvant, ces CCM permettent aussi de déterminer le moment où la polarité de l'éluant peut être augmentée
- ✓ Finalement, les fractions correspondant au produit désiré sont **réunies** puis le solvant est éliminé à l'**évaporateur rotatif**

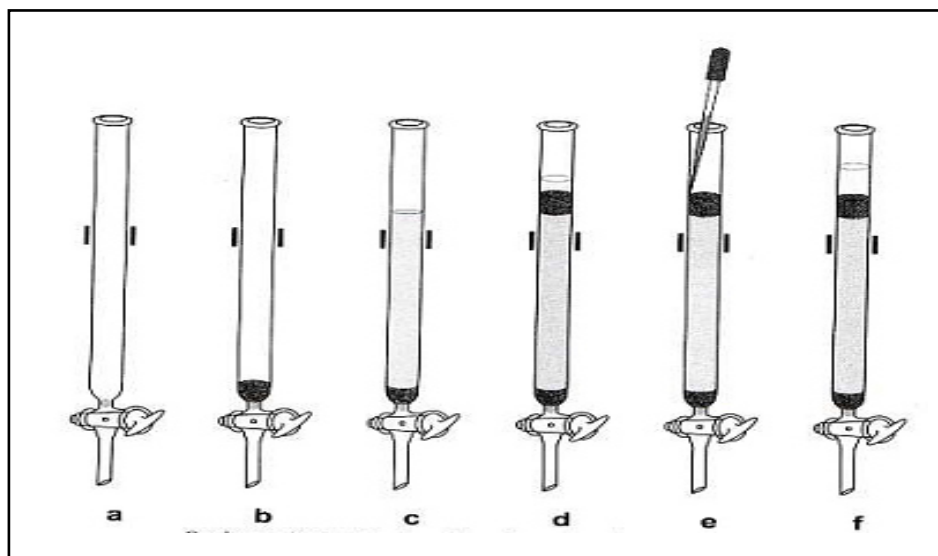


Figure 14 : Quelques étapes décrivant la préparation d'une chromatographie sur colonne

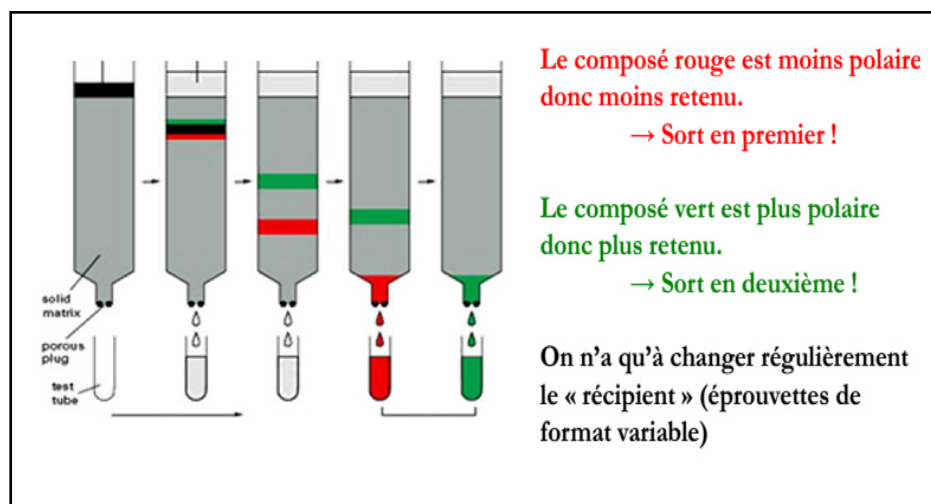


Figure 15 : Exemple d'éluion d'un composé par une chromatographie sur colonne

Chromatographie en phase gazeuse

1. Définition

C'est une chromatographie de partage dans laquelle la phase **mobile est un gaz**. Elle constitue la méthode la plus puissante et la plus fine pour séparer, identifier et quantifier les corps gazeux ou volatiles.

2. Principe

La phase liquide stationnaire est le plus souvent déposée sur un support poreux inactif réparti dans une colonne traversée par un gaz inerte constituant la phase mobile (gaz vecteur). Les composés à séparer, injectés au début du circuit à faible ou très faible concentrations (quantités injectées de l'ordre de μg) sont entraînés progressivement en fonction de certaines caractéristiques physiques. Ils apparaissent fractionnés les uns après les autres à la sortie de la colonne où ils sont détectés.

Les substances à séparer constituent les solutés et le gaz qui les véhicule est appelé **gaz vecteur**.

3. Appareillage

L'appareillage comprend les parties suivantes :

- Une bouteille de gaz vecteur A avec un dispositif de régulation du débit gazeux R pour suivre la pression d'entrée P_e ;
- Un dispositif **d'introduction de l'échantillon B** ;
- Une **colonne C** ;
- Un **détecteur D** en relation avec un enregistreur E



Figure 16 : Appareil de chromatographie en phase gazeuse

3.1. Le gaz vecteur (phase mobile)

Le gaz vecteur est le gaz qui circule à l'intérieur du chromatographe, entraînant les analytes à travers la colonne, depuis l'injecteur jusqu'au détecteur. Son choix dépend du type de détecteur utilisé ; cela peut être par exemple de l'hélium, de l'azote, de l'argon ou de l'hydrogène.

Le débit de ce gaz vecteur est de l'ordre de 30 à 40 mL/min pour les colonnes remplies et de 0,2 à 2 mL/min pour les colonnes capillaires. Le débit du gaz vecteur influe sur le pouvoir de résolution du chromatographe.

3.2. Le système d'injection

Ce système permet à la fois l'introduction de l'échantillon dans la colonne du chromatographe, ainsi que la volatilisation des analytes. La température de l'injecteur doit être réglée de manière à entraîner la vaporisation de tous les analytes de l'échantillon : elle est généralement maintenue à 50 °C au-dessus de la température d'ébullition de l'analyte le moins volatil.

L'introduction se fait à l'aide d'une microsiringue (le volume à injecter est généralement voisin de 1 μ L) à travers un septum (qui assure l'étanchéité) dans un *liner* (typiquement un tube de verre rempli d'un petit morceau de coton).

Si l'échantillon contient des espèces non-volatiles, celles-ci sont retenues sur le coton et donc non-injectées dans la colonne, ce qui permet de la protéger. Les espèces volatiles sont vaporisées et entraînées par le gaz vecteur vers la tête de la colonne.

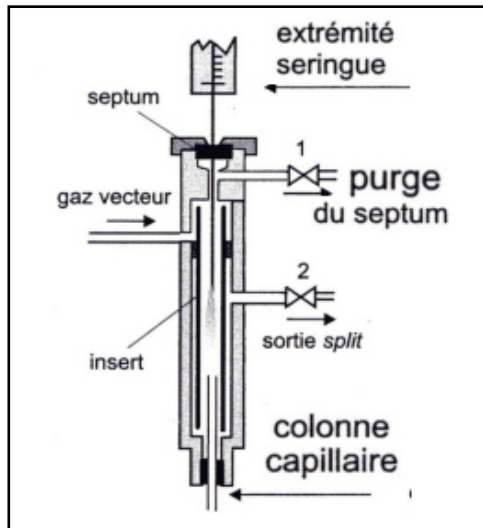


Figure 17 : Schéma représentatif d'un injecteur

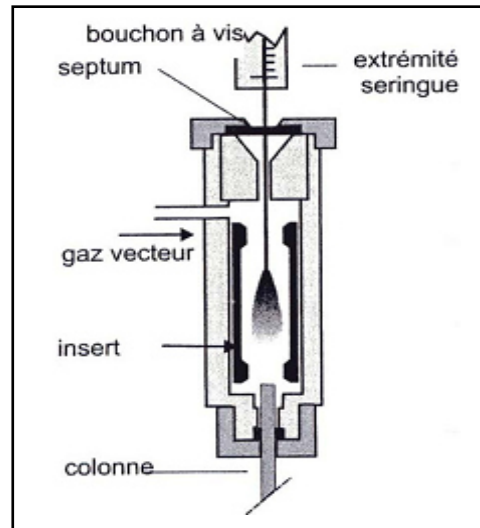


Figure 18 : Injecteur à vaporisation directe

3.3. La colonne (phase stationnaire)

Il existe deux types de colonnes : les colonnes remplies et les colonnes capillaires (**Figure 19**).

-**Les colonnes remplies** de diamètre intérieur de l'ordre de 4 mm et de 1 à 5 m de long. Leur résolution est moyenne mais elles restent utiles pour des séparations préparatives. Elles sont remplies de granules de support inerte, généralement de la silice, dont la surface est imprégnée ou greffée avec la phase stationnaire. Elles sont aujourd'hui supplantées par les colonnes capillaires, dont le pouvoir de résolution est bien supérieur;

-**Les colonnes capillaires** ou creuses de diamètre intérieur variant de 0.10 mm à 0.32 mm et d'une longueur typique de plusieurs dizaines de mètres, pouvant aller jusqu'à 100 m. Sont de simples tubes d'acier inoxydable, de verre ou de silice fondue (matériau inerte vis-à-vis de la phase stationnaire et des échantillons)

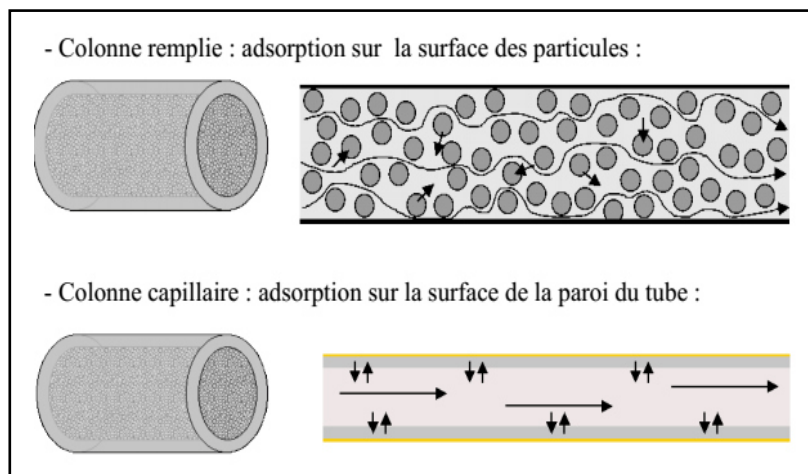


Figure 19 : Les colonnes chromatographiques remplies et capillaires

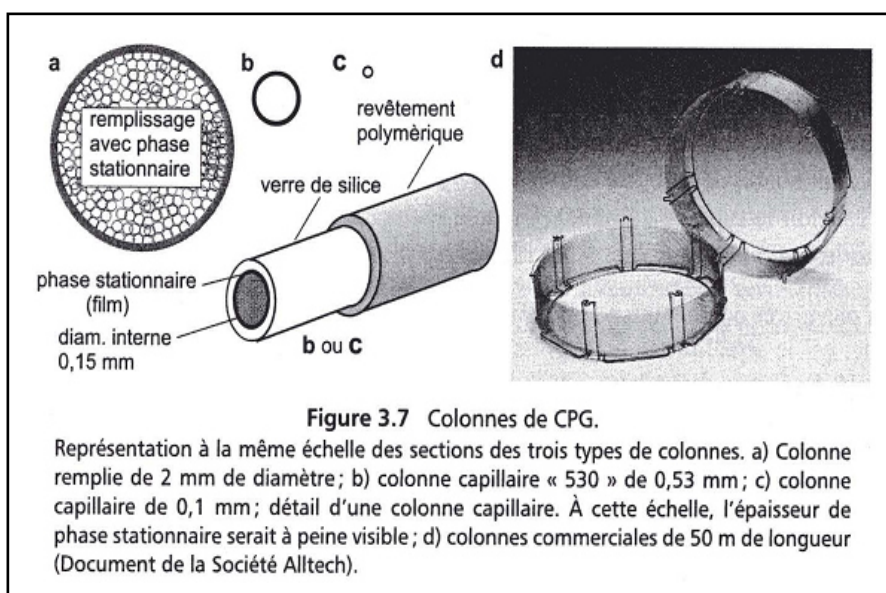


Figure 20 : Les colonnes chromatographiques utilisées en chromatographie phase gazeuse

Afin de maximiser l'influence de l'équilibre de partage, la colonne est choisie de telle sorte que le temps de rétention des analytes soit important. Une colonne capillaire de faible diamètre, longue, présentant une phase stationnaire épaisse et ayant des propriétés chimiques similaires aux molécules de l'échantillon permet typiquement d'obtenir de meilleures séparations.

3.4. Four

Il doit posséder une excellente stabilité thermique. L'homogénéité de la température est assurée par un système de ventilation sous le contrôle d'un programme de température permettant de définir les températures initiale et finale et les durées de chaque palier de température. Les analyses se font en mode **isotherme** ou en **programmation** de température.

La colonne est contenue donc dans un four de type chaleur tournante, dont la température est précisément ajustable (typiquement entre 20 °C et 350 °C) et programmable. Les températures utilisables en pratique dépendent des domaines de stabilité en température de la colonne utilisée, et de ceux des composés analysés.

Plus la température du four (et donc de la colonne) est élevée, plus les analytes se déplacent rapidement dans la colonne, mais moins ils interagissent avec la phase stationnaire, et donc moins les analytes sont séparés. Le choix de la température est donc un compromis entre la durée de l'analyse et le niveau de séparation désiré.

3.5. Détecteurs

Ils sont placés immédiatement à la sortie de la colonne et sont traversés par la phase mobile contenant éventuellement les solutés. En sortie de colonne, les analytes rencontrent donc le détecteur, généralement couplé à un enregistreur numérique du signal qui permet son traitement. Cet élément mesure en continu une grandeur proportionnelle à la quantité des différents analytes.

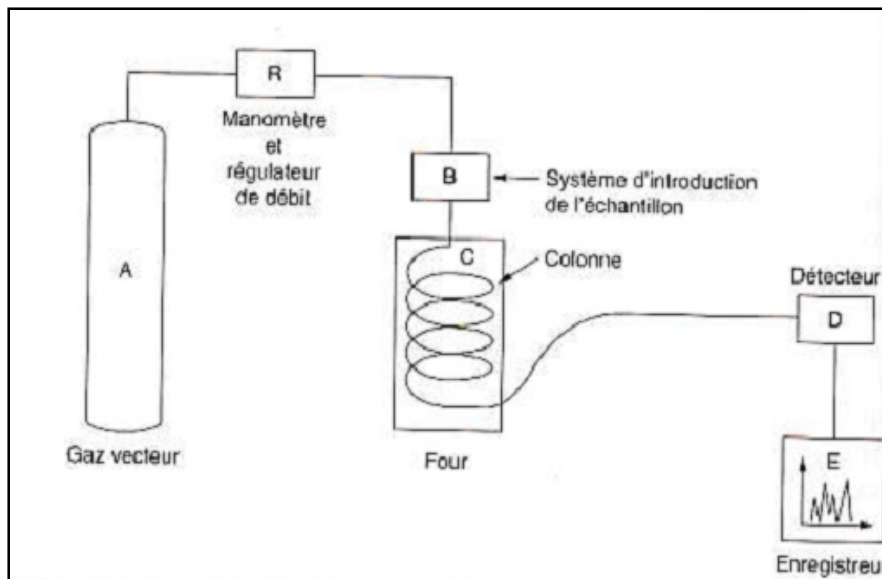


Figure 21 : Configuration d'une chromatographie en phase gazeuse

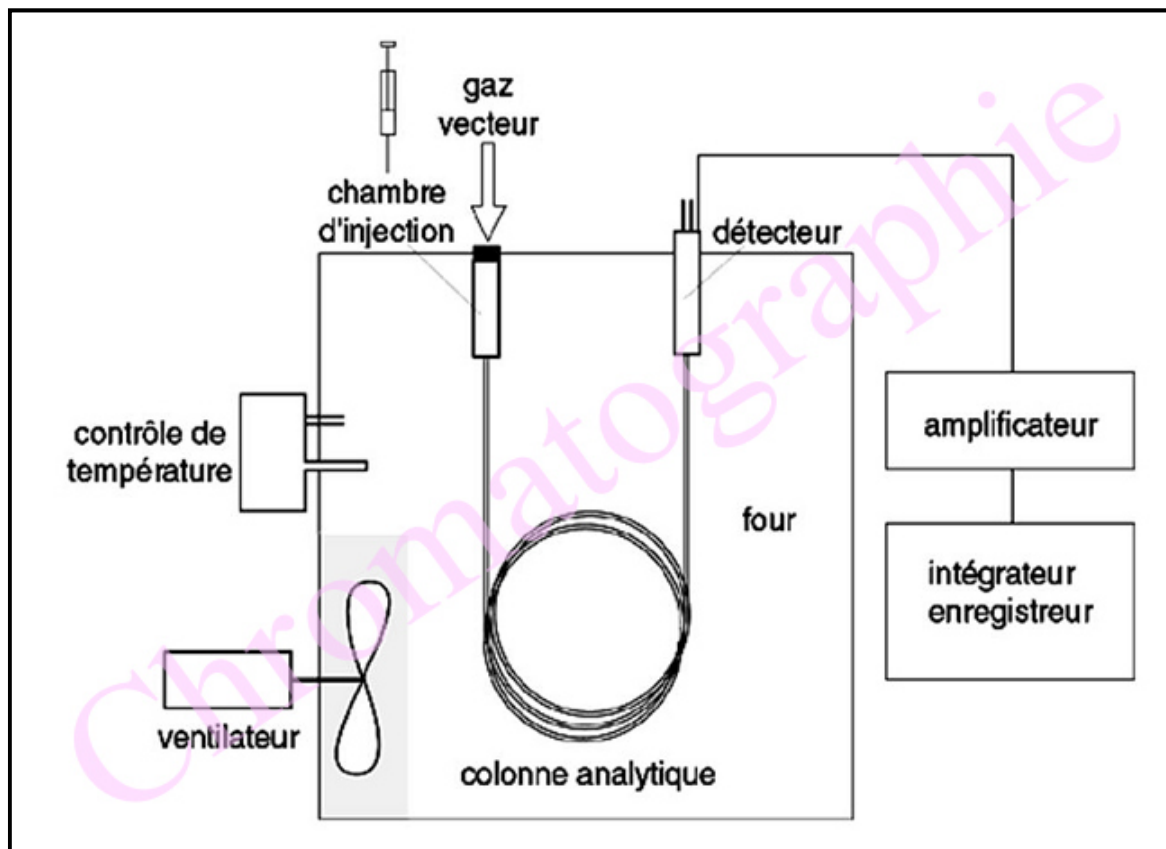


Figure 22 : Configuration d'une chromatographie en phase gazeuse

Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

1. Principe

La chromatographie liquide haute performance est une forme moderne des méthodes chromatographiques. Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution d'abord, puis elle sera introduite dans la phase mobile liquide (éluant). Grâce à la répartition sélective des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire, 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.

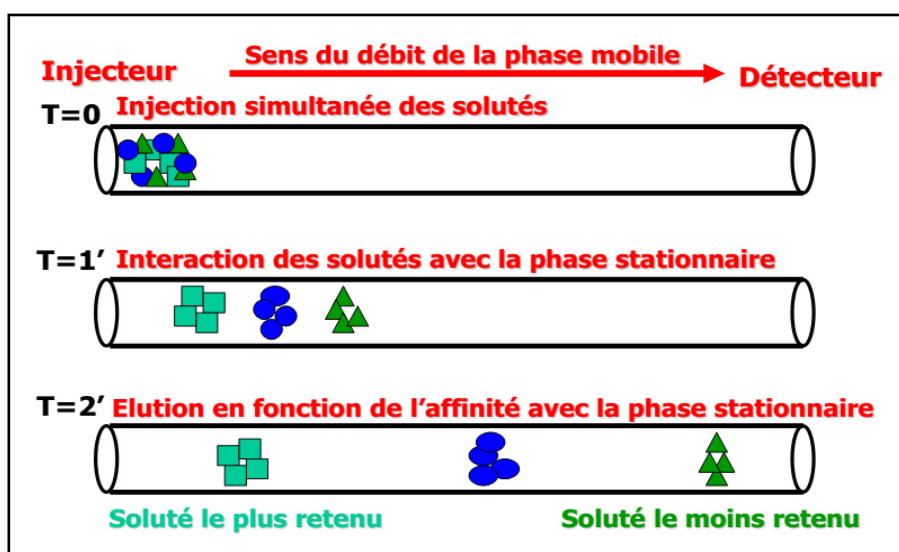


Figure 23 : Principe d'une HPLC

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

Le mécanisme de la séparation chromatographique s'explique par les différences de répartition des molécules des composés d'un mélange entre deux phases non-miscibles : l'une mobile et l'autre stationnaire. Ce principe est traduit par le schéma suivant :

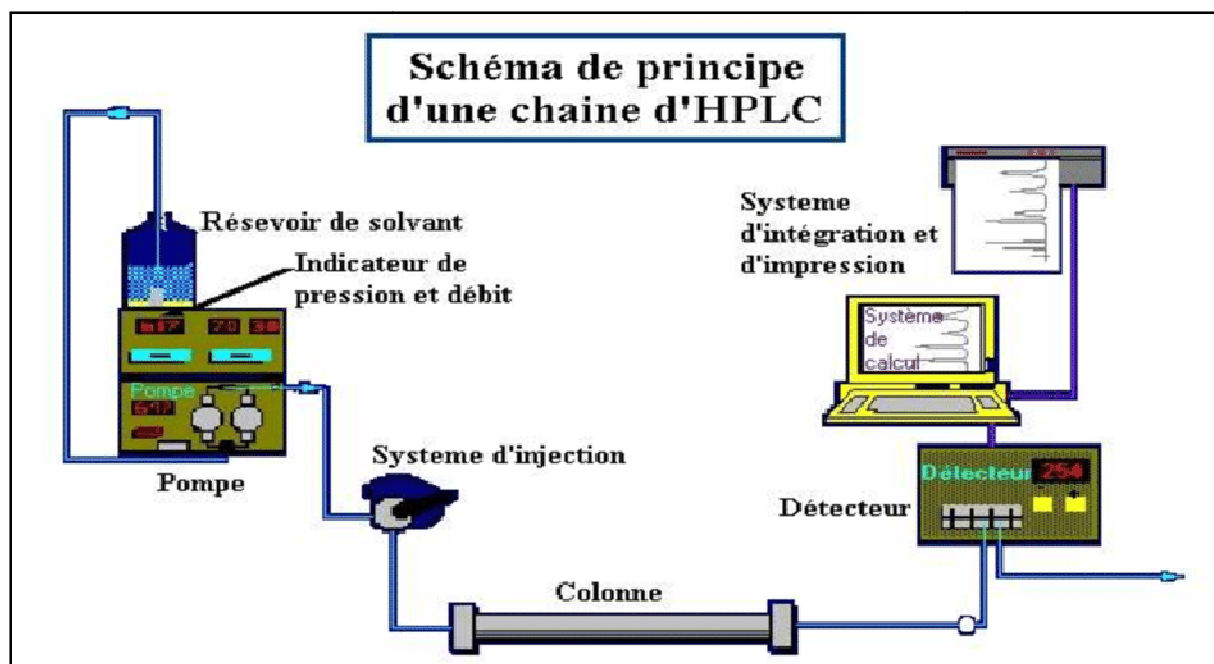


Figure 24 : Principe de fonctionnement d'une chaîne d'HPLC



Figure 25 : Appareil de Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

2. Appareillage

La phase mobile est pompée à partir d'une bouteille et parcourt en permanence le chromatographe : l'injecteur, la colonne dans le four et le détecteur. La température du four est maintenue constante. Le signal du détecteur est amplifié et enregistré.

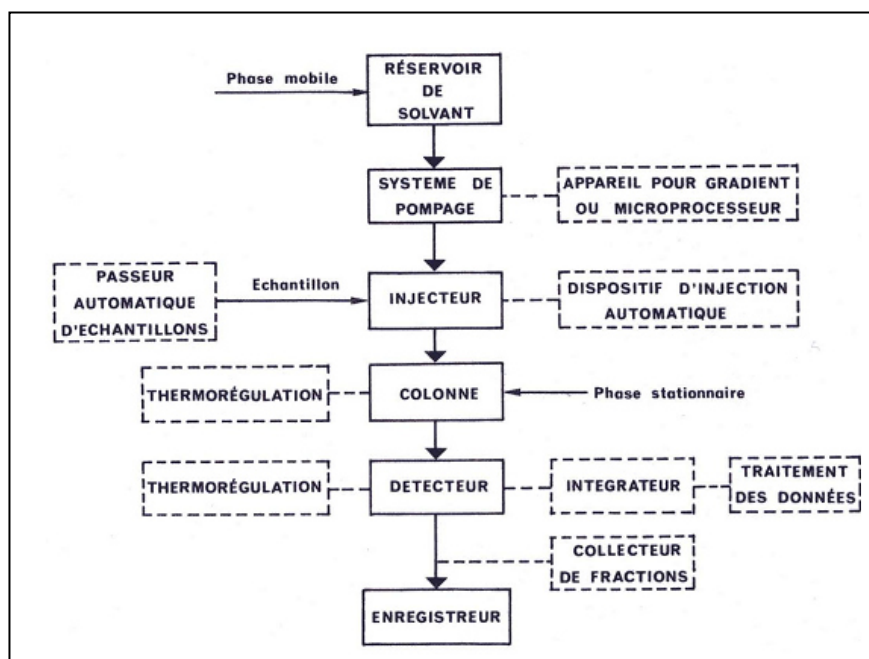


Figure 26 : Représentation schématique d'un appareil de Chromatographie en Phase Liquide

2.1. Réservoir de la phase mobile (solvant)

Le plus souvent ce réservoir est une bouteille en verre dans lequel plonge un tube avec une extrémité filtrante en téflon. S'il est nécessaire le dégazage peut se faire par agitation puis conservation du solvant sous atmosphère d'hélium.

2.2. Pompe

Elle délivre en continu la phase mobile. Elle est définie par la pression qu'elle permet d'atteindre dans la colonne, son débit, et la stabilité du flux. Elle permet de travailler soit :

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

Actuellement les paramètres d'une pompe sont :

- ✓ Débit : les pompes actuelles ont un débit variable de quelques μL à plusieurs mL/min
- ✓ Stabilité $< 1\%$ ($< 0,2\%$ pour des chromatographies d'exclusion diffusion)
- ✓ Pression maximale > 350 bars

Certaines sont pilotées par informatique (bien utile lors de l'utilisation de gradient d'élution).

2.3. Injecteur

Le type d'injecteur le plus couramment utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe (10, 20, 50 μL ...). Cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne. Le remplissage de la boucle d'injection se fait à l'aide d'une seringue.

2.4. Colonne

En mode analytique, les colonnes en inox ont généralement un diamètre interne de 4,6mm. La longueur est de 5, 10, 15, ou 25cm. Le remplissage (en silice, silice greffée ou particules polymériques) à une granulométrie de 3, 5, ou 10 μm . Le diamètre interne d'une colonne est usuellement de 4 ou 4,6 mm. Si des substances pures doivent être collectées en fin de chromatogramme des colonnes de gros diamètre seront nécessaires.

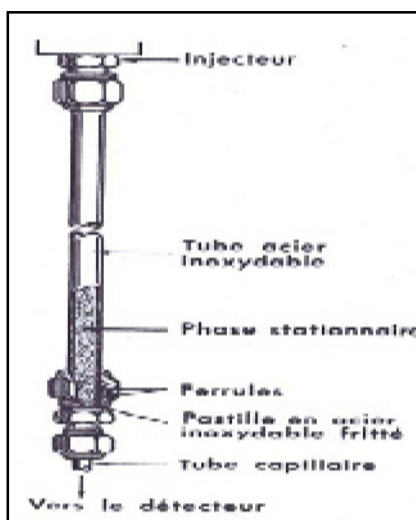


Figure 27 : Exemple d'une colonne d'HPLC

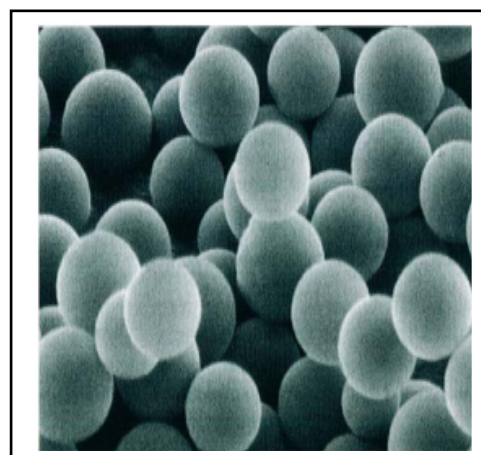


Figure 28 : Particule solides de Silice composant la phase stationnaire d'une colonne d'HPLC

La colonne est l'élément majeur de la chaîne HPLC. Le choix d'une colonne HPLC

est lié aux paramètres suivants :

- ✓ Type de la phase stationnaire
- ✓ Longueur
- ✓ Diamètre des particules (dp)
- ✓ Débit de la phase mobile supportable

On distingue deux types de phases stationnaires :

✓ **La phase stationnaire normale**

La phase normale est constituée de **gel de silice**. Ce matériau est très **polaire**. Il faut donc utiliser **un éluant apolaire**. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête.

✓ **La phase stationnaire inversée**

La phase inverse est majoritairement composée de **silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18)**. Cette phase est **apolaire** et nécessite donc un **éluant polaire** tels que l'acétonitrile, le méthanol et l'eau. Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante.

2.5.Détecteurs

Placé en sortie de colonne, il enregistre un signal optique en fonction du temps. Le détecteur suit en continu l'apparition des solutés. Pour détecter, on utilise différents phénomènes physico-chimiques. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps. Généralement, on compare le signal obtenu pour la phase mobile et le soluté à celui de la phase mobile seule. Le détecteur le plus utilisé en CLHP est un spectrophotomètre d'absorption UV-visible (190-600 nm) relié à la sortie de colonne.

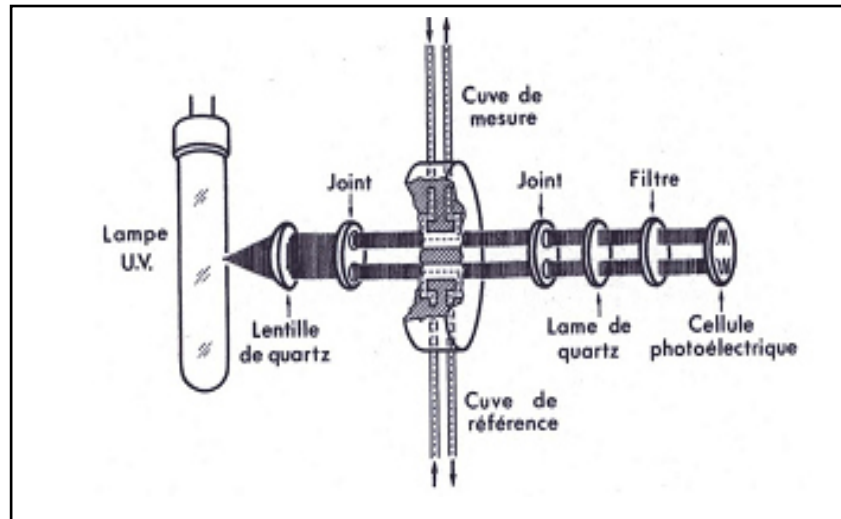


Figure 29 : Présentation d'un détecteur

Il existe d'autres détecteurs :

- ✓ Réfractomètre différentiel
- ✓ UV à barrette de diodes (DAD)
- ✓ Détecteur à fluorescence
- ✓ Détecteur UV-Visible

Ainsi que différents types de couplage :

- ✓ Spectrométrie infrarouge
- ✓ Spectrométrie de masse
- ✓ Résonance Magnétique Nucléaire...

2.6. Intégrateur

La chromatographie est une méthode de séparation utilisée en vue d'un dosage. Il faut donc avant tout chercher à séparer correctement les pics avant de les intégrer. Une intégration consiste à mesurer la surface sous un pic.

La détection d'un pic chromatographique par l'intégrateur, dépend de 2 paramètres :

- * la largeur attendue des pics
- * le seuil d'intégration (sensibilité)

La largeur de pic est à peu près prévisible en fonctions de la technique d'analyse et des conditions opératoires. Elle détermine la fréquence d'échantillonnage du signal. Le pic est alors découpé en tranches. Le seuil d'intégration est la valeur du signal à partir de laquelle le calculateur repère un début de pic.

Partie II :
Techniques
spectrométriques

Spectrométrie d'absorption moléculaire UV-VIS

La spectrométrie UV-Visible est une méthode physique non destructive, basée sur l'interaction matière/rayonnement. Un **rayonnement électromagnétique** est caractérisé par sa **longueur d'onde** (λ en nm) dont les différents domaines sont présentés ci-dessous :

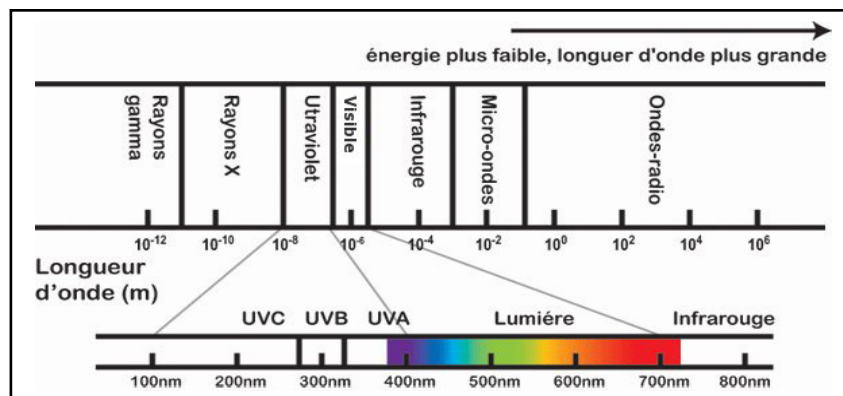


Figure 30 : Spectre électromagnétique

Cette technique nécessite l'utilisation d'un **spectrophotomètre** et permet de **caractériser des molécules**, de déterminer des **concentrations** d'espèces chimiques en solution et par extension de réaliser des **suivis cinétiques**.

1. Principe de la technique

Lorsqu'une solution est traversée par un rayonnement polychromatique, elle peut atténuer l'intensité des radiations à certaines longueurs d'onde : on dit qu'elle absorbe ces radiations. Cette absorption est due à des transitions électroniques entre les orbitales micromoléculaires de la (ou des) molécule(s) présente(s) en solution.

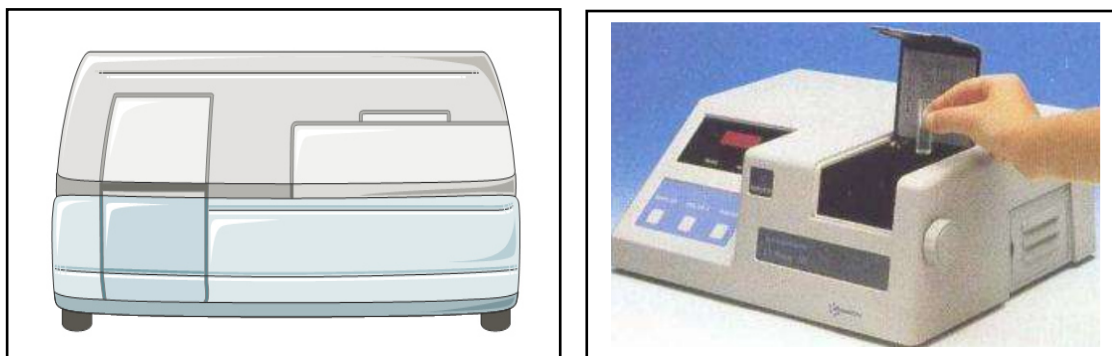


Figure 31 : Spectrophotomètre UV-VIS

2. Spectrophotomètre mono-faisceau

L'absorbance peut être mesurée par un **spectrophotomètre** dont le schéma de principe est représenté ci-dessous. A partir d'une source de **lumière polychromatique**, un **système dispersif** (prisme, réseau) et un diaphragme permettant de sélectionner la longueur d'onde souhaitée. Après absorption d'une partie des radiations par la solution, un **photodétecteur** recueille l'intensité transmise. L'afficheur du spectrophotomètre donne directement l'absorbance de la solution.

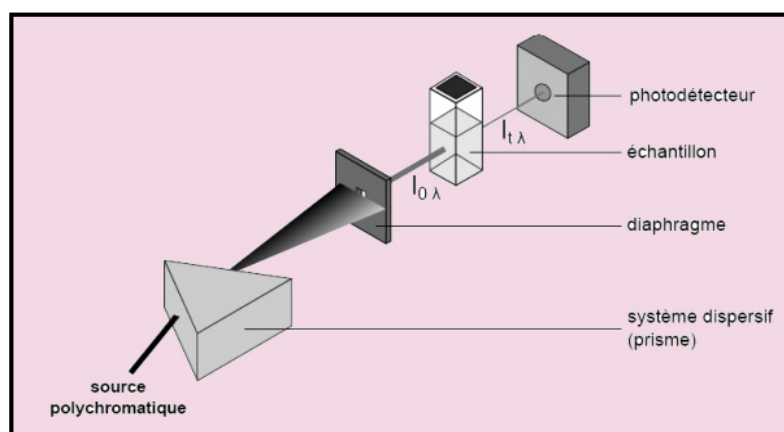


Figure 32 : Principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre mono-faisceau

3. Loi de Beer-Lambert

Considérons une solution contenant une espèce chimique de concentration c absorbant à la longueur d'onde λ . La loi de Beer-Lambert donne une relation entre l'absorbance A_λ et la concentration c de l'espèce chimique en solution : $A_\lambda = \epsilon l c$

Avec :

- ✓ l la longueur de la solution traversée par le faisceau (exprimée en cm). Généralement on utilise des cuves de 1cm.
- ✓ c la concentration de l'espèce considérée en solution (exprimée en mol.L⁻¹).
- ✓ ϵ_λ le coefficient d'absorption molaire (exprimé usuellement en L.mol⁻¹.cm⁻¹). C'est une grandeur qui dépend de **l'espèce chimique considérée**, de **la longueur d'onde d'analyse**, du **solvant** et de **la température**. La loi de Beer-Lambert est une loi additive. Si plusieurs espèces chimiques i de concentrations c_i possédant des coefficients d'absorption molaire $\epsilon_{i\lambda}$, absorbent à une longueur d'onde λ , l'absorbance totale de la solution s'écrit :

$$A_{\lambda} = \sum_i \epsilon_{i\lambda} l c_i$$

4. Limitations de la loi de Beer-Lambert

La loi de Beer-Lambert n'est valable que pour des solutions diluées.

Deux problèmes peuvent se poser à des concentrations élevées :

- ✓ Les molécules en solution forment des agrégats qui n'absorbent pas de la même de la même façon que la molécule isolée. En particulier, des phénomènes de diffusion peuvent apparaître selon la taille des agrégats.
- ✓ La sensibilité des détecteurs étant limitée, pour des solutions concentrées, le photodétecteur ne reçoit pas assez de lumière pour donner une valeur fiable de l'absorbance.

5. Application de la spectrophotométrie

La spectrophotométrie permet :

- ✓ De caractériser les molécules, généralement par les longueurs d'onde de leur maxima d'absorption et par les valeurs des coefficients d'absorption molaire associés
- ✓ De déterminer des concentrations d'espèces chimiques en solution, grâce à des dosages par étalonnage appelés parfois dosages colorimétriques. Dans ce cas, il convient toujours de vérifier que la loi de Beer-Lambert est valide dans la gamme d'absorbance étudiée.
- ✓ De faire des suivis cinétiques, à longueur d'onde fixée.

6. Mise en œuvre pratique

La mesure de l'absorbance d'une solution grâce à un spectrophotomètre mono-faisceau nécessite de suivre les étapes suivantes :

- ✓ Régler l'appareil à la longueur d'onde choisie ;
- ✓ Remplir à l'aide d'une pipette Pasteur, une cuve avec **le blanc** qui contient **le solvant et toutes les espèces présentent en solution excepté le composé d'intérêt** ;
- ✓ Placer la cuve dans le logement prévu à cet effet. Le faisceau doit traverser les faces transparentes de la cuve. Fermer le capot ;

- ✓ Régler l'appareil de sorte que l'absorbance indiquée soit égale à zéro. **On s'affranchit de l'absorbance du solvant et de toutes les espèces chimiques présentes dans le blanc ainsi que de la réflexion due à la cuve ;**
- ✓ Sortir la cuve, la vider et la **rincer avec la solution à analyser ;**
- ✓ Répéter les opérations 2 et 3 avec la solution à analyser ;
- ✓ Lire l'absorbance de la solution à analyser à la longueur d'onde choisie ;
- ✓ Vider et nettoyer la cuve.

7. Précautions à prendre lors du remplissage des cuves

- ✓ La cuve ne doit pas contenir des bulles d'air ;
- ✓ La solution doit être limpide, sans particule ou suspension, pour minimiser les phénomènes de diffusion et de diffraction ;
- ✓ Les parois de la cuve doivent être propres (en particulier exemptes de traces de doigts sur les faces optiques) et non rayées. Pour les nettoyer, il faut les essuyer délicatement avec un papier doux.

Photométrie à flamme

1. Définition

Le photomètre à flamme a été utilisé depuis longtemps pour l'analyse des éléments alcalins et alcalino-terreux. L'émission d'un rayonnement électromagnétique due à la désexcitation d'atomes ou de molécules qui ont été excités par un apport suffisant d'énergie est un phénomène physique bien connu (si on projette du sel de cuisine dans une flamme au gaz de ville, une émission jaune caractéristique due au sodium apparaît). La photométrie d'émission atomique mesure l'émission d'un rayonnement électromagnétique UV ou visible due à la désexcitation d'atomes qui ont été excités par l'énergie apportée par une flamme. Les flammes utilisées en pratique permettent l'émission par les atomes des séries des alcalins, de quelques alcalino-terreux et de quelques autres métaux (Na, K, Li, Ba ...). La mesure quantitative de l'émission permet des dosages.



Figure 33: Photométrie à flamme

2. Principe

Lorsqu'une solution saline est chauffée dans une flamme à un débit constant, l'eau s'évapore et les sels minéraux restent à l'état d'atomes.

Les atomes sont alors portés à une haute température et captent donc une partie de l'énergie apportée par la flamme.

Ceci les fait passer à un état excité, un atome excité revient obligatoirement à son état basale en libérant de l'énergie sous forme d'une émission de lumière dont chaque ion ou atome est caractérisé par une longueur d'onde spécifique, exemple : Na (jaune), Li (violet).

L'intensité de la lumière est proportionnelle à la concentration de l'ion à doser.

A chaque élément à analyser correspond un filtre qui sélectionnera la bande de longueur d'onde utile. Il suffit alors d'établir une courbe d'étalonnage, pour déterminer la concentration d'une solution inconnue. Pour le dosage simultané de plusieurs éléments on doit disposer de plusieurs filtres et plusieurs détecteurs en même temps.

3. Appareillage

Un photomètre à flamme est composé de :

- 3.1. Un système d'aspiration des liquides biologiques dilués et des produits d'étalonnage
- 3.2. **Nébuliseur** ; une chambre qui assure la nébulisation de la solution à analyser et son mélange avec le gaz et l'air (chambre qui permet de créer un brouillard avec la solution à analyser)
- 3.3. **Bruleur** ; les gaz employés pour l'alimentation de la flamme peuvent être de l'acétylène, du butane ou de propane en fonction de la température de la flamme souhaitée
- 3.4. **Filtres** interférentiels permettant de sélectionner la longueur d'onde d'émission caractéristique de chaque élément,
- 3.5. **Détecteur** : cellule photoélectrique

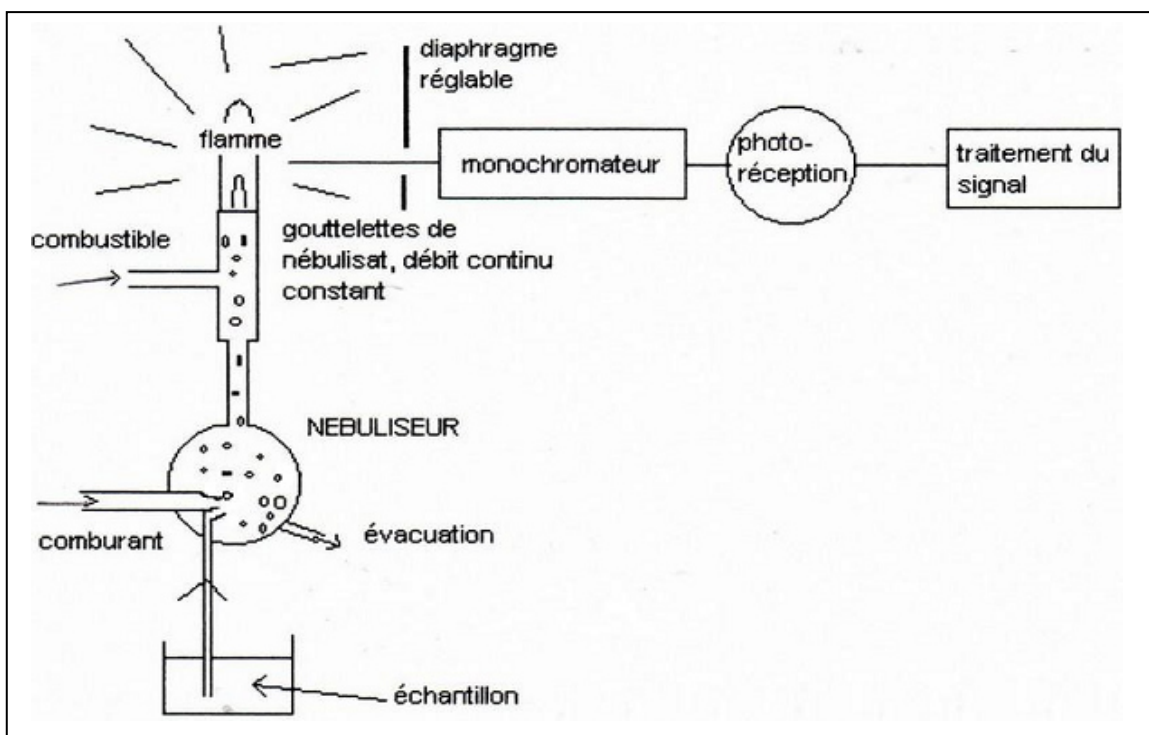


Figure 34 : Schéma d'un photomètre de flamme

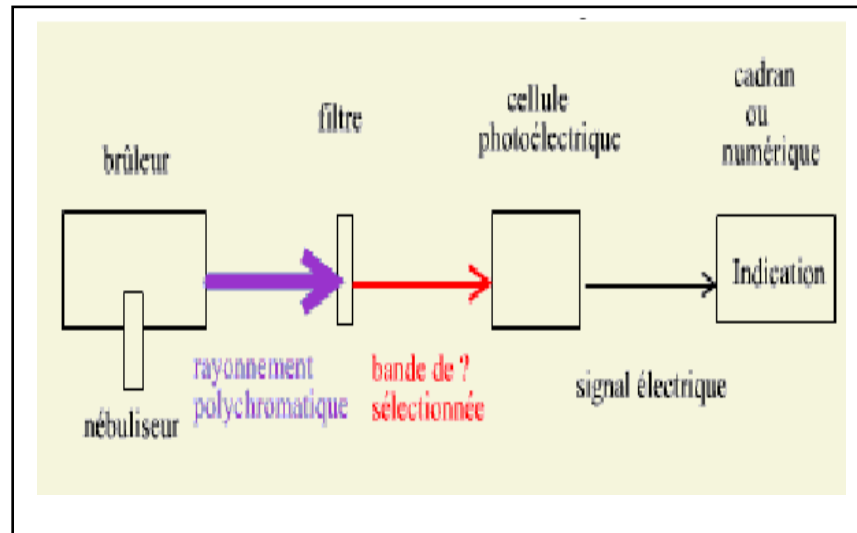


Figure 35 : Schéma d'un Photométrie à flamme

Le schéma présente la structure d'un photomètre de flamme. La partie nébuliseur a été détaillée. La nébulisation utilise généralement l'effet Venturi : le comburant en provenance d'un réservoir de gaz sous pression traverse un conduit qui se termine par un orifice étroit qui entraîne une vitesse de sortie élevée et une dépression alentour. C'est là qu'est placée l'extrémité d'un tube plongeant dans l'échantillon à analyser. L'échantillon est aspiré à débit continu constant. Les grosses gouttelettes qui perturberaient la flamme sont éliminées lors de la traversée d'un bol où elles se déposent sur les parois. Le nébuliseur doit absolument fournir un débit constant d'échantillon dans la flamme. Il existe des systèmes de nébulisation à ultrasons.

4. Préparation des échantillons

- ✓ Les échantillons doivent être sous forme d'une solution aqueuse sans débris ou particules solides ;
- ✓ L'eau distillée qui est le solvant de l'échantillon doit être d'une très bonne qualité afin d'avoir des résultats précis ;
- ✓ Les espèces chimiques qui peuvent causer des interférences doivent être éliminées ou bien présentes dans l'étalon et l'échantillon à une même concentration. Exemple : élimination des ions calcium par précipitation à l'acide oxalique ;
- ✓ Les sels peuvent être extraits des échantillons solides par de l'eau distillée ou par des réactifs appropriés. Exemple : CaSO_4 saturé pour l'extraction du sodium du sol ;

- ✓ L'usage d'un broyeur ou d'un agitateur donne de meilleurs résultats ;
- ✓ Si l'échantillon est de nature organique, la matière organique doit être éliminée par incinération (four à moufle) ;
- ✓ Les oxydes restants sous forme de cendre sont solubilisés ensuite par des acides forts.

5. Application

Dosages d'éléments alcalins ou alcalino-terreux Na, K, Ca, Li, Fe, Ba ...(qui sont en fait sous forme ionisée Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Li^{2+} , Fr^{2+} avec Ba^{2+} ... dans la plupart des échantillons :

- ✓ Liquides biologiques comme le plasma sanguin ;
- ✓ Produits pharmaceutiques ;
- ✓ Produits alimentaires, boissons ;
- ✓ Rejets industriels, eaux usées ;
- ✓ Produits minéraux utilisés en métallurgie.

Spectrophotométrie d'absorption atomique à flamme et au four graphique

La spectroscopie est un vaste domaine regroupant plusieurs sous-disciplines qui peuvent être classées selon le type de la matrice analysée (spectroscopie atomique, spectroscopie moléculaire, résonance magnétique...). La spectroscopie atomique comprend plusieurs techniques analytiques utilisées pour déterminer la composition élémentaire d'un échantillon en examinant son spectre électromagnétique (spectroscopie d'absorption atomique flamme, spectroscopie d'absorption atomique four graphite.....) ou son spectre de masse.

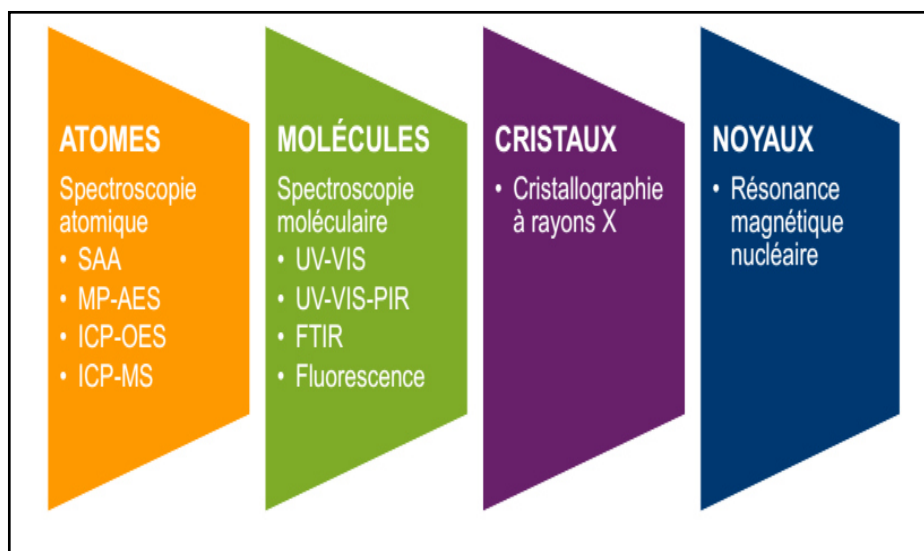


Figure 36 : Schéma représentatif de principales disciplines de la spectroscopie



Figure 37 : Spectrophotomètre d'absorption atomique

1. Qu'est-ce qui est mesuré ??

1. L'absorption de l'énergie cause le déplacement d'un électron à un niveau d'énergie supérieure (E2) (Absorption atomique)
2. L'électron excité reviendra à l'état fondamental et émettra de la lumière à une longueur d'onde particulière (émission)
3. S'il y a assez d'énergie, l'électron quittera l'atome et laissera un ion chargé positivement (ionisation)

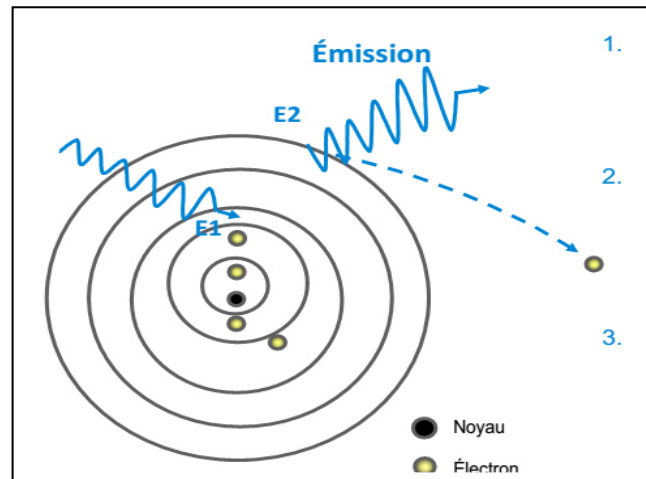


Figure 38 : Absorption, émission et ionisation d'électrons

2. Principe et appareillage

Les techniques de spectroscopie d'absorption atomique (AAS) reposent sur le fait qu'un élément atomisé absorbera la lumière d'une longueur d'onde caractéristique, le faisant quitter l'état fondamental vers un état excité. La quantité d'énergie lumineuse absorbée est proportionnelle au nombre d'atomes analytes dans le trajet optique.

La technique est étalonnée en introduisant des concentrations connues d'atomes analytes dans le trajet optique et en faisant un graphique d'absorption par rapport à la concentration.

La spectroscopie d'absorption atomique est composée de l'installation suivante :

- ✓ La lampe émet de la lumière pour l'élément d'intérêt
- ✓ L'atomiseur convertit l'échantillon liquide en atomes libres qui absorbent l'énergie de la lampe
- ✓ Le monochromateur sélectionne la longueur d'onde utilisée pour la mesure
- ✓ Le détecteur mesure la lumière absorbée par les atomes libres



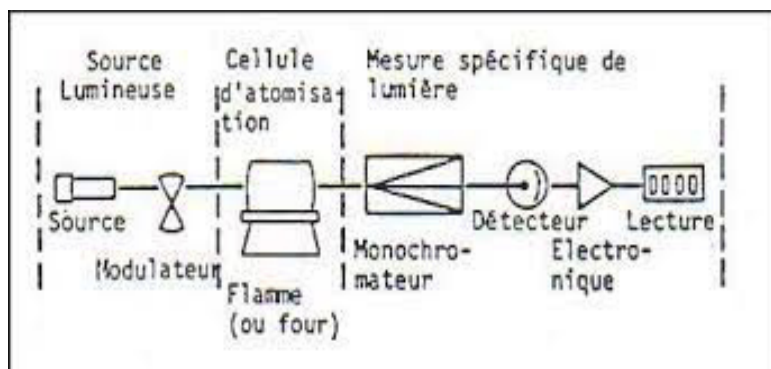


Figure 39 : Principaux éléments d'une spectroscopie d'absorption atomique

2.1. Lampe

La source de lumière utilisée avec la technique d'absorption atomique est la lampe à cathode creuse (HCL). Généralement, chaque lampe est dédiée à l'analyse d'un seul élément, bien que dans certains cas, certains éléments peuvent être combinés dans une seule lampe.

À cause de cette limitation, l'absorption atomique est généralement utilisée pour l'analyse soit d'un seul élément soit d'un faible nombre d'éléments.

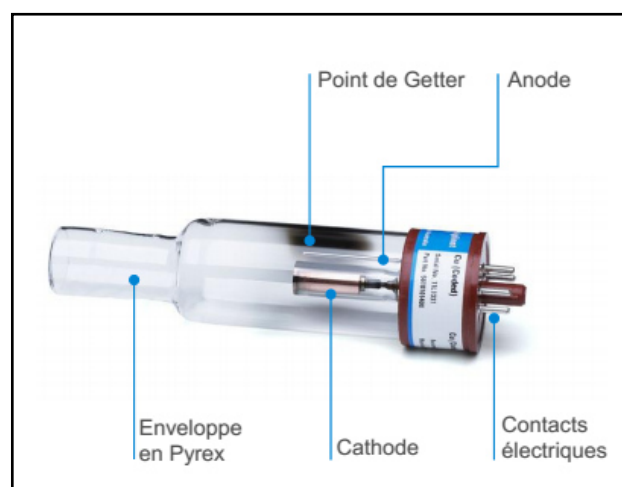


Figure 40 : Composition générale d'une lampe à cathode creuse

2.2. Atomiseur

L'atomisation est le processus qui convertit un échantillon liquide en atomes libres.

Le schéma montre les différentes étapes qui ont lieu durant l'atomisation, en commençant par la préparation en solution de l'élément ; solution, nébulisation, Désolvatation, vaporisation, atomisation, excitation, ionisation.

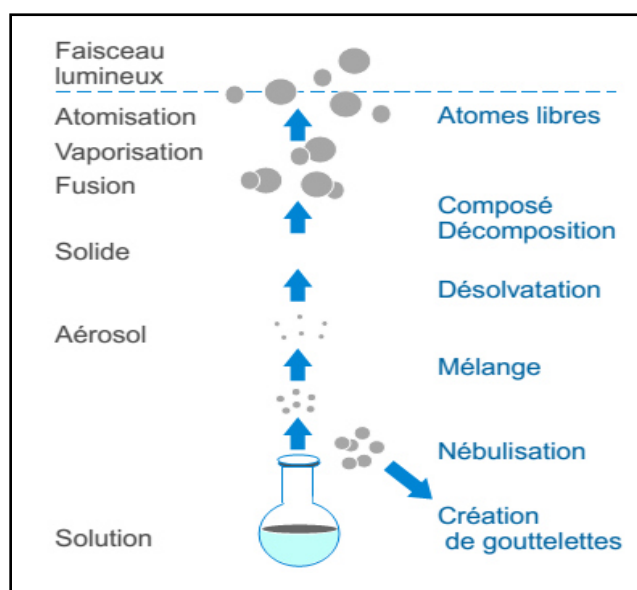


Figure 41 : Etapes d'atomisation

2.2.1. Atomiseur flamme

Dans l'atomiseur flamme, l'échantillon est préparé sous forme de liquide et nébulisé dans la flamme. La caractéristique fondamentale de cette technique est l'atomisation qui survient dans la flamme.

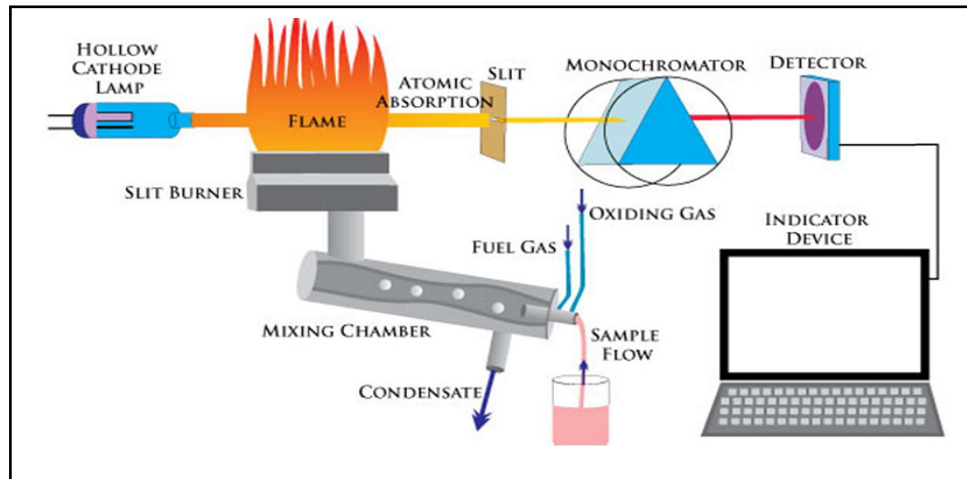


Figure 42 : Schéma d'un spectrophotomètre d'absorption atomique de flamme

2.2.2. Atomiseur four graphite

La mise en solution de l'échantillon est nécessaire dans la plupart des cas. L'échantillon est injecté dans un tube en graphite et chauffé électrothermiquement à différentes étapes pour atomiser l'analyte.

En absorption atomique four graphite, l'atomisation a lieu en trois étapes :

- ✓ Séchage
- ✓ Décomposition
- ✓ Atomisation

Le fonctionnement du four graphite est une technique complémentaire à l'absorption atomique flamme conventionnelle et ajoute des avantages à l'analyse. Le tube en graphite est positionné dans la tête de four qui fournit un gaz inerte et une puissante tension pour chauffer le tube, qui désolvate puis atomise l'échantillon.

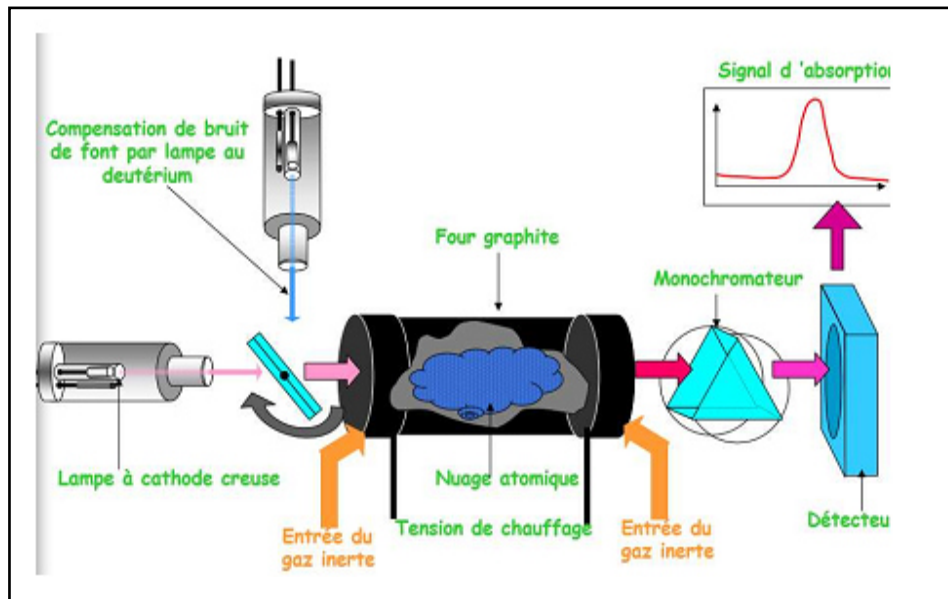


Figure 43 : Schéma d'un spectrophotomètre d'absorption atomique
avec four en graphite

2.3.Monochromateur

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

2.4.Détecteur

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

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

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

3. Principales applications

La SAA permet l'analyse de presque tous les métaux et métalloïdes (Cu, Zn, Pb, Cr, Fe, Cd, etc....) dans les échantillons biologiques, métallurgiques, archéologiques, pharmaceutiques et atmosphériques. Elle couvre donc un vaste éventail d'applications. Dans le domaine pharmaceutique on peut citer ;

- ✓ Dosage du zinc dans les préparations d'insuline ou d'oxyde de zinc.
- ✓ Dosage du cobalt dans la Vit B12.
- ✓ Dosage du mercure dans les antiseptiques organo-mercuriels.
- ✓ Dosage de l'Al et de Mg dans les pansements gastriques.
- ✓ Dosage de Mg dans les suppléments nutritionnels.
- ✓ Dosage du Ca dans les préparations à base de Ca.
- ✓ La recherche de Cd, Zn dans les préparations injectables {adjuvants plastiques}.
- ✓ Recherche d'impuretés.
- ✓ Analyse des boissons.
- ✓ Dosage des oligoéléments et des résidus toxiques dans les aliments.
- ✓ Analyse des eaux potables.
- ✓ Analyse des tissus végétaux et animaux, des liquides biologiques.
- ✓ Dosage du Ca, Sr, Zn dans les os.

Spectrométrie de masse

1. Définition

La spectrométrie de masse est une technique physique d'**analyse** permettant de détecter et d'identifier des **molécules** d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur **structure chimique**. Son principe réside dans la séparation en **phase gazeuse** de molécules chargées (ions) en fonction de leur **rapport masse/charge (m/z)**.

Elle est utilisée dans pratiquement tous les domaines scientifiques : physique, astrophysique, chimie en phase gazeuse, chimie organique, dosages, biologie, médecine... le temps de détection est très rapide. La spectrométrie de masse est d'abord une méthode d'analyse spectrale capable de fournir la masse moléculaire et des renseignements structuraux sur les molécules.

Une spectrométrie de masse peut donc apporter les informations suivantes :

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

2. Principe et appareillage

La spectrométrie de masse consiste à :

- ✓ Ioniser et fragmenter une molécule neutre en ions au niveau de la **source d'ionisation**
- ✓ Accélérer puis séparer les ions formés au niveau d'**analyseur** en fonction de leur rapport m/z (masse/charge)
- ✓ Analyser et compter ces ions en fonction de leur rapport masse/charge au niveau du **détecteur**
- ✓ Traiter les informations des spectres de masse ; le détecteur est couplé à un système informatique, qui assure le traitement des données et l'élaboration des spectres de masse

La performance (résolution, limite en masse, sensibilité) de l'appareil dépendent : du mode d'ionisation, de la nature de l'analyseur, du détecteur.

La spectrométrie de masse se caractérise par la grande diversité des appareils disponibles sur le marché ou développés au sein des laboratoires de recherche. Cette diversité se retrouve au niveau :

- ✓ **Des sources d'ionisation** : électronébulisation (ESI, ElectroSpray Ionisation), ionisation par impact électronique (EI, Electron Ionization), ionisation chimique (CI, Chemical Ionization), photoionisation à pression atmosphérique (APPI, Atmospheric-Pressure PhotoIonisation) et désorption et ionisation par laser assistées par matrice (MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation)...
- ✓ **Des analyseurs** : quadripôles (Q), trappes ioniques (IT), temps de vols (TOF), analyseurs à résonance d'ions en cyclotron à transformée de Fourier (FT-ICR), analyseurs magnétiques, orbitrap ...
- ✓ **Des configurations hybrides d'analyseurs** : Q-TOF, IT-TOF, IT-orbitrap, triple quadripôle ...
- ✓ **Du couplage avec la spectrométrie de mobilité ionique (IMS).**

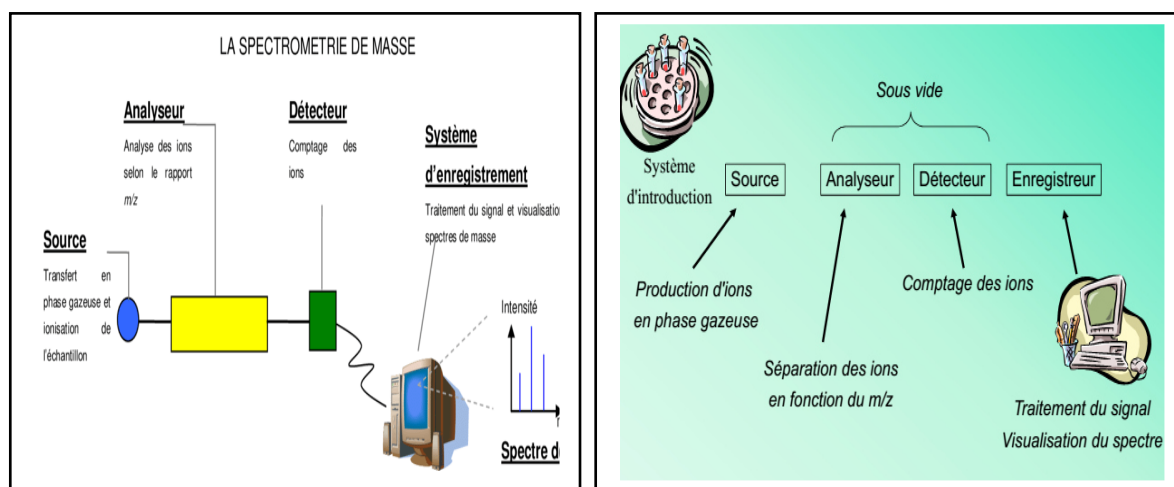


Figure 44 : Principe de Spectrométrie de masse

2.1. Système d'introduction de l'échantillon

L'échantillon peut être introduit directement dans la source, sous forme liquide (infusion directe), ou solide ou par l'association à une méthode séparative (chromatographie en phase liquide, chromatographie en phase gazeuse, électrophorèse capillaire...)

2.2. La source d'ionisation

C'est une chambre qui permet de produire des ions en phase gazeuse. Son rôle est de vaporiser les molécules et les ioniser. Elle peut être utilisée soit en mode positif (étude des ions positifs), soit en mode négatif (étude des ions négatifs). Il existe de nombreux types de sources d'ions, nous ne citerons que quelques sources d'ionisations.

- ✓ **Ionisation électronique (EI) et Ionisation chimique (CI)** ; les ionisations EI et CI, nécessitent un certain niveau de vide, sont préférentiellement utilisées en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse.
- ✓ **Bombardement par atomes rapides (FAB)** ; permet d'analyser des molécules non vaporisables sous vide (grosses molécules biologiques). Les molécules ainsi ionisées n'ont pas beaucoup d'énergie interne, la fragmentation est donc faible mais l'ion moléculaire est facilement reconnaissable et la masse moléculaire est facile à déterminer
- ✓ **Electrospray ionisation ESI ou L'électronébulisation** ; il s'agit d'une technique qui permet d'ioniser les molécules d'échantillons dissoutes dans un solvant sous l'influence d'un champ électrique. Elle a lieu dans une source à la pression atmosphérique, le solvant est donc transformé en fines gouttelettes (spray) chargées suivant le mode d'ionisation. Durant ce parcours à pression élevée, les ions subissent de multiples collisions avec les molécules de gaz et de solvant. En faisant varier les potentiels électriques appliqués dans la source il est possible de provoquer des fragmentations plus ou moins importantes.

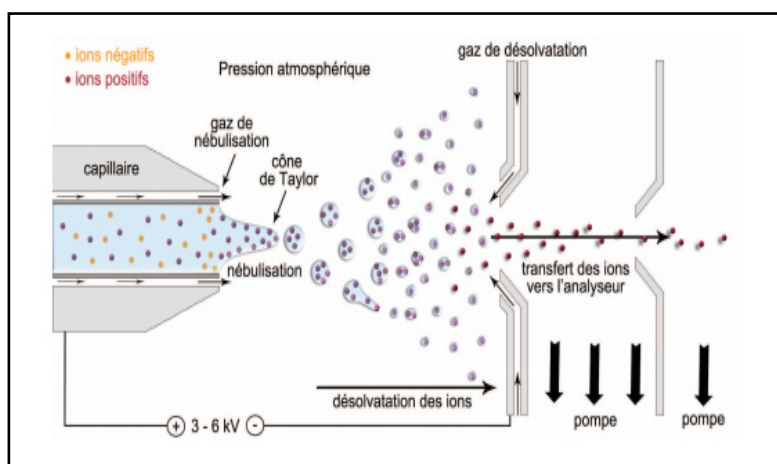


Figure 45 : Principe de l'électrospray

Les sources utilisées pour l'analyse de biomolécules sont souvent : l'ESI (Ionisation par ElectroSpray) et le MALDI (Ionisation Désorption Laser Assisté par Matrice).

2.3.L'analyseur

L'analyseur sépare les ions produits par la source en fonction de leur rapport m/z . Il comporte un système comprenant un secteur magnétique couplé à un secteur électrique qui permet de terminer le **temps de vol (TOF)**, de chaque ion. Ces analyseurs peuvent être couplés entre eux pour réaliser des expériences de spectrométrie de masse **en tandem (MS/MS)**. En général, un premier analyseur **sépare les ions**, une cellule de collision permet de fragmenter les ions, et un second analyseur **sépare les ions fragments**.

Il existe différents types d'analyseurs. Ils sont tous basés sur des principes physiques différents, mais tous les analyseurs mesurent des valeurs m/z . C'est une partie de l'appareil sous vide ($10^{-5} - 10^{-7}$ Torr). Les ions formés dans la source sont dirigés (extraction et focalisation) vers l'analyseur par des champs électrostatiques qui peuvent être de quelques volts (Q, IT, FT-ICR) ou de plusieurs dizaines de kilovolts (TOF, B).

BE: Déflexion par un champ magnétique (c'est l'analyseur le plus ancien)

Q: Déflexion par un champ quadrupolaire

IT: Confinement dans un piège à ion (Ion Trap)

TOF: Mesure d'un temps de vol (Time Of Flight)

FT-ICR: Résonance Cyclotronique d'Ions à Transformée de Fourier

2.4.Le détecteur et système de traitement

Le détecteur transforme les ions en **signal électrique**. Plus les ions sont nombreux, plus le courant est important. De plus, le détecteur amplifie le signal obtenu pour qu'il puisse être traité informatiquement.

La représentation sous forme graphique de l'abondance des ions sur la base de leur rapport **masse/charge** constitue le spectre de masse. Celui-ci traduit la fragmentation. Le spectre classique dit de fragmentation est sous forme de traits verticaux dont le plus intense est appelé pic de base auquel on donne une valeur de 100. Toutes les autres intensités étant calculées à partir de cet indice 100.

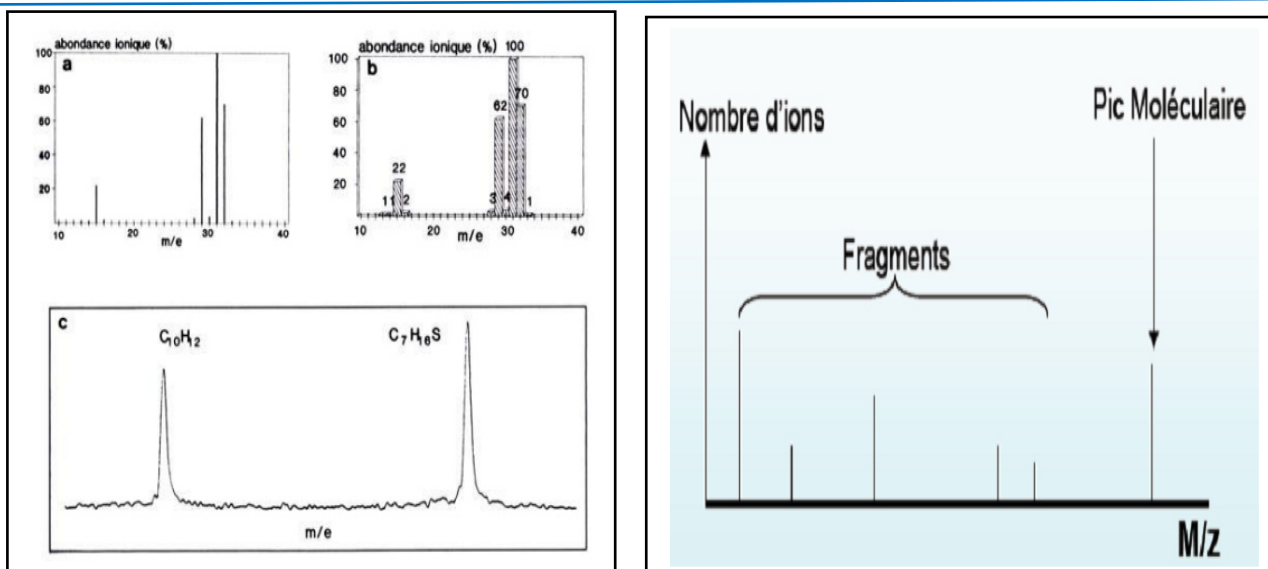


Figure 46 : Exemple de spectre d'ionisation

3. Utilisation

Un spectromètre de masse permet de réaliser les fonctions suivantes :

- 3.1. **Identification des molécules** : un spectre de masse peut être caractéristique d'une molécule. Ainsi en le comparant avec le contenu de banques de spectres, il est possible d'identifier la molécule. La spectrométrie de masse permet de mesurer avec précision la masse mono-isotopique d'un ion et d'en déduire sa formule brute.
- 3.2. **Analyse structurale** : Les ions moléculaires peuvent se fragmenter dans un spectromètre de masse : dans la source d'ionisation, dans l'analyseur ou dans une cellule de collision. Comme les fragmentations respectent des lois précises, l'étude de ces fragments permet de déterminer la structure des molécules ionisées.
- 3.3. **Quantification** : Un spectromètre de masse possède un détecteur très sensible permettant de faire une quantification fiable des molécules ionisées. (Densité optique ou Intensité relative).

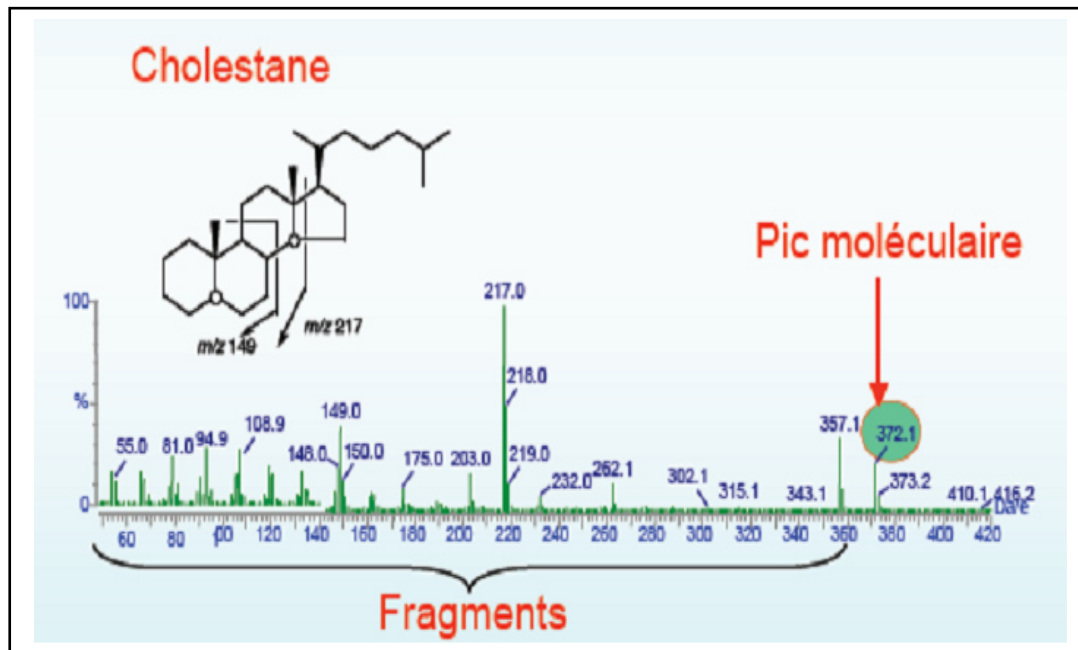


Figure 47 : Exemple d'un spectre en ionisation par impact électronique
du cholestane

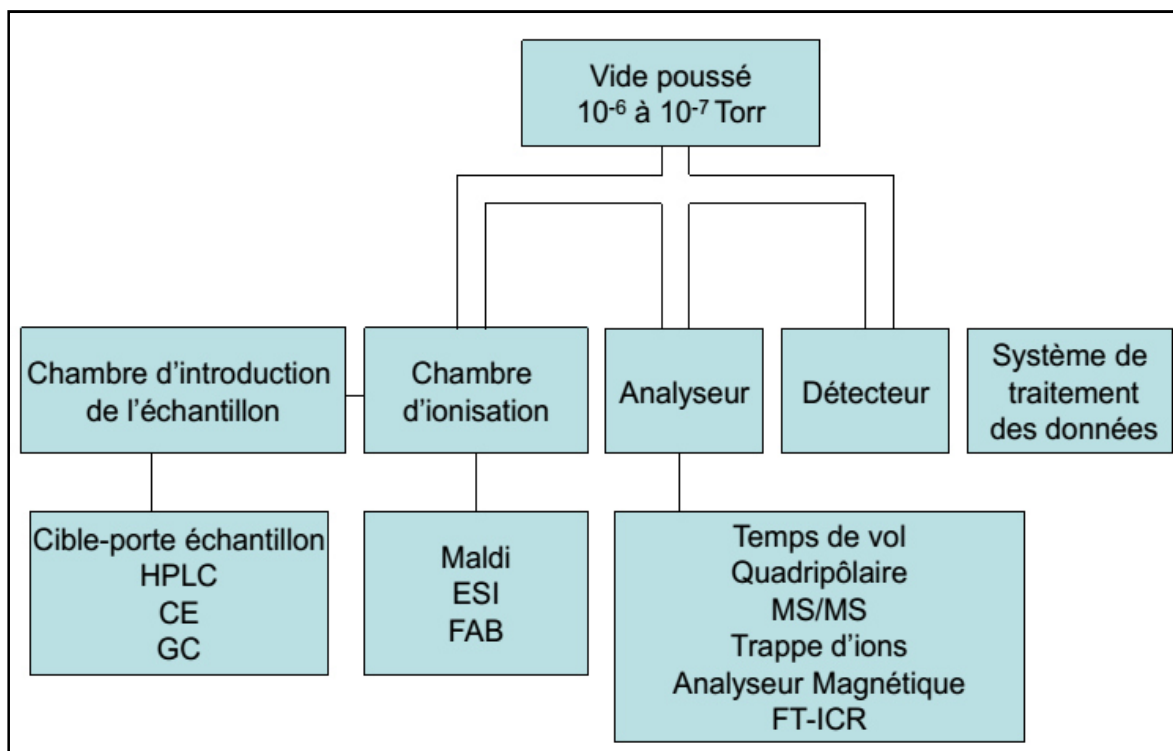


Figure 48 : Schéma d'un spectromètre de masse

*Références
bibliographiques*

- Bernard A.S., Clède S., Emond M., Monin-Soyer H.& Quérard J. (2012). Techniques expérimentales en chimie : réussir les TP aux concours. Edition Dunod. Paris.
- Buess-Herman C., Dauchot-Weymeers J.& Dumont F. (1997). Chimie analytique. Edition De Boeck Université. Bruxelles.
- Burgot G.& Burgot J.L. (2006). Méthodes chromatographiques, électrophoreses et méthodes spectrales. 2^{ème} édition. Edition Lavoisier. Paris.
- Kabouche Z. (2007). Cours et exercices de chromatographie. Edition Dar El-Fadjr. Constantine.
- Rouessac A. & Rouessac F. (2021). L'essentiel de techniques instrumentales d'analyse chimique. Edition Dunod. Paris.
- Rouessac F., Rouessac A., Cruché D., Duverger-Arfulso C.& Martel A. (2019). Analyses chimiques : méthodes et techniques instrumentales. 9^{ème} édition. Edition Dunod. Paris.