

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université de 8 Mai 1945 – Guelma

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département d'Ecologie et Génie de l'Environnement



Polycopié

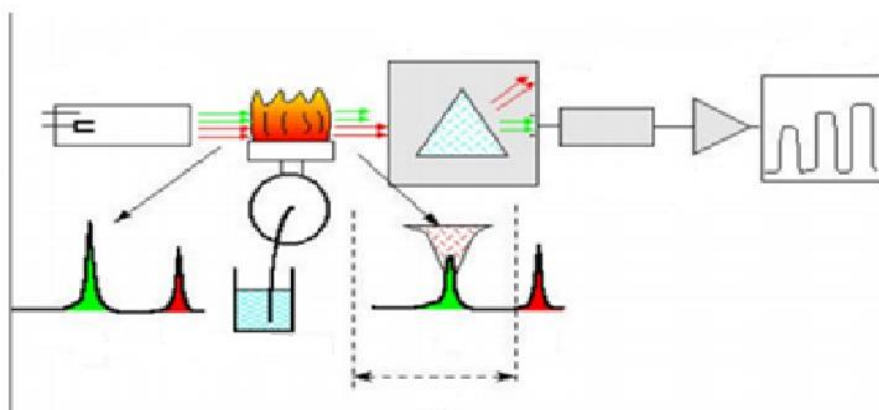
Techniques d'analyse

*Cours destinés aux étudiants en 3ème année Licence Technologie Agro-Alimentaire et
Contrôle de Qualité (TAACQ)*



Réalisé par

Dr. YDJEDD Siham



Année universitaire 2019/2020

Liste des figures

Introduction	1
Chapitre I. Rappel des notions élémentaires	3
1. Généralités sur les Bonnes Pratiques au Laboratoire (BPL)	3
1.1. Définition	3
1.2. Historique	3
1.3. Champ d'application	3
1.4. Intérêt	4
1.5. Principes de bonnes pratiques de laboratoire	4
1.5.1. Organisation et personnel de l'installation d'essai	4
1.5.2. Programme d'assurance qualité	6
1.5.3. Installations	6
1.5.4. Appareils, matériaux et réactifs	6
1.5.5. Systèmes d'essai	7
1.5.6. Eléments d'essai et de référence	7
1.5.7. Modes opératoires normalisés	7
1.5.8. Réalisation de l'étude	7
1.5.9. Etablissement du rapport sur les résultats de l'étude	8
1.5.10. Stockage et conservation des archives et des matériaux	8
2. Généralités sur les solutions	8
2.1. Définitions (soluté, solvant, concentrations)	8
2.2. Unités de concentration	10
2.3. Solubilité-Saturation	12
3. Méthodes de préparation des solutions	14
3.1. Méthode par pesée	14
3.2. Méthode par dilution	15
3.3. Méthode en croix	16
Chapitre II. Méthodes Chimiques et Physico-chimiques d'analyses	17
1. Méthodes chimiques	17
1.1. Gravimétrie	17
1.2. Volumétrie	20
2. Méthodes physico-chimiques	24
2.1. pH-métrie	24

Sommaire

2.2. Conductimétrie	28
2.3. Polarographie	31
Chapitre III. Méthodes Physiques d'analyses	35
1. Méthodes spectrophotométriques : UV- Visible	35
2. Méthodes chromatographiques : Couche mince, CPG et HPLC	43
3. Polarimétrie	56
4. Réfractométrie	58
5. Électrophorèse	61
Références bibliographiques	66

Figure 1. Diagramme d'organisation d'un laboratoire d'essai conforme aux BPL	5
Figure 2. Préparation d'une solution.....	9
Figure 3. Principe de la dissolution d'un électrolyte.....	10
Figure 4. Mode de préparation des solutions par la méthode par pesée.....	15
Figure 5. Mode de préparation des solutions par dilution.....	16
Figure 6. Représentation schématique de mode opératoire de dosage de bicarbonate de sodium par volatilisation	20
Figure 7. Schéma de montage pour un dosage par volumétrie.....	21
Figure 8. Structure schématique d'une chaîne de mesure électrométrique du pH à l'aide d'un ensemble pH-métrie à l'électrode de verre.....	25
Figure 9. Electrodes utilisées dans la mesure du pH.	26
Figure 10. Méthode de titrage	27
Figure 11. Schéma d'une cellule conductimétrique et zoom sur les plaques	30
Figure 12. Titration conductométrique	31
Figure 13. Allure générale d'un polarogramme.	32
Figure 14. Electrodes de mesure statique, pendante et tombantes.	33
Figure 15. Domaines particuliers du rayonnement électromagnétique	36
Figure 16. Différents types de spectres.....	37
Figure 17. Schéma général d'un spectromètre d'émission atomique.....	38
Figure 18. Schéma général d'un spectromètre d'absorption atomique	39
Figure 19. Composition d'un spectromètre d'absorption moléculaire.....	40
Figure 20. Méthode de la droite d'étalonnage.	41
Figure 21. Différentes courbes de titration photométrique.....	42
Figure 22. Principe de fonctionnement de l'appareil HPLC.....	45
Figure 23. Chromatogramme HPLC (intensité mV en fonction de temps de rétention (min)).	47
Figure 24. Principe de l'utilisation de spectrométrie de masse.	47
Figure 25. Principe de la chromatographie sur couche mince.....	51
Figure 26. Différentes étapes de mise en œuvre de la CCM.	52
Figure 27. Schéma d'une chromatographie en phase gazeuse.	53
Figure 28. Principe de fonctionnement de polarimètre	57
Figure 29. Description d'un réfractomètre et son mode de fonctionnement.	60
Figure 30. Différents constituants d'électrophorèse.	62
Figure 31. Types de montage d'électrophorèse.	64

Introduction

La fiabilité de la surveillance de la qualité nutritionnelle et sanitaire des aliments dépend notamment des méthodes utilisées pour effectuer les analyses. Différents types de méthodes d'analyse peuvent être distingués, en fonction de l'objectif analytique poursuivi (détection/quantification, caractérisation ...) ou du statut de la méthode (méthode de référence normalisée, méthode alternative commercialisée, méthode interne).

Ce cours traite de techniques d'analyse utilisées dans les industries agroalimentaires. Il présente l'analyse instrumentale réglementée en mettant l'accent sur les méthodes générales de test et d'analyse des produits alimentaires.

Afin de traiter de l'analyse alimentaire réglementée, comprendre le terme d'aliments est un bon point de départ. Il s'agit donc de toute (s) substance consommée (s) en vue de fournir un apport nutritionnel. Les aliments contiennent des nutriments essentiels, tels que les graisses, les protéines, les vitamines et les minéraux.

Le choix de la méthode d'analyse doit tenir compte de la nature des résultats recherchés. C'est pourquoi, il est important de connaître les caractéristiques de performance "interne" d'une méthode analytique pendant la période considérée lorsqu'on l'utilise sur des substances à analyser. Toute méthode analytique utilisée sur des substances à analyser doit être appliquée de manière cohérente et accompagnée de procédures de contrôle de la qualité.

Le cours est scindé en un ensemble de chapitres qui permettent d'acquérir des connaissances et des compétences en matière de techniques d'analyses utilisées dans les industries agroalimentaires pour le contrôle de qualité.

Le cours permettra d'acquérir des connaissances théoriques concernant la description et le principe de fonctionnement des appareils d'analyses ainsi qu'un aspect pratique de la méthode d'analyse via des TP au niveau du laboratoire en analysant certains aliments.

Ce cours permet, également, d'acquisition d'un savoir-faire et d'un savoir-être indispensables lors de contrôle alimentaire, et cela en respectant les bonnes pratiques de laboratoire et en maîtrisant certains principes de base tels que : les méthodes de préparations des solutions et des réactifs et la manière d'interprétation des résultats.

Pré-requis

Pour pouvoir tirer le maximum de ce cours certaines connaissances préalables sont recommandées à savoir :

- ✓ Les notions de base en chimie, physique et optique ;
- ✓ Utilisation de certains instruments d'analyses notamment les plus simples.

Un test des Pré-requis sera fait au début de cours (sous forme de questions orales ou des exercices) afin de tester les connaissances préalables des étudiants permettant le bon suivi du cours et pour une orientation en cas d'échec.

Place du cours dans le programme

Le cours de Techniques d'Analyses occupe une place importante dans le programme de licence de Technologie Agroalimentaire et contrôle de qualité. Par ailleurs, il est classé dans l'unité fondamentale des enseignements.

Apprentissage visées

Méthodes et Techniques d'Analyses vise à former des étudiants capables de mettre en œuvre les techniques d'analyses courantes et récentes, de participer à des développements analytiques nouveaux et de s'adapter à l'évolution des métiers de l'analyse. De plus, les cours font une large part aux formations générales scientifique et humaine afin de former ces étudiants en vue d'une bonne intégration dans les entreprises en enrichissant leur « savoir de base » et en développant leur « savoir-être »

Le cours vise également à développer aux étudiants les concepts des méthodes instrumentalisés impliquées dans le contrôle alimentaire. Cet enseignement repose sur trois aspects principaux :

- 1- Théorie succincte de la méthode ;
- 2- Description et fonctionnement de l'appareillage ;
- 3- Interprétation des résultats.

Les méthodes instrumentales étant nombreuses. Il sera développé dans le cadre de ce cours que celles qui sont très utilisées dans les industries agroalimentaires.

Chapitre I.

Rappel des notions élémentaires

1. Généralités sur les Bonnes Pratiques au Laboratoire (BPL)

1.1. Définition

Les BPL sont un ensemble de règles rédigées sous forme de procédures dont l'application doit permettre la qualification d'un travail dans le cadre des normes de qualité.

Elles forment un système de garantie de la qualité portant sur le mode d'organisation des études de sécurité non-clinique.

Elles définissent également la responsabilité du personnel, la gestion et la maintenance des équipements, la validation des procédés et des méthodes, les règles d'hygiène et de sécurité.

1.2. Historique

Les Bonnes Pratiques de Laboratoire abrégés (BPL) ont été mises au point après que la Food and Drug Administration (FDA) ait découvert un certain nombre de mauvaises pratiques dans les laboratoires de toxicologie aux Etats-Unis. Les résultats des investigations ont montré que les études étaient mal organisées, le personnel pas suffisamment formé et certains cas de fraudes délibérées. Durant ses investigations, la FDA a notée également que les études étaient faites sans respect des protocoles ni des procédures. Les données brutes générées lors de l'étude étaient mal collectées nonreproductibles ni reconnues et approuvées par les responsables. La FDA a pris décision d'introduire une législation pour couvrir les études.

En 1978, un Groupe international d'experts, constitué dans le cadre du Programme spécial sur le contrôle des produits chimiques, a établi les "Principes de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques) de bonnes pratiques de laboratoire" en faisant la synthèse des méthodes de gestion, des pratiques scientifiques et de l'expérience de divers organismes nationaux et internationaux.

L'application de ces principes de BPL a été officiellement recommandée aux pays membres par le conseil de l'OCDE en 1981.

En 1995 et 1996, un nouveau Groupe d'experts a été constitué pour réviser et mettre à jour ces principes.

Les principes de BPL révisés de l'OCDE ont été examinés par les organes directeurs compétents de l'organisation puis adoptés par le conseil le 26 novembre 1997.

1.3. Champ d'application

Les Principes relatifs aux bonnes pratiques de laboratoire devront s'appliquer aux essais de sécurité non cliniques pratiqués sur des éléments contenus dans des produits

pharmaceutiques, des pesticides, des cosmétiques, des médicaments vétérinaires, des additifs pour l'alimentation humaine et animale et des produits chimiques industriels. Ces éléments soumis à des essais sont souvent des produits chimiques de synthèse, mais peuvent avoir une origine naturelle ou biologique et être des organismes vivants dans certaines circonstances. Les essais effectués sur ces éléments visent à fournir des données sur leurs propriétés et/ou leur innocuité du point de vue de la santé humaine et/ou de l'environnement.

1.4. Intérêt

Leur but principal est d'aider les scientifiques à obtenir des résultats qui sont fiables, reproductibles, vérifiables, reconnus sur le plan international.

Elle permet de :

- promouvoir une harmonisation internationale pour l'essai des produits chimiques ;
- aider les pays à développer des méthodes d'évaluation et à partager le travail ;
- évaluation des différents produits chimiques ;
- offrir un cadre dans lequel les pays peuvent échanger des informations.

1.5. Principes de bonnes pratiques de laboratoire

1. Organisation et personnel de l'installation d'essai
2. Programme d'assurance qualité
3. Installations
4. Appareils, matériaux et réactifs
5. Systèmes d'essai
6. Eléments d'essai et de référence
7. Modes opératoires normalisés
8. Réalisation de l'étude
9. Etablissement du rapport sur les résultats de l'étude
10. Stockage et conservation des archives et des matériaux

1.5.1. Organisation et personnel de l'installation d'essai

❖ La direction de l'installation

Elle doit s'assurer qu'un nombre suffisant de personnes qualifiées, ainsi que d'installations, équipements et matériaux appropriés, sont disponibles pour que l'étude se déroule en temps voulu et de façon adéquate.

❖ **Le Directeur de l'étude**

Le Directeur de l'étude est seul en charge du contrôle de l'étude et assume la responsabilité de la conduite générale de l'étude et de l'établissement du rapport final. Il approuve, par une signature datée, le plan de l'étude.

❖ **Responsable principal des essais**

Il s'assurera que les phases de l'étude qui lui sont déléguées se déroulent conformément aux Principes applicables de bonnes pratiques de laboratoire.

❖ **Personnel de l'étude**

- ✓ Il doit être bien informé des parties des Principes de bonnes pratiques de laboratoire applicables à sa participation à l'étude.
- ✓ Il aura accès au plan de l'étude et aux modes opératoires normalisés qui s'appliquent à sa participation à l'étude.
- ✓ Il doit enregistrer les données brutes de manière rapide et précise, conformément aux BPL, et d'assumer la responsabilité de la qualité de ces données.
- ✓ Il doit prendre les précautions d'hygiène nécessaires pour réduire au minimum le risque auquel il est exposé et pour assurer l'intégrité de l'étude.

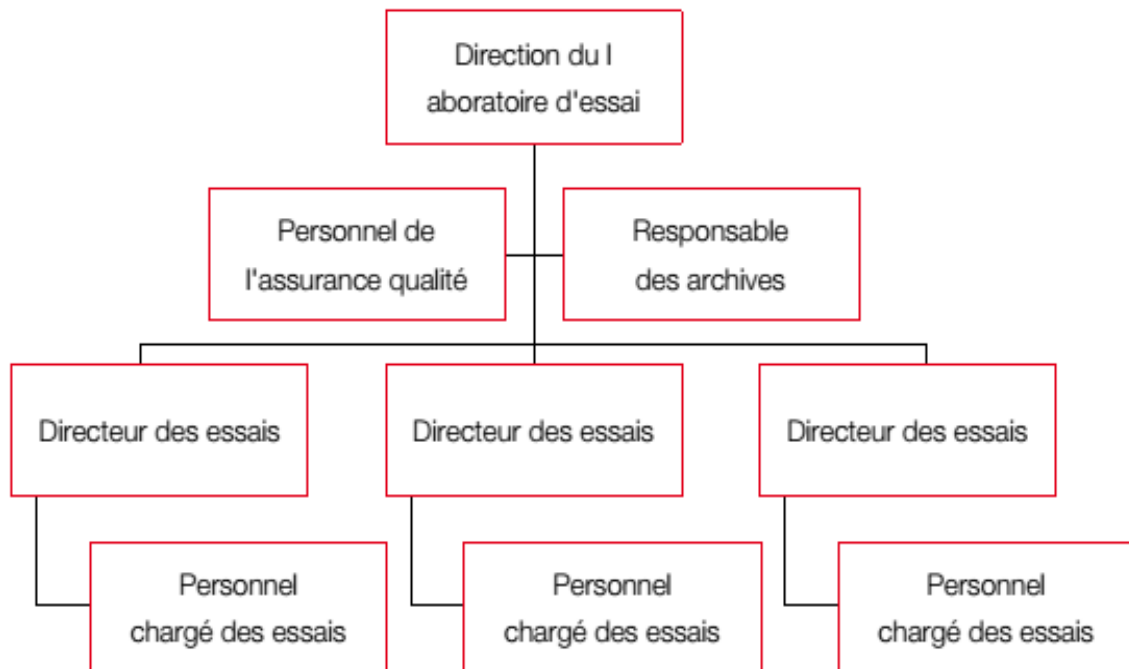


Figure 1. Diagramme d'organisation d'un laboratoire d'essai conforme aux BPL

1.5.2. Programme d'assurance qualité

Un système précis englobant le personnel correspondant, qui est indépendant de la conduite de l'étude et vise à donner à la direction de l'installation d'essai l'assurance que les principes de BPL sont bien respectés.

un programme d'A.Q. faisant appel à tout document utile qui permette de vérifier que les études sont réalisées conformément aux principes de BPL.

Une ou des personnes désignées par la direction doit - doivent être responsable (s) de l'A.Q. Ces personnes ne doivent pas participer à la réalisation de l'étude visée par le programme.

Le personnel chargé de l'A.Q. doit : conserver les copies de tous les plans d'étude, vérifier que le plan de l'étude contient les informations nécessaires au respect des principes de BPL, procéder à des inspections pour vérifier si toutes les études se déroulent conformément aux principes de BPL.

1.5.3. Installations

L'installation d'essai doit comporter un nombre suffisant de salles ou de locaux pour assurer la séparation des systèmes d'essai.

Elle doit disposer de salles ou de locaux appropriés pour le diagnostic, le traitement et le contrôle des maladies, de sorte que les systèmes d'essai ne subissent pas un degré inacceptable de détérioration.

Elle doit disposer de salles de stockage en suffisance pour les fournitures et pour les équipements séparés des salles ou locaux accueillant les systèmes d'essai et suffisamment protégés contre la contamination et/ou la détérioration.

Il faut prévoir des salles d'archives pour le stockage et la consultation en toute sécurité des plans d'étude, des données brutes, des rapports finals.

1.5.4. Appareils, matériaux et réactifs

Les appareils utilisés dans une étude doivent être périodiquement inspectés, nettoyés, entretenus et étalonnés conformément aux modes opératoires normalisés.

Les systèmes informatiques doivent occuper un emplacement correct, être de conception appropriée et avoir une capacité suffisante.

Il faut étiqueter les produits chimiques, réactifs et solutions et en mentionner la nature (avec la concentration, le cas échéant), la date d'expiration et les instructions particulières pour le stockage.

1.5.5. Systèmes d'essai

Le système d'essai désigne tout système biologique, chimique, physique ou toute combinaison de ceux-ci ou animal et végétal qui est utilisé dans une étude.

Il faut créer et maintenir des conditions convenables pour le stockage, la manipulation et l'entretien des systèmes d'essai biologiques et chimiques afin de s'assurer de la qualité des données.

Les systèmes d'essai animaux et végétaux récemment reçus doivent être isolés jusqu'à leur état sanitaire sera évalué.

Il faut tenir des registres mentionnant l'origine, la date d'arrivée et l'état à l'arrivée des systèmes d'essai.

1.5.6. Éléments d'essai et de référence

Il faut tenir des registres mentionnant la caractérisation des éléments d'essai, la date de réception, la date d'expiration et les quantités recues et utilisées dans l'étude.

Il faut définir des méthodes de manipulation, d'échantillonnage et de stockage qui assurent le maintien de l'homogénéité et de la stabilité dans toute la mesure du possible et évitent une contamination ou un mélange.

1.5.7. Modes opératoires normalisés

L'installation d'essai doit posséder des modes opératoires normalisés écrits, approuvés par la direction de l'installation, qui doivent assurer la qualité des données obtenues par cette installation. Les révisions des modes opératoires normalisés doivent être approuvées par la direction de l'installation d'essai.

Chaque section distincte de l'installation d'essai doit avoir un accès immédiat aux modes opératoires normalisés correspondant aux travaux qui s'y effectuent. Des ouvrages peuvent servir de compléments à des modes opératoires normalisés.

1.5.8. Réalisation de l'étude

Pour chaque étude, il convient d'établir un plan écrit avant le début des travaux. Le plan de l'étude comprend la description du déroulement de l'essai, mais aussi les méthodes de contrôle et la fréquence d'exécution. Toute modification du plan doit être consignée ; il faut indiquer la raison du changement avec la date, la signature ou le paraphe de la personne qui y procède.

L'étude doit se dérouler conformément au plan arrêté.

Un essai BPL s'achève par un rapport final. Même lorsque l'essai a été interrompu, un rapport sommaire doit être créé.

1.5.9. Etablissement du rapport sur les résultats de l'étude

Dans le rapport final, il faut traiter les données brutes rassemblées durant l'étude. Il faut en outre faire figurer dans ce rapport les éléments suivants :

- Dates du début et de la fin de l'étude
- Nom du directeur de l'étude
- Objectifs de l'étude
- Description du système d'essai
- Détails concernant méthodes utilisées
- Résumé des résultats
- Etude statistique
- Discussion
- Références
- Déclaration de conformité aux BPL par le directeur de l'étude
- Déclaration d'assurance qualité des inspecteurs (Déclaration)
- Signature et date

1.5.10. Stockage et conservation des archives et des matériaux

Le plan de l'étude, les données brutes, les échantillons des éléments d'essai et de référence, les spécimens et le rapport final de chaque étude ;

Des rapports sur toutes les inspections réalisées conformément au programme d'assurance qualité ;

Les relevés des qualifications, de la formation, de l'expérience et des descriptions des tâches du personnel ;

Des comptes rendus et des rapports relatifs à l'entretien et à l'étalonnage de l'équipement ;

Les documents relatifs à la validation des systèmes informatiques ;

Les modes opératoires normalisés.

2. Généralités sur les solutions

2.1. Définitions (soluté, solvant, concentrations)

2.1.1. Phénomène de dissolution

Lorsqu'on dissout une substance dans un liquide, on obtient une solution qui est un mélange homogène.

La substance dissoute est appelée **soluté**, et le liquide dans lequel la substance est dissoute est appelé **solvant**.

NB : Si le solvant est l'eau, la solution sera dite solution aqueuse.



Figure 2. Préparation d'une solution

2.1.2. Solution aqueuse ionique et solution aqueuse non ionique

Une solution aqueuse qui conduit le courant électrique contient des ions (cations et anions). On l'appelle **solution aqueuse ionique**. Le soluté est un cristal ionique. Exemple : Le mélange entre le sel et eau est une solution aqueuse ionique contenant des ions Na^+ et des ions Cl^- .

Une solution aqueuse qui ne conduit pas le courant électrique est une **solution aqueuse non ionique**. Exemple : La solution de saccharose (sucre) est une solution non ionique.

2.1.3. Etapes de la dissolution

La dissolution d'un électrolyte dans un solvant se fait en trois étapes distinctes : la dissociation, la solvation puis la dispersion.

a. Dissociation

Le solvant étant polaire, ses molécules se comportent comme de petits dipôles électrostatiques. Les cations du cristal ionique sont donc attirés par les côtés positifs des molécules du solvant, et les anions par les côtés négatifs. Ces attractions extérieures au cristal déséquilibrent les interactions internes et affaiblissent sa cohésion : les ions qui sont à la surface du cristal sont peu à peu arrachés par les molécules du solvant. On parle de dissociation du cristal ionique. C'est le phénomène de dissociation.

NB. Dans le cas d'un électrolyte non pas ionique mais moléculaire, il se passe la même chose puisque chaque molécule de l'électrolyte est polaire donc présente un côté positif et un côté négatif.

b. Solvation

Une fois arraché du cristal, chaque ion est entouré de molécules du solvant. Celles-ci forment un bouclier et empêchent toute interaction entre les ions en solution. C'est le phénomène de solvation. Dans le cas où le solvant est l'eau, l'étape de solvation porte aussi le nom d'hydratation.

c. Dispersion

Une fois solvatés, les ions se déplacent avec leur cortège de molécules du solvant librement dans la solution et celle-ci devient peu à peu homogène. Cette étape est considérablement accélérée si l'on agite la solution.

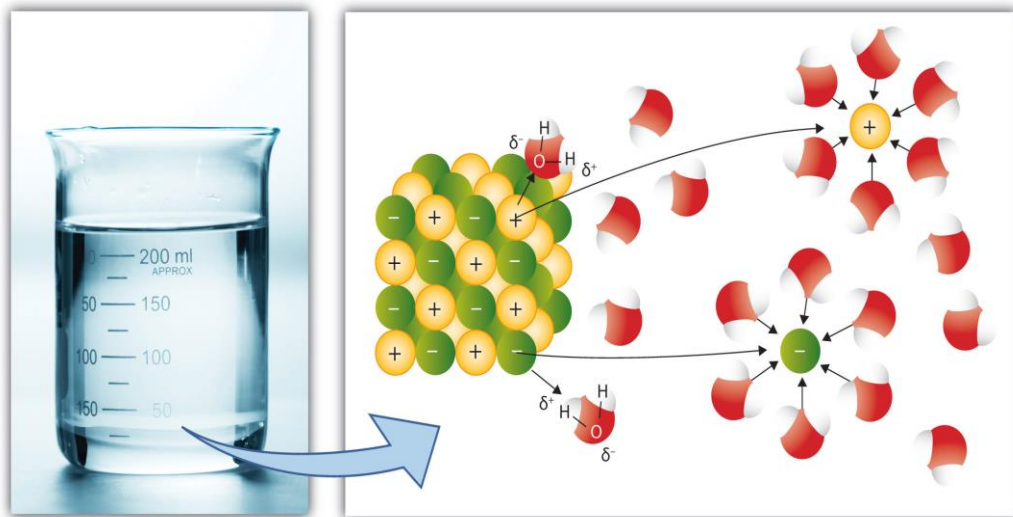


Figure 3. Principe de la dissolution d'un électrolyte.

2.1.4. Effets thermiques de la dissolution

La dissolution de certains solutés s'accompagne :

- ✓ D'une augmentation de température : la dissociation est dite **exothermique** (NaOH dans l'eau).
- ✓ Ou d'une baisse de température : la dissociation est dite endothermique (NH_4NO_3).

2.2. Unités de concentration

2.2.1. Concentration massique d'une solution aqueuse

La concentration massique d'une solution est la masse de soluté contenue dans un litre de cette solution. On la note C_m et son unité est le g/L.

$$C_m = \frac{m(\text{soluté})}{V_s} \quad \text{avec} \quad \left\{ \begin{array}{l} C_m : \text{la concentration massique de la solution (g.L}^{-1}\text{)} ; \\ V_s : \text{le volume de la solution (L)} ; \\ M : \text{la masse du soluté (g)} \end{array} \right.$$

2.2.2. Concentration molaire d'une solution.

La concentration molaire d'une solution est la quantité de matière de soluté contenue dans un litre de solution. On la note C et son unité est le mol/L.

$$C = \frac{n(\text{soluté})}{V_s} \quad \text{avec} \quad \left\{ \begin{array}{l} n(\text{soluté}) : \text{le nombre de mole de soluté (mole)} ; \\ V_s : \text{le volume de la solution (L)} ; \\ C : \text{la concentration molaire de la solution.} \end{array} \right.$$

Exercice 1 :

On prépare une solution de sulfate de sodium (Na_2SO_4) en dissolvant 3,55 g de ce composé dans l'eau pour obtenir 250 mL de solution.

Calculer la concentration molaire et massique de la solution obtenue.

Ex :

Préparation de 250 mL de soude à 0,1 mol/L

$m = M \cdot C \cdot V$ (avec V en L).

où

M est la masse molaire de la substance à dissoudre ;

C la concentration de la solution à préparer ;

V le volume de solution à préparer.

Données :

masse molaire de la soude : $M_{\text{NaOH}} = 40 \text{ g.mol}^{-1}$;

concentration de la solution souhaitée : $C = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$;

Volume de solution préparée : $V = 250 \text{ mL} = 0,25 \text{ L}$.

d'où $m = \dots\dots\dots \text{ g}$

Ex :

On vous demande de réaliser 1L d'une solution d'acide chlorhydrique à 1M

Vous disposez d'une solution concentrée à 37%.

La masse molaire de l'HCl est de 36.5 g/mole.

La densité de la solution concentrée est de 1.19.

La masse m d'acide chlorhydrique contenue dans le flacon est $m = 0,37 \times 1190 = 440,3$ g
La masse molaire M de l'acide chlorhydrique est : $M = 36,5$ mol/L

Le nombre de mole n contenu dans le flacon est :

$$n = m/M \qquad n = 440,3/36,5 \qquad n = 12,06 \text{ mol}$$

La concentration c de la solution mère est donc : $c = 12,06$ mol.L⁻¹

Le volume $V = 1000$ mL d'acide chlorhydrique que l'on doit préparer contiendra un nombre de mole n tel que : $n = C V$, $n = 1 \times 1$ $n = 1$ mol

Ce nombre de mole est apporté par un volume V_0 de la solution mère tel que :

$$V = n/c \qquad V = 1/12,06 \qquad V = 0,08 \text{ L}$$

2.3. Solubilité-Saturation

2.3.1. Saturation d'une solution.

Au fur et à mesure de la dissolution, le nombre de molécules du solvant disponibles pour la dissociation diminue donc la dissolution est de plus en plus lente. Le nombre de molécules d'eau disponibles étant limité, la quantité de soluté qu'une solution peut dissoudre est elle-même limitée. Lorsqu'on atteint cette limite, on parle de solution saturée.

2.3.2. Solubilité

La solubilité d'une substance dans l'eau est la quantité maximale de matière de cette substance que l'on peut dissoudre dans un volume d'eau donné. C'est une grandeur qui dépend de la température.

2.4. Normalité

La normalité est le nombre d'équivalent-gramme d'un soluté (i) présents dans un litre de solution. Une solution normale (ou une fois normale) contient un équivalent-gramme par litre.

Normalité (N) et concentration molaire (CM) sont reliées par la relation suivante :

$N = nCM$; $n =$ L'équivalent-gramme est la quantité de substance comprenant une mole des particules considérées (H^+ , e^-) nombre de protons échangés au cours des réactions acidobasiques ou d'électrons dans le cas des réactions d'oxydoréduction.

Application :

Quelle est la normalité d'une solution d'acide sulfurique contenant 12,25 g d'acide par 500 cm³.

Corrigé :

Un eq-g de $\text{H}_2\text{SO}_4 = \frac{1}{2} \text{ mole} \times 98 = 49\text{g}$

Donc : 1eq-g \longrightarrow 49 g

X= ? \longleftarrow 12,25 g

D'où, x= nombre d'eq-g dans la masse de 0,25g = $(12,25 \times 1) / 49 = 0,25 \text{ eq-g} / 500 \text{ cm}^3$

La normalité (par définition) est le nombre d'eq-g/L :

500 $\text{Cm}^3 \longrightarrow$ 0,25 eq-g

1 L = 1000 $\text{cm}^3 \longrightarrow$ x= ?

D'où, x = nombre d'eq-g dans 1 L de solution = $(1000 \times 0,25) / 500 = 0,5 \text{ eq-g}$

La normalité de H_2SO_4 est donc égale à 0,5 N ou 0,5 fois normale.

❖ **Pourcentage masse/volume % (m/v) :** C'est le nombre de gramme d'un soluté dans 100 ml (ou 100 cm^3) de solution

Exemple : Une solution de 50% (m/v) de H_2SO_4 , signifie q'une telle solution contient 50 g de H_2SO_4 100 ml d'eau.

Remarque : Le volume des liquides variant avec la température, les titres définis plus haut dépendent donc de la température.

❖ **Expressions se fondant sur un rapport masse/masse (m/m) :**

Les titres ainsi définis ne dépendent pas de la température.

a) Partie par million (ppm) : La concentration en ppm représente le nombre de portions de soluté dissoutes dans 1 millions de parties de solution : $1 \text{ ppm} = 1/10^6$

Cette concentration est souvent utilisés pour quantifier des traces (c'est-à-dire en quantité trop faible) de solutés contenues dans une solution quelconque.

Une partie par million correspond aussi à un milligramme par kilogramme (1 mg/ kg) ou un milligramme par un litre de solution (1 mg/L).

Application : Calculer, en ppm, la concentration d'une solution aqueuse de NaCl de concentration égale à $26 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$.

Corrigé :

Rappelons : 1 ppm= 1 partie par million= 1 mg par million de mg = 1 mg/Kg.

NaCl a une masse molaire de : $M_{\text{Na}} + M_{\text{Cl}} = 23 + 35,5 = 58,5 \text{ g/mol}$

Une solution $26 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ contient donc $26 \times 10^{-4} \times 58,5 = 0,152 \text{ g/L}$.

Si l'on assimile qu'un volume de 1L de solution de NaCl vaut 1 Kg en masse, alors cela implique que la solution NaCl contient 0,152 g/Kg, c'est-à-dire : $152 \text{ mg/Kg} = 152 \text{ ppm}$.

b) Molalité (Concentration molale) : C'est le nombre de moles de soluté considéré par kilogramme de solvant (eau). Elle est donnée par la relation suivante :

$$\text{Molalité} = \frac{n \text{ soluté}}{m \text{ solvant}} = \frac{n \text{ soluté (mol)}}{m \text{ eau (Kg)}}$$

Application :

On dispose d'une solution aqueuse d'acide acétique à 856g d'acide par litre de masse volumique 1.07 Kg/L. Quelle est la molalité de cette solution ?

Corrigé :

Masse de soluté CH_3COOH = 856g

Masse molaire de soluté = 60 g/mol

Nombre de moles d'acide contenues dans un litre de solution :

$N \text{ soluté} = m \text{ soluté} / M \text{ soluté} = 856 / 60 = \mathbf{14,26 \text{ mole}}$

1 litre de solution pèse 1070g :

Masse de l'eau = masse solution – m soluté = 1070 – 856 = **214g = 0,214 Kg**

Molalité = n soluté / m eau = 14,26 / 0,214 = 66,63 mol / Kg.

c) Pourcentage masse/ masse (% m/m) (% pourcentage massique) : C'est le nombre de gramme d'un soluté quelconque contenus dans cent grammes de solution.

Exemple : Une solution de 15% m/m de KOH, signifie qu'une telle solution contient 15 g de KOH dans 100g d'eau.

d) fraction molaire (X)

La fraction molaire du soluté est le rapport du nombre de moles de soluté par le nombre de moles de la solution (solvant+soluté).

3. Méthodes de préparation des solutions

3.1. Méthode par pesée

Détermination de la masse de soluté à peser

Soit à préparer un volume V d'une solution contenant l'espèce X, de masse molaire M(X), à la concentration [X]. Il faut, en général, déterminer la masse de l'espèce X à peser. Soit m(X) cette masse.

$$[X] = n(x) / v \text{ or } n(x) = m(x) / M(x)$$

$$\text{Donc } [X] = m(x) / M(x) * v$$

$$\text{Et } m(x) = [X] * M(x) * v$$

Opérations à effectuer


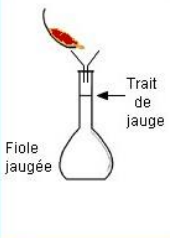

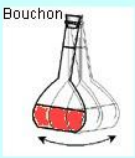
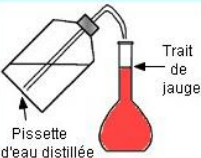
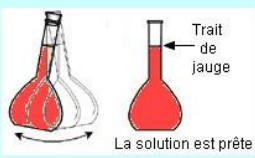
<p>Première étape : À l'aide d'une balance électronique, on détermine la valeur de la masse de soluté</p>	<p>Deuxième étape : On verse le soluté dans la fiole jaugée de volume approprié (ici 250,0 mL)</p>	<p>Troisième étape : On ajoute de l'eau distillée aux $\frac{3}{4}$ de la graduation.</p>
		
<p>Quatrième étape : On agite pour dissoudre, mélanger et homogénéiser</p>	<p>Cinquième étape : On complète avec une pissette d'eau distillée jusqu'au trait de jauge.</p>	<p>Sixième étape : On agite pour homogénéiser. La solution est prête.</p>
		

Figure 4. Mode de préparation des solutions par la méthode par pesée

3.2. Methode par dilution

Diluer une solution correspond à diminuer sa concentration. Pour cela, il faudra donc ajouter du solvant. Mais il faudra connaître le volume de solvant ajouté afin de connaître la concentration de la nouvelle solution obtenue. Pour désigner la solution la plus concentrée, on utilise souvent le terme de « solution mère » tandis que la solution diluée sera appelée « solution fille ».

Principe

On prélève un volume V_0 de la solution mère de concentration C_0 que l'on dilue avec de l'eau distillée pour obtenir une solution diluée de volume V_1 et de concentration désirée C_1 .

Détermination du volume V_0 à prélever

Lors de la dilution, la quantité de matière du soluté se conserve. On écrit : $n_1 = n_2$

Donc :
$$C_0 \cdot V_0 = C_1 \cdot V_1$$

Opérations à effectuer

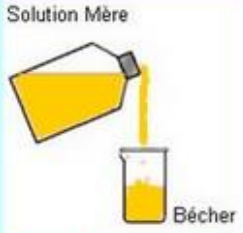


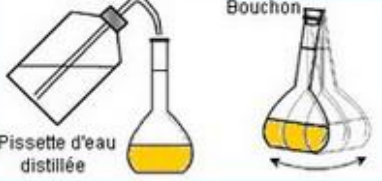
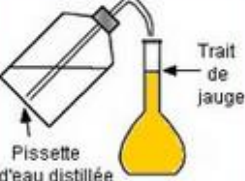
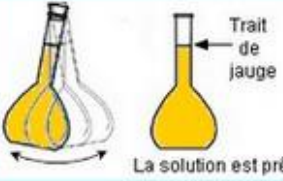
<p>Première étape : Verser suffisamment de solution Mère dans un bécher</p>	<p>Deuxième étape : On prélève le volume nécessaire de solution Mère à l'aide d'une pipette graduée de 20 mL</p>	<p>Troisième étape : On verse le volume nécessaire de solution dans la fiole jaugée de volume approprié..</p>
 <p>Solution Mère</p> <p>Bécher</p> <p>On ne pipette jamais directement dans le flacon qui contient la solution Mère</p>	 <p>Pipette graduée de 20 mL</p> <p>Solution mère</p> <p>Bécher</p>	 <p>On verse 14,4 mL de solution</p> <p>Fiole jaugée de 100 mL</p>
<p>Quatrième étape : On ajoute de l'eau distillée et on agite mélanger et homogénéiser</p>	<p>Cinquième étape : On complète avec une pissette d'eau distillée jusqu'au trait de jauge.</p>	<p>Sixième étape : On agite pour homogénéiser. La solution est prête.</p>
 <p>Pissette d'eau distillée</p> <p>Bouchon</p>	 <p>Trait de jauge</p> <p>Pissette d'eau distillée</p>	 <p>Trait de jauge</p> <p>La solution est prête</p>

Figure 5. Mode de préparation des solutions par dilution

3.3. Méthode en croix

La technique des Produits en Croix, qu'on appelle aussi parfois calcul d'une « quatrième proportionnelle », voire « règle de trois », fait partie des règles mathématiques.

- ✓ En utilisant **Tableau de Proportionnalité.**
- ✓ En utilisant **le coefficient de proportionnalité.**
- ✓ En utilisant **le produit en croix.**

Chapitre II.
Méthodes Chimiques et Physico-
chimiques d'analyses

1. Méthodes chimiques

1.1. Gravimétrie

1.1.1. Définition

Les méthodes gravimétriques d'analyse sont basées sur des mesures de masses à l'aide d'une balance analytique. Cette méthode d'analyse quantitative a pour but d'obtenir une séparation quantitative d'un cation ou d'un anion en solution aqueuse.

Les dosages gravimétriques utilisent deux types de méthode :

- ❖ Méthodes par précipitation
- ❖ Méthodes par volatilisation

Dans les méthodes par **précipitation**, l'analyte (le composant ou l'espèce chimique) est converti en un précipité peu soluble qui est ensuite filtré, lavé de ses impuretés et transformé en un produit de composition connue par un traitement thermique approprié. Ce produit est ensuite pesé. Autrement dit, La méthode consiste à transformer une espèce soluble en un composé insoluble, dans un milieu déterminé. Le précipité formé est pesé ce qui permet de quantifier l'espèce soluble dans le milieu de départ.

Dans les méthodes par **volatilisation**, l'analyte est volatilisé à une température appropriée. Le produit volatil est recueilli et pesé, ou bien la masse de l'analyte est déterminée à partir de la perte de masse de l'échantillon.

1.1.2. Propriétés des précipités et des réactifs précipitants

Un réactif précipitant gravimétrique doit réagir avec l'analyte de manière spécifique ou de manière sélective.

Les réactifs **spécifiques** qui sont rares, ne réagissent qu'avec une seule espèce chimique.

Les réactifs **sélectifs**, plus courants, réagissent avec un nombre limité d'espèces. Le réactif précipitant idéal doit réagir avec l'analyte pour donner un produit qui soit :

- Facilement filtré et lavé de ses contaminants ;
- Suffisamment peu soluble pour qu'aucune perte significative de l'analyte ne se produise au cours de filtration et de lavage ;
- De composition bien définie après avoir été séché ou calciné.

1.1.3. Taille des particules et filtrabilité des précipités

Les dimensions de particules formées par précipitation sont variables. On peut obtenir des suspensions colloïdales dont les particules sont invisibles à l'œil nu sédimentent difficilement et

ne sont pas filtrables. Dans d'autres cas, les particules sont grosses et forme des suspensions cristalline. Ces particules sédimentent spontanément et peuvent être facilement filtrées.

➤ **Les précipités colloïdaux**

Les suspensions colloïdales sont souvent stables. La stabilité de ces suspensions peut être diminuée par chauffage, par agitation et par addition d'électrolyte. A la suite de ces opérations, les particules colloïdales se lient pour former une masse amorphe qui se sépare de la solution et peut être filtrée, on parle de **coagulation** ou **agglomération**.

➤ **Les précipités cristallins**

Il est généralement plus facile de filtrer et de purifier les précipités cristallins grâce à la taille individuelle des particules et donc leur filtrabilité peuvent d'être contrôlée.

1.1.4. Séchage et calcination des précipités

Après l'avoir filtré, on chauffe le précipité jusqu'à ce que sa masse devienne constante. Le chauffage élimine le solvant et toutes les espèces volatiles. Dans certains cas, on calcine les précipités pour les décomposer et former un autre solide de composition connue qui constitue la forme de pesage.

La température requise pour obtenir le produit adéquat varie d'un précipité à l'autre.

1.1.5. Etapes de l'analyse gravimétrique

Les étapes de ces dosages sont assez simples. Elles sont toujours articulées autour de ces trois actions fondamentales :

- ❖ peser l'échantillon ;
- ❖ utiliser une méthode physico-chimique (précipitation, volatilisation)
- ❖ peser les produits.

Dans le cas des dosages par précipitation, on aura :

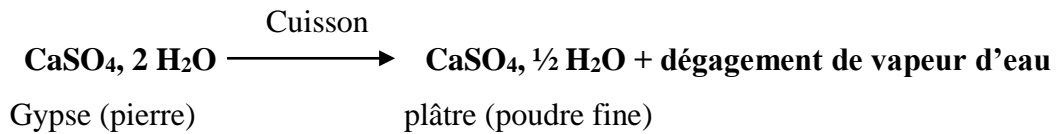
- ❖ peser l'échantillon ;
- ❖ dissoudre dans un solvant approprié ;
- ❖ précipiter la solution à doser ;
- ❖ laver le précipité après filtration, ensuite le sécher et le peser ;
- ❖ calculer la quantité de l'élément dosé dans le précipité.

Dans le cas des dosages par volatilisation, on aura :

- ❖ peser l'échantillon ;
- ❖ chauffer à température appropriée ;
- ❖ récupérer le produit volatil et le peser ;
- ❖ calculer la quantité de l'élément.

Exemple 1: Détermination de la teneur en sulfate de calcium dans un plâtre.

Après extraction, le gypse est concassé, broyé et séché. Soumis ensuite à une cuisson (entre 100 et 200 °C), il se déshydrate partiellement et donne naissance au plâtre. On peut écrire :



➤ **Protocole**

Le plâtre contient des impuretés en assez grande quantité. Le dosage du taux de sulfate de calcium hémihydraté ($\text{CaSO}_4, \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$) dans le plâtre se fait par gravimétrie : on fait précipiter les ions SO_4^{2-} du plâtre avec les ions Ba^{2+} du chlorure de baryum puis on pèse le précipité de sulfate de baryum BaSO_4 formé.

Peser exactement environ 0,4 g de l'échantillon de plâtre : $m_{\text{échantillon}} = 0,4 \text{ g}$;

Dans un bécher de 500 mL, dissoudre le plâtre dans 300 mL d'eau distillée ;

Porter à ébullition sur un agitateur magnétique chauffant ;

À ébullition, ajouter au goutte à goutte et en 10 min, 25 mL d'une solution de chlorure de baryum à 25%, à l'aide d'une burette ;

Laisser refroidir 10 min à température ambiante puis à l'aide d'eau froide ;

Filtrer le tout sur une laine de montre (filtre), préalablement pesé à vide : $m_0 = 31,5907 \text{ g}$;

Verser environ 20 mL d'eau bouillante dans le filtre de manière à laver le précipité ;

Sécher le filtre à l'étuve à 110°C ;

Lorsque la masse se stabilise, peser avec précision l'ensemble : $m_1 = 32,2192 \text{ g}$;

En déduire la masse de précipité : $m_{\text{précipité}} = 0,6285 \text{ g}$.

➤ **Résultats**

Le protocole indique l'utilisation de 25 mL de solution de BaCl_2 à 25%. Donc la quantité de matière de BaCl_2 introduite : $n = 0,03 \text{ mol}$;

La quantité de matière de l'échantillons : $n = 0,0028 \text{ mol}$;

D'après la masse m_p de précipité sec, le nombre de mole de BaSO_4 : $n_{\text{précipité}} = 0,00269 \text{ mol}$;

La masse de plâtre pur contenu dans l'échantillon : $m_{\text{plâtre pur}} = 0,00269 \times 145 = 0,39 \text{ g}$;

En déduire la pureté du plâtre en calculant le rapport : $m_{\text{plâtre pur}} / m_{\text{échantillon}} = 0,96 = 96\%$.

Exemple 2 :

Produit volatil analysé: le dosage du bicarbonate de sodium dans des comprimés médicamenteux. On pèse un échantillon de comprimé finement broyé et on le traite avec de l'acide sulfurique dilué, ce qui décompose l'hydrogénocarbonate en dioxyde de carbone.



Le CO_2 dégagé est ensuite absorbé en réagissant avec NaOH sur silicate contenant CaSO_4 (agent desséchant) pour produire de l'eau et du carbonate de sodium.

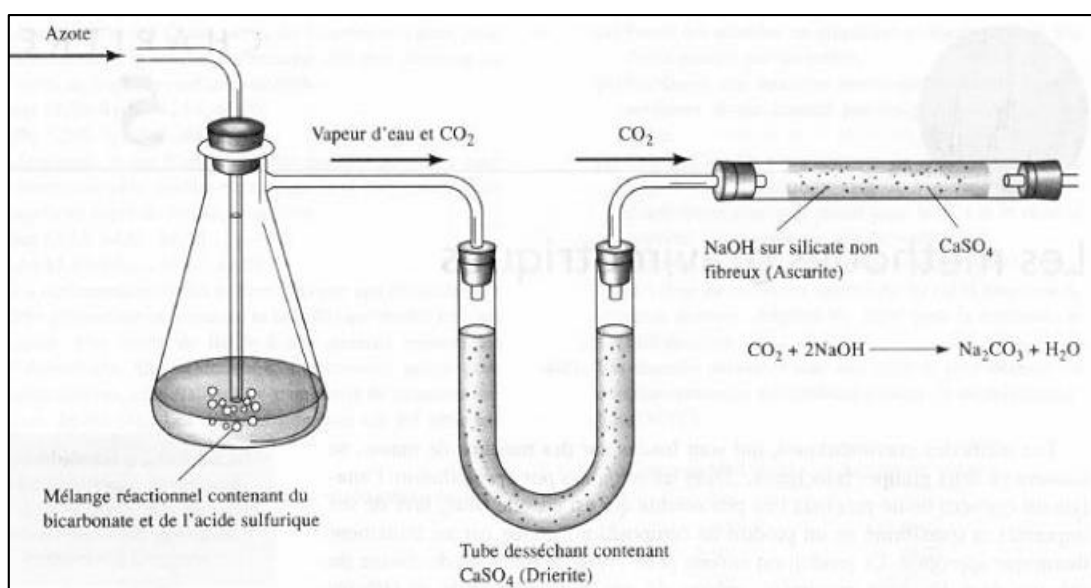
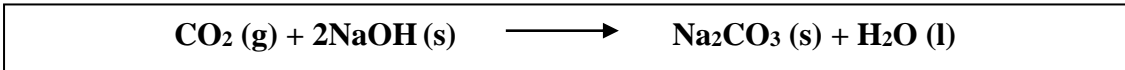


Figure 6. Représentation schématique de mode opératoire de dosage de bicarbonate de sodium par volatilisation

1.2. Volumétrie

1.2.1. Définitions

Le terme « **analyse titrimétrique** » se rapporte à l'analyse chimique quantitative basée sur la détermination du volume d'une solution de concentration connue avec précision qui est nécessaire pour réagir quantitativement avec un volume donné d'une solution de substance analysée (analyte).

Le terme « **analyse volumétrique** » désignait autrefois cette forme de dosage quantitatif mais il est maintenant remplacé par analyse titrimétrique. On considère que ce terme exprime beaucoup mieux le processus de titrage et que l'on risque de confondre « analyse volumétrique » et « mesures de volumes ».

Le réactif de concentration connue est appelé « **substance titrante** » et la substance que l'on titre est la « **substance titrée** ».

Une solution de titre connu avec précision est appelée **solution étalon ou titrant étalon**. Un titrage s'effectue en ajoutant lentement une solution étalon à une solution de l'analyte à l'aide d'un long tube gradué appelé **burette** jusqu'à ce qu'on estime que la réaction entre les deux solutions est complète. Le volume de réactif nécessaire pour effectuer le titrage est déterminé par la différence entre les valeurs du volume initial et du volume final.

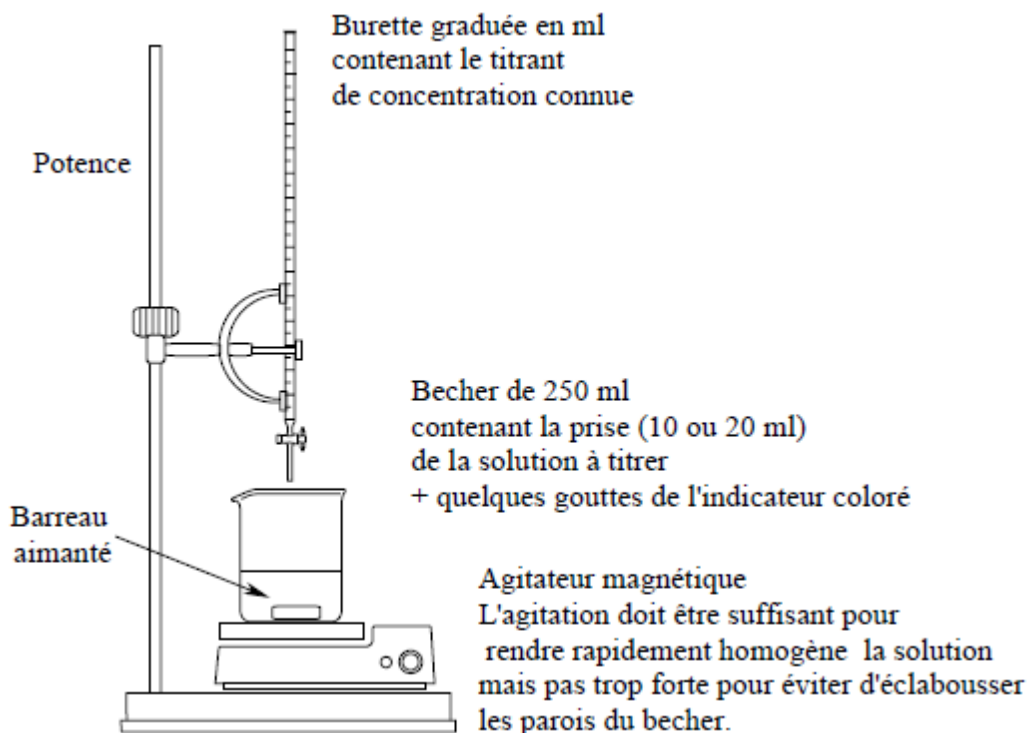


Figure 7. Schéma de montage pour un dosage par volumétrie.

1.2.2. Point d'équivalence et point de fin de titrage

Le **point d'équivalence** d'un titrage est atteint lorsque la quantité de titrant ajoutée est chimiquement équivalente à la quantité d'analyte présente dans l'échantillon. C'est un point théorique qui ne peut pas être déterminé expérimentalement mais on peut estimer sa position en observant une modification physique appelée le **point de fin de titrage**.

On ajoute un **indicateur** à la solution d'analyte dans le but d'obtenir un changement physique observable (changement de couleur, apparition ou disparition d'une coloration ou encore apparition ou disparition d'un trouble). On peut détecter aussi le point de fin de titrage on emploie des appareils de mesure sensibles à certaines propriétés de la solution qui changent

d'une manière caractéristique au cours du titrage. Parmi les instruments, on peut citer les voltmètres, les ampèremètres, les colorimètres, les enregistreurs de température...etc.

1.2.3. Solutions étalons

Un étalon primaire est un composé de pureté suffisante duquel on peut préparer une solution étalon par pesée d'une certaine masse suivie d'une dilution jusqu'à obtenir un volume donné de solution. La solution préparée est alors une **solution étalon primaire**.

Cette solution étalon primaire sert ensuite pour réaliser les solutions étalon **secondaire**, **tertiaire**,... Les titres de ces solutions sont déterminés à partir de celui de la solution standard d'origine.

La solution étalon idéale doit :

- Etre assez stable pour qu'il soit inutile de réévaluer sa concentration ;
- Réagir rapidement avec l'analyte afin de minimiser les durées d'attente entre les addition successives de réactif ;
- Réagir de manière quasi-complète avec l'analyte afin d'obtenir des points de fin de titrage corrects ;
- Réagir sélectivement avec l'analyte.

1.2.4. Calcul volémtrique

La concentration des solutés est exprimée de plusieurs manières : concentration massique, concentration molaire, normalité, pourcentage, etc.

1.2.5. Classification des analyses titrimétrique

a. Titrage acido-basique

Cette classe comprend les titrages de bases fortes ou faibles à l'aide d'un acide étalon (acidimétrie), ainsi que les titrages d'acides forts ou faibles avec une base étalon (alcalimétrie).

Exemple : Détermination de l'acidité titrable du lait

L'acidité titrable du lait est exprimée en gramme d'acide lactique par litre de lait (Degré Dornic, **1° D (Dornic) = 0,1 g** d'acide lactique par litre du lait). C'est un titrage de l'acidité par l'hydroxyde de sodium en présence de phénolphtaléine comme indicateur.

➤ **Mode opératoire**

- Dans un bécher introduire 10 ml de lait prélevé à la pipette ;
- Ajouter dans le bécher quatre gouttes de la solution de phénolphtaléine (1%),
- Titrer par la solution d'hydroxyde de potassium (NaOH) 0.1N jusqu'à virage au rose, facilement perceptible par comparaison avec un témoin constitué du même lait ;

- On considère que le virage est atteint lorsque la coloration rose persiste pendant une dizaine de secondes.

➤ **Lecture**

$$AT = V \times 10^{(°D)}$$

AT: Acidité titrable

V: le volume en ml correspond à la chute de la burette.

b. Titrage complexométrique

C'est le titrage basé sur la formation de complexe. Un complexe est un polyatomique constitué d'un atome ou d'un cation central (Cu^{2+} , Fe, Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ni, Ni^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} ..etc.) auquel sont liés des molécules ou des ions appelés ligands : $[\text{FeF}_3]$.

L'ion éthylènediaminetétraacétate (E.D.T.A.), est un ligand hexadentate très important et le plus utilisé. Il est utilisé en pour doser par exemple les cations Ca^{2+} , Mg^{2+} .

Exemple : Dosage du Calcium dans l'eau à l'aide de l'EDTA

Dans une fiole conique de 250 mL, introduire successivement : eau à analyser 50 mL solution d'hydroxyde de sodium(2N) 2 mL, indicateur coloré (Murexide) 0,2 g environ.

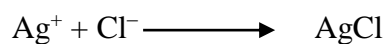
Ajouter la quantité de solution d'EDTA (0,02 N) nécessaire pour avoir un virage au bleu. Soit y le nombre de millilitres versés. Effectuer le dosage une deuxième fois. Prendre la moyenne des deux résultats. Soit V le volume ainsi déterminé.

c. Titrage par précipitation

Il repose sur la combinaison d'ions sous forme d'un précipité simple.

Exemple : Dosage des chlorures dans l'eau (méthode de Mohr)

Les chlorures sont dosés en milieu neutre par une solution titrée de nitrate d'argent en présence de chromate de potassium. La fin de la réaction est indiquée par l'apparition de la teinte rouge caractéristique du chromate d'argent.



➤ **Mode opératoire**

Introduire 100 mL d'eau à analyser. Ajouter 2 à 3 gouttes d'acide nitrique pur puis une pincée de carbonate de chaux et 3 gouttes de solution de chromate de potassium à 10 %. Verser alors au moyen d'une burette la solution de nitrate d'argent (0,1 N) jusqu'à apparition d'une teinte rougeâtre, qui doit persister 1 à 3 minutes.

Soit V le nombre de millilitres de nitrate d'argent 0,1 N utilisés.

➤ **Lecture**

Pour une prise d'essai de 100 mL :

$V \times 10 \times 3,55$ donne la teneur en chlorures, exprimée en milligrammes de Cl^- par litre d'eau.

d. Titrage d'oxydoréduction

sont toutes les réactions impliquant des changements de nombre d'oxydation ou des transferts d'électrons entre les substances. Les solutions étalons sont des solutions soit d'agents oxydants soit d'agents réducteurs.

Exemple : Titrage du Fe^{2+} avec Ce^{4+}

Le titrage de $V_1 = 20$ mL de solution de sulfate de Fer Fe^{2+} de concentration initiale en ions Fe^{2+} , $C_1 = 0,05$ mol/L par une solution de sulfate de cérium Ce^{4+} de concentration initiale en ions Ce^{4+} , $C_2 = 0,05$ mol/L.

2. Méthodes physico-chimiques

2.1. pH-métrie

2.1.1. Définition

Les méthodes analytiques basées sur les mesures de potentiel sont appelées méthodes **potentiométriques**. Tout dosage potentiométrique comprenant la mesure du pH repose sur une mesure de différence de potentiel dans des conditions de courant nul, entre deux électrodes qui plongent dans une solution de l'échantillon.

Chaque électrode constitue une demi-pile. On distingue :

- L'électrode de référence extérieure, qui forme une demi-cellule électrochimique de référence, dont le potentiel est connu et constant par rapport à celui de la solution échantillon.
- L'électrode Indicatrice qui comporte une électrode de référence interne baignant dans une solution de l'analyte faisant l'objet du dosage et servant de référence. Cette électrode est séparée de la solution échantillon par une paroi appelée membrane, perméable si possible.

La chaîne de mesure ainsi réalisée est donc la suivante :

Electrode de référence – Jonction électrolyte – Solution d'analyte – Electrode indicatrice

L'électrode de référence est toujours raccordée à la borne négative. Au contact de la solution d'analyte, l'électrode indicatrice développe par rapport à l'électrode de référence, un

potentiel qui dépend de l'activité de l'analyte. La jonction électrolyte interdit que les constituants de la solution d'analyte ne se mélangent avec ceux de l'électrode de référence.

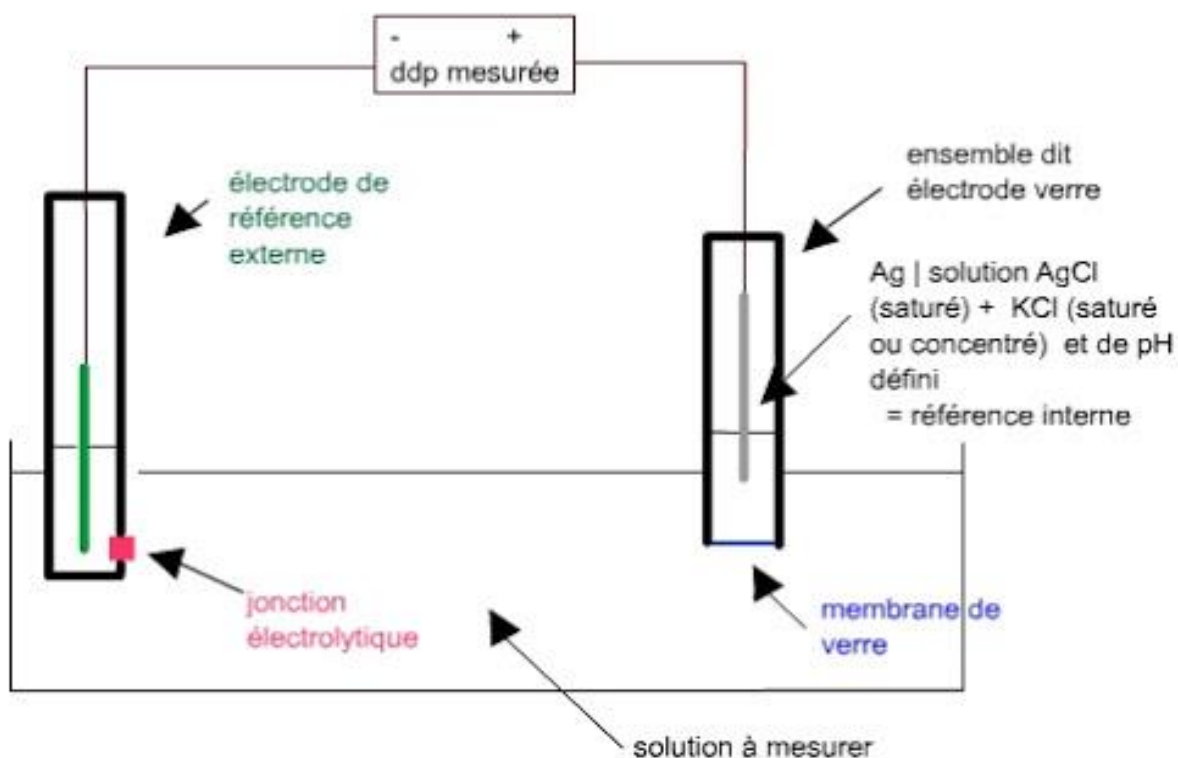


Figure 8. Structure schématique d'une chaîne de mesure électrométrique du pH à l'aide d'un ensemble pH_m métrique à l'électrode de verre.

2.1.2. Electrodes

a. Electrodes de référence

l'électrode de référence idéale possède un potentiel constant, connu avec exactitude et absolument indépendant de la composition de la solution d'analyte.

- **Electrode au Calomel saturée:** l'électrode au calomel saturée en chlorure de potassium (KCl) est composée de mercure métallique (Hg) en contact avec du calomel Hg_2Cl_2 lui-même en équilibre avec une solution de KCl.
- **Electrode de référence argent-chlorure d'argent Ag / AgCl :** un fil d'argent recouvert de chlorure d'argent baignant dans une solution de chlorure de potassium.

b. Electrodes indicatrices

b.1. Electrodes métalliques : classées en électrodes de première espèce (en équilibre direct avec son cation présent en solution), électrodes de deuxième classe (répondent à leurs propres cations ainsi des anions), électrodes métalliques inertes indicatrices de systèmes rédox (un conducteur inerte tel que le platine, l'or, le carbone...).

b.2. Electrodes à membrane

Electrode de verre indicatrice de pH : constitué d'une membrane de verre mince répondant aux ions H^+ . Le verre le plus utilisé est le verre Corning 015, constitué d'environ 22% de Na_2O , 6% de CaO et 72% de SiO_2 .

Electrode de verre indicatrice de cations autres que H^+ : tels que Na^+ , K^+ , NH_4^+

Electrode à membrane liquide : le potentiel se développe à travers l'interface entre la solution de l'analyte et un échangeur d'ions liquide.

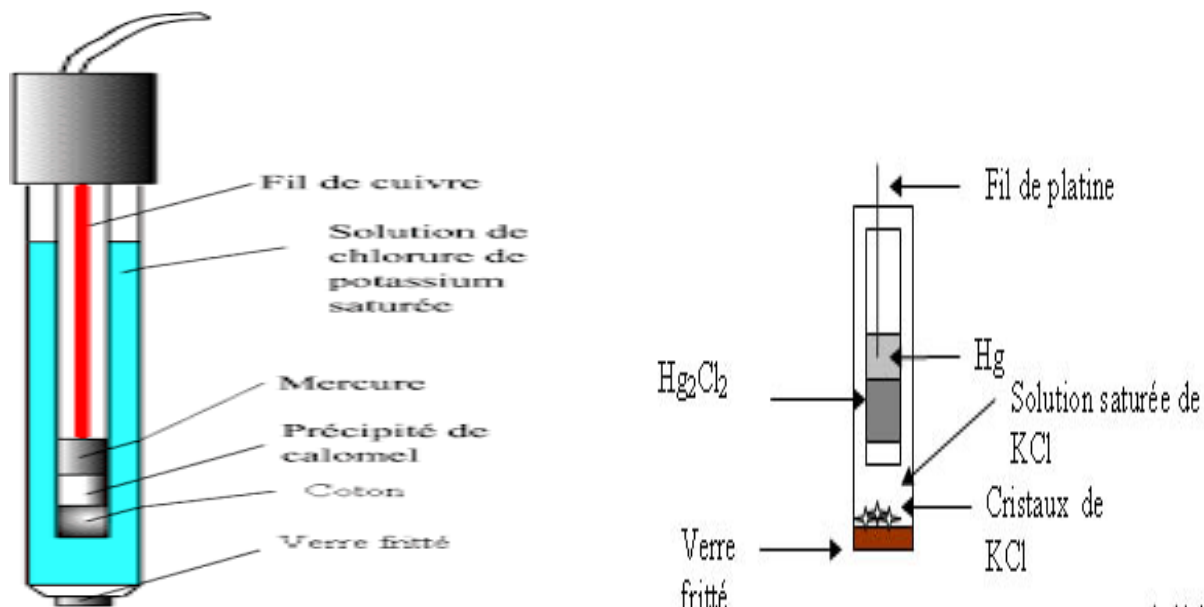


Figure 9. Electrodes utilisées dans la mesure du pH.

Electrode à membrane cristalline : une électrode solide. L'électrode de l'ion fluorure est le plus connu .

Electrode à Membranes polymériques : constituée par un film de polychlorure de vinyle (PVC) dans lequel est (ou sont) dispersé (s) un ou plusieurs transporteurs d'ions.

2.1.3. Analyse potentiométrique (pH mètre)

a. Appareillage

Les pH-mètres sont des voltmètres digitaux dont l'échelle de lecture a été adaptée aux mesures électrochimiques.

Avant de s'en servir, il faut contrôler la bonne marche du pH-mètre en mesurant deux solutions de pH connu (solutions étalons). Notez que l'électrode comporte une membrane de verre mince qui est très fragile. Faire attention à ce qu'elle ne touche pas la paroi du bécher. elle ne doit pas rester à l'air mais être plongée dans une solution saturée en KCl.

Le pH-mètre est étalonné avec des solutions standards de $\text{pH} = 4$ et $\text{pH} = 7$.

b. Analyse

b.1. Analyse directe

Cette technique ne nécessite que la comparaison de la tension d'une cellule comprenant l'électrode indicatrice plongeant dans la solution inconnue, avec celui pris lorsque l'électrode est au contact d'une solution étalon d'analyte de concentration connue.

b.2. Titrage

Tout titrage potentiométrique implique la mesure du potentiel d'une électrode indicatrice en fonction du volume de titrant ajouté. Ces titrages fournissent des données plus fiables que celles qui sont obtenues en utilisant des indicateurs chimiques. Ils sont utiles si la solution est colorée ou trouble.

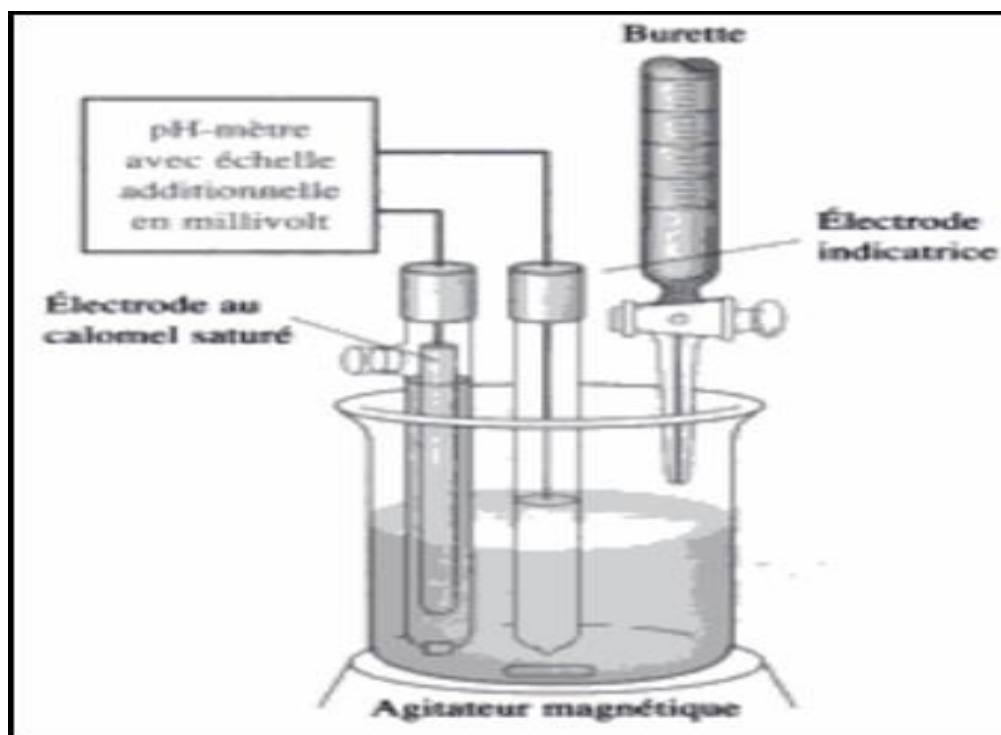


Figure 10. Méthode de titrage

Ils existent plusieurs méthodes pour déterminer le point de fin de titrage. La plus immédiate consiste simplement à tracer le graphique du potentiel en fonction du volume de réactif. Le point d'inflexion de la courbe est estimé visuellement et pris comme point de fin de titrage.

2.2. Conductimétrie

2.2.1. Définition

La conductimétrie est une technique d'analyse quantitative, permettant d'accéder aux concentrations des ions en solution. Cette technique est basée sur la connaissance de la conductivité σ de la solution, grandeur directement liée à la conductance G , mesurée avec un appareil appelé **conductimètre**.

2.2.2. Principe

a. Passage du courant au sein d'une solution

Lorsqu'un champ électrique \vec{E} est appliqué entre deux électrodes plongées dans une solution ionique, les ions migrent respectivement vers l'électrode de signe opposé, en entraînant leurs molécules d'eau d'hydratation. Les cations migrent dans le sens du champ, les anions dans le sens inverse. On rappelle qu'un courant électrique ne peut circuler dans une solution que si elle contient des ions. On appelle ces solutions des solutions **électrolytiques** ou **électrolyte**.

b. Conductivité d'une solution

En solution électrolytique, la conductivité électrique est la grandeur qui caractérise la facilité avec laquelle les porteurs de charge se déplacent sous l'effet d'une différence de potentiel. La conductivité σ d'une solution s'écrit sous la forme :

$$\sigma = \sum_i \lambda_i c_i$$

en siemens par mètre (S/m ou $\Omega^{-1} \cdot m^{-1}$). le siemens S étant le nom de l'unité Ω^{-1} .
où c_i est la concentration de l'ion i (exprimée en mol/L) et λ_i est sa conductivité molaire ionique (exprimée en $S \cdot m^2/mol$).

c. Conductivité molaire ionique

La conductivité molaire ionique λ_i rend compte de la capacité qu'a l'ion i en particulier à se déplacer lorsqu'il est soumis à une différence de potentiel. Elle dépend de la température et du solvant mais varie aussi avec la concentration de l'espèce i .

$$\lambda_i = z_i \mu_i F$$

z_i le nombre de charge (grandeur arithmétique sans signe), et μ_i la mobilité (en $m^2/S \cdot V$) ; F est la constante de Faraday ($F = 96485 \text{ C/mol} \approx 96500 \text{ C/mol}$).

À grande dilution, les ions sont suffisamment éloignés les uns des autres pour ne pas exercer d'interactions mutuelles. La conductivité molaire possède alors, pour un ion donné, sa

valeur maximale, appelée **conductivité molaire à dilution infinie**, et symbolisée par λ^0 . Quand la solution n'est plus une solution infiniment diluée, mais une solution réelle, la conductivité molaire des ions diminue.

d. Résistance et conductance

On considère la colonne de liquide entre les deux plaques de la cellule. Il est possible de mesurer la résistance électrique de cette portion de liquide. On mesure l'intensité du courant passant entre les deux plaques et la tension entre les deux plaques et on accède à :

$$\mathbf{R} = U/I \text{ mesurée en Ohm } (\Omega)$$

I : intensité du courant en Ampère (A).

U : Tension entre les plaques en volt (V).

La conductance est donnée par l'inverse de cette résistance :

$$\mathbf{G} = 1/R = I/U$$

La conductivité est reliée à la conductance par les paramètres géométriques définissant le volume de solution contenue entre les plaques :

$$\mathbf{\sigma} = \mathbf{G} \times L/S$$

S : surface des plaque en m²

l : distance entre les plaques en m

On relie donc σ à G par une constante **K** appelée **constante de cellule** (exprimée en m⁻¹) et dont il convient de déterminer expérimentalement la valeur : $\sigma = \mathbf{K} \mathbf{G}$

2.2.3. Dosage conductimétrique

a. Conductimètre

Un conductimètre est un **ohmmètre** modifié qui détermine la résistance **R** du volume de solution contenue entre les deux plaques. Pour cela, il impose une différence de potentiel entre les plaques. Cette tension imposée est alternative (d'une fréquence de quelques centaines de Hz) pour éviter la polarisation des plaques. Elle doit, par ailleurs, être faible pour ne pas électrolyser les espèces contenues dans la solution.

b. Cellule conductimétrique

Une cellule conductimétrique est constituée de deux plaques parallèles recouvertes de noir de platine qui est du platine métallique finement divisé afin d'augmenter la surface active des

plaques. Ces deux plaques ont une surface S (d'environ 1 cm^2) et sont séparées par une distance L (d'environ 1 cm).

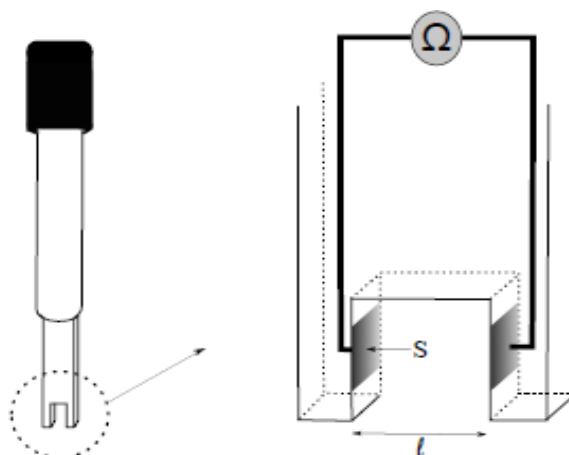


Figure 11. Schéma d'une cellule conductimétrique (à gauche) et zoom sur les plaques (à droite).

c. Etapes de la mesure

Étalonnage de la cellule de conductivité

L'opération d'étalonnage du conductimètre consiste à déterminer la valeur de la constante de cellule K qui relie σ à G . Pour cela, on mesure la conductance d'une solution de chlorure de potassium KCl de concentration connue.

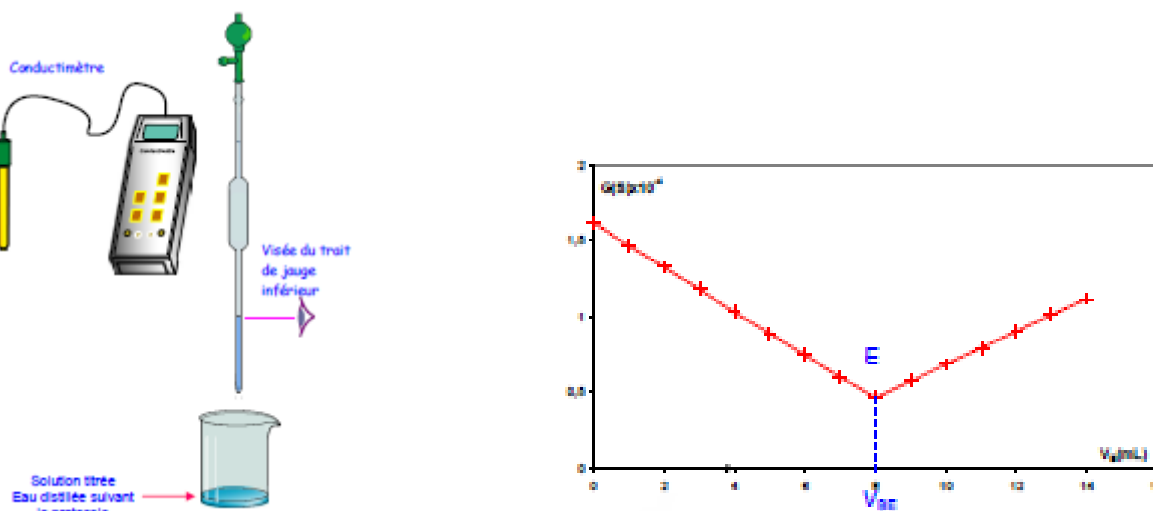
La mesure directe

- ✓ Ôter délicatement le manchon de plastique protégeant la cellule conductimétrique.
- ✓ Rincer la cellule à l'eau distillée.
- ✓ À l'aide d'un morceau de papier absorbant, enlever au mieux l'eau contenue entre les deux plaques afin de ne pas polluer les autres solutions.
- ✓ Plonger la cellule conductimétrique dans la solution à analyser qui est laissée au repos sans agitation pour ne pas perturber les lignes de champ électrique par des mouvements de convection forcée.
- ✓ Placer la cellule au centre du récipient pour éviter la distorsion des lignes de champ près des parois. Veiller aussi à ce qu'aucune bulle d'air ne soit piégée entre les plaques.
- ✓ Une fois la valeur affichée par le conductimètre stabilisée, la noter puis enlever la cellule de la solution, la rincer à l'eau distillée et remettre le manchon protecteur.

Titrage conductimétrique

Lors d'un titrage conductimétrique, la solution est homogénéisée après chaque ajout de réactif titrant. L'agitation est cependant coupée avant chaque mesure conductimétrique. A

chaque ajout, relever dans un tableau le volume V de solution titrante versée et la conductivité. Représenter graphiquement l'évolution $\sigma = f(V)$. La représentation graphique est constituée de deux segments de droite : leur intersection détermine le point d'équivalence.



2.3. Polarographie

2.3.1. Définition

La polarographie, ainsi nommée par son inventeur nobélisé J. Heyrovsky (1922), est à l'origine d'un grand nombre de techniques électroanalytiques dont la voltampérométrie. C'est une méthode d'analyse qui consiste à étudier électrochimiquement des composés en solution, au moyen d'une électrode indicatrice à goutte de mercure. Elle se différencie de la voltampérométrie, essentiellement par la nature de l'électrode puisque les méthodologies sont bien souvent identiques.

2.3.2. Principe

Il consiste à enregistrer les courbes de polarisation d'une substance sur une électrode de mercure. La courbe représentant la variation du courant en fonction des potentiels appliqués entre les électrodes représente « le polarogramme ».

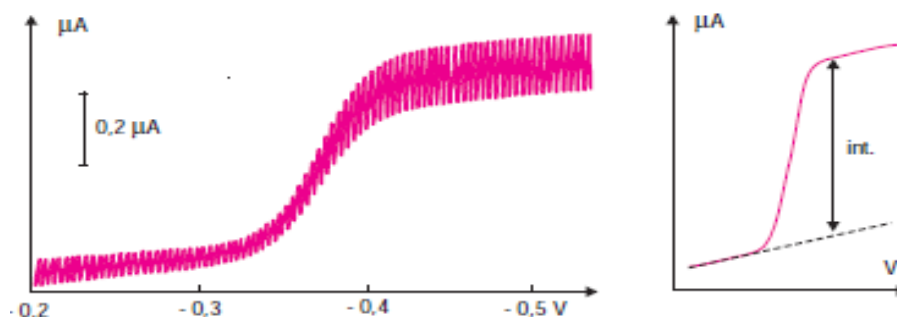
Le polarogramme permet de déterminer les grandeurs caractéristiques de la méthode qui sont :

- L'intensité limite I_L .
- Le potentiel de demi- vague $E_{1/2}$.

En présence d'un composé électro actif dans la solution, le courant augmente rapidement lorsque le potentiel arrive à une valeur seuil capable de réduire ou oxyder la substance. La courbe obtenue se présente sous une forme sigmoïdale (une courbe en « S

») qui est appelée vague polarographique. La hauteur de la vague est proportionnelle à la concentration et le potentiel de la vague est représentatif du composé électrolysé .

Ce potentiel est défini par le « potentiel de demi-vague » c'est-à-dire le potentiel auquel le courant atteint la moitié de sa valeur limite. et chaque espèce est caractérisé par ce potentiel de demi vague.



La vague polarographique.
Polarogramme d'une solution à 10 ppm de Pb^{2+} dans KNO_3 0,1 M, obtenu avec une électrode à goutte de mercure croissante. La position médiane de la vague (ici -0,35 V) est caractéristique du plomb et la hauteur du palier, de sa concentration.

Figure 13. Allure générale d'un polarogramme.

2.3.3. Avantages et inconvénients

Les spécificités propres à l'électrode à goutte de mercure comparées aux électrodes conductrices solides viennent des propriétés particulières de ce métal qui, liquide à température ambiante, permet un renouvellement de la surface active de l'électrode, qui conduit aisément à la formation d'un certain nombre de mélanges avec les métaux et qui permet des réductions à des potentiels très négatifs. En oxydation, par contre, l'exploration des potentiels en polarographie est limitée par l'oxydation du mercure, ce qui explique qu'une grande partie des applications a concerné des composés électroréductibles. Cette étendue des potentiels d'exploration est naturellement influencée par le pH, le solvant, ceux-ci pouvant limiter cette étendue.

Un autre avantage important du mercure réside dans le fait qu'à chaque goutte correspond une nouvelle électrode, identique à la précédente du point de vue géométrique, mais ne gardant pas mémoire du phénomène électrochimique ayant affecté les gouttes antérieures.

2.3.3. Electrodes de mercure

a. L'électrode à goutte de mercure (EGM), formée à l'extrémité d'un capillaire : elle peut être stationnaire, électrode de mercure à goutte pendante ou électrode de mercure à gouttes tombantes.

- **L'électrode de mercure statique** : le mercure est contenu dans un réservoir plastifié situé à environ 15 cm au dessus de l'extrémité du capillaire. Un ressort de compression pousse un piston contre la tête du capillaire ce qui bloque l'écoulement du mercure. Ce piston est soulevé lors de l'activation du solénoïde par une impulsion électrique.
- **L'électrode de mercure à goutte pendante** : est constituée d'un capillaire très fin relié à un réservoir de mercure. Le mercure est déplacé hors du capillaire à l'aide d'un piston commandé par une vis ce qui permet la formation de gouttes.
- **L'électrode de mercure à gouttes tombantes** : est constituée d'un capillaire étroite d'environ 10 cm à travers lequel le mercure est propulsé gravitationnellement par une colonne de mercure d'environ 50 cm.

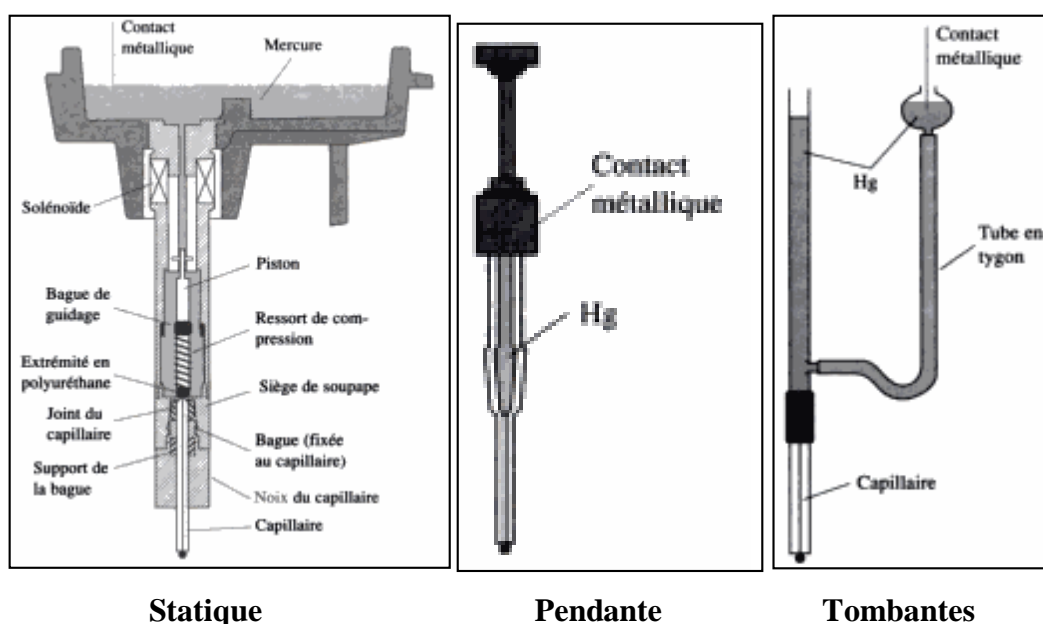


Figure 14. Electrodes de mesure statique, pendante et tombantes.

b- L'électrode à film mince de mercure : obtenue par dépôt électrochimique d'un film mince de mercure sur une électrode solide.

2.3.4. Techniques polarographiques

L'analyse polarographique est basée sur les courbes temps-courant ou même potentiel-courant.

a. Polarographie classique

Utilisée pour des concentrations de 10^{-3} à 10^{-5} mol/L. elle regroupe :

- **Polarographie à courant direct (DCP)** : en faisant varier le potentiel à l'EGM à faible vitesse des potentiels ($1 < v < 10$ mV /s), le polarogramme enregistré en DCP présente des oscillations causées par la croissance et la chute de la goutte à intervalle de temps régulier.
- **Polarographie à courant direct échantillonné (DCTP)** : afin d'éliminer les oscillations de courant dues à la croissance de la goutte de mercure et sa chute, le courant peut être enregistré uniquement à la fin de la vie de la goutte pendant un temps faible (t_m) de 1 à 100 ms.

b. Polarographie à impulsions :

- **Polarographie impulsionnelle normale (NPP)** : pour éliminer l'aspect dentelé du polarogramme classique, on remplace le courant direct (continu) par une série de brèves impulsions de potentiel (entre 50 à 100 ms), dont les valeurs vont en croissant mais commençant à une même tension de base qui ne provoque pas de réaction redox sur l'analyte. Ces impulsions sont produites au rythme forcé du renouvellement des gouttes de mercure. Une seule mesure de l'intensité est faite juste avant la chute de chaque goutte.
- **Polarographie impulsionnelle différentielle (DPP)** : on applique à l'électrode de mercure une tension qui correspond pour chacune des gouttes de mercure successives à une impulsion de même amplitude (50 mV). Chaque goutte, en fin de vie, fait l'objet de deux mesures d'intensité, la première juste avant l'impulsion et la seconde avant qu'elle ne tombe.

c. Méthodes de redissolution

Utilisée pour des concentrations en traces 10^{-10} à 10^{-11} mol/L. L'analyte est déposé sur une microélectrode (goutte de mercure). Après un laps de temps bien défini, l'analyte est dosé. Au cours de cette deuxième étape, l'analyte est redissous et détaché de la microélectrode. On distingue les méthodes de redissolution anodique, la microélectrode se comporte en tant que cathode durant l'étape de réduction et en tant qu'anode durant l'étape de redissolution. Pour les méthodes de redissolution cathodique, la microélectrode se comporte en tant qu'anode pendant de l'étape de déposition et en tant de cathode pendant l'étape de redissolution.

Chapitre III.

Méthodes Physiques d'analyses

1. Méthodes spectrophotométriques : UV- Visible

Le terme spectroscopie se référait à une branche scientifique où la lumière (le rayonnement visible) était décomposée selon ses différentes longueurs d'ondes pour engendrer des spectres c-à-d des graphiques d'une fonction de l'intensité du rayonnement en fonction de la longueur d'onde ou de la fréquence. Au cours du temps, la signification du terme spectroscopie s'est élargie pour inclure des études relatives non seulement à la lumière, mais également aux autres types de rayonnement électromagnétique, tels que les rayons X, le rayonnement UV, le rayonnement infrarouge, les micro-ondes et les ondes radio. L'usage courant étend même le domaine des méthodes spectroscopiques encore plus loin, jusqu'à y inclure des techniques qui n'impliquent pas de rayonnement électromagnétique, comme la spectroscopie acoustique et la spectroscopie de masse.

1.1. Rayonnement électromagnétique

Le rayonnement électromagnétique, dont la lumière est un exemple, est une forme d'énergie (**photons**) constituée d'ondes, c'est-à-dire de phénomènes vibratoires caractérisés par : **une vitesse de propagation** (en l'occurrence $c = 3.10^8$ m/s, 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 :

$$\lambda = c / \nu$$

L'énergie d'un rayonnement électromagnétique est reliée à sa fréquence par la relation

$$E = h \nu$$

h: constante de Planck = $6,624.10^{-34}$ j/s

A chacun des domaines particuliers du rayonnement électromagnétique, on distingue:

Des γ (gamma) et des **RX** (rayons X), le rayonnement est extrêmement énergétique et il va pouvoir affecter les électrons des orbitales atomiques de coeur. 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 (externes). 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.

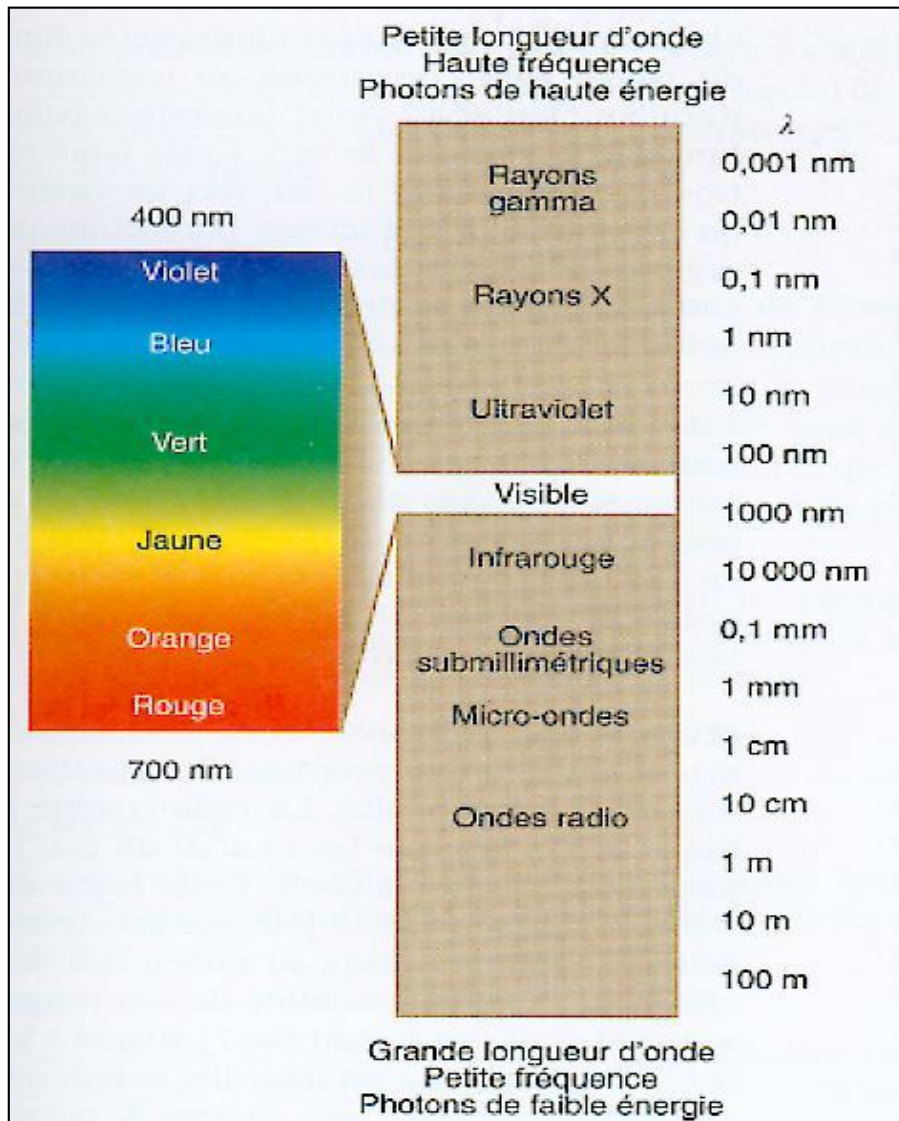


Figure 15. Domaines particuliers du rayonnement électromagnétique

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.

1. 2. 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'oeil a été remplacé par différents types de détecteurs photoélectriques 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). Le **spectre** est la distribution en énergie, puissance, intensité, absorbance, transmission, etc (signal) 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).
- ✓ 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.
- ✓ Les **spectres combinés** qui sont constitués d'une superposition d'un spectre continu et d'un spectre discret.

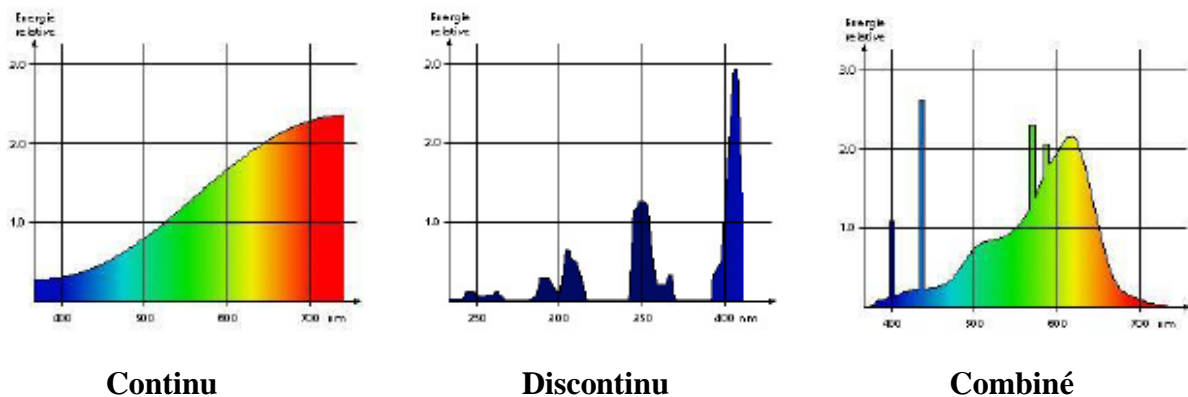


Figure 16. Différents type de spectres

1.3. 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.
- ✓ **Absorption** : l'énergie d'un rayonnement peut être absorbée par la matière.

1.4. Spectrométrie d'émission atomique

Les atomes n'émettent un rayonnement que si on les soumet à une excitation. Celle-ci peut se réaliser par **chauffage** ou par l'action d'un **champ électrique**. 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. 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 oeuvre :

Si l'**excitation est d'origine thermique** (flamme,...) ou **électrique**, l'énergie mise en oeuvre est relativement limitée et les raies émises se situent 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).

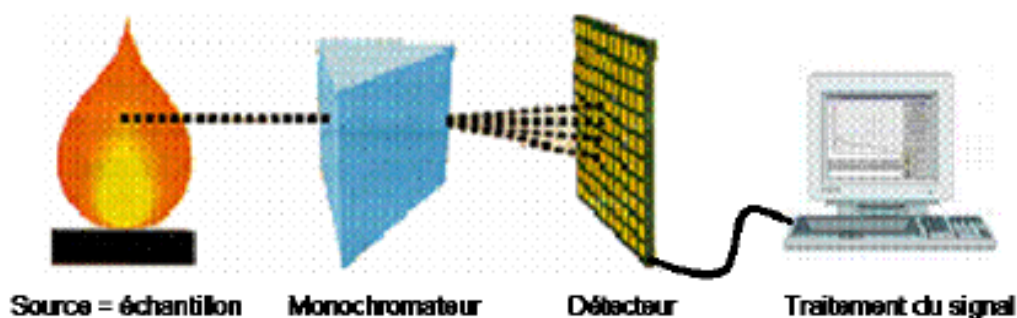


Figure 17. Schéma général d'un spectromètre d'émission atomique

Une source (échantillon) excitée par une flamme;

Monochromateur est un dispositif utilisé en optique pour sélectionner une gamme la plus étroite possible de longueurs d'onde à partir d'un faisceau lumineux de gamme de longueurs d'onde plus large et qui sert à 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).

Détecteur qui va convertir les impacts photoniques en impulsions électriques, qui seront ensuite traitées (**traitement du signal**).

Un atome excité thermiquement ou électriquement à un état **E2** émet une radiation de fréquence ν lorsqu'il revient à un état inférieur **E1**.

$$h.\nu = E2 - E1.$$

1.5. Spectrométrie d'absorption atomique

L'intensité d'une onde lumineuse de longueur d'onde λ traversant un échantillon homogène qui absorbe à cette longueur d'onde, diminuera progressivement pendant toute la durée de son trajet à travers l'échantillon. L'absorption du photon (de même énergie) fait passer l'atome de l'état E1 à l'état E2 (d'énergie supérieure).

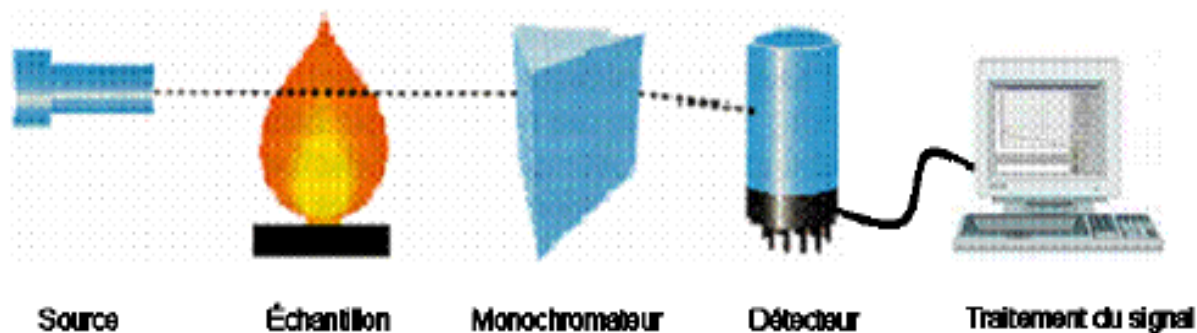


Figure 18. Schéma général d'un spectromètre d'absorption atomique

1.6. Spectrométrie UV – Vis

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 porteurs de tels électrons.

Dans la majeure partie des cas, les spectres UV-visibles sont continus et constitués de bandes larges qui correspondent à la superposition de transitions électroniques (fortement énergétiques), vibrationnelles (faiblement énergétiques) et de transitions rotationnelles (très faiblement énergétiques).

La spectroscopie UV-Visible se réalise à l'aide d'un spectrophotomètre. Lorsque la cuve contenant la solution est placée dans un spectrophotomètre, elle reçoit un rayonnement d'intensité I_0 . une partie de cette lumière incidente notée I_0 est absorbée par le milieu et le reste, noté I , est transmis. L'intensité (I) du rayonnement issu de la cuve est donc inférieure à l'intensité du rayonnement initial (I_0). La fraction de la lumière incidente absorbée par une substance de concentration C contenue dans une cuve de longueur l est donnée par la **loi de Beer-Lambert** :

$$A = \log(I_0/I) = \epsilon l C$$

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.

1.7. Composition d'un spectromètre d'absorption moléculaire

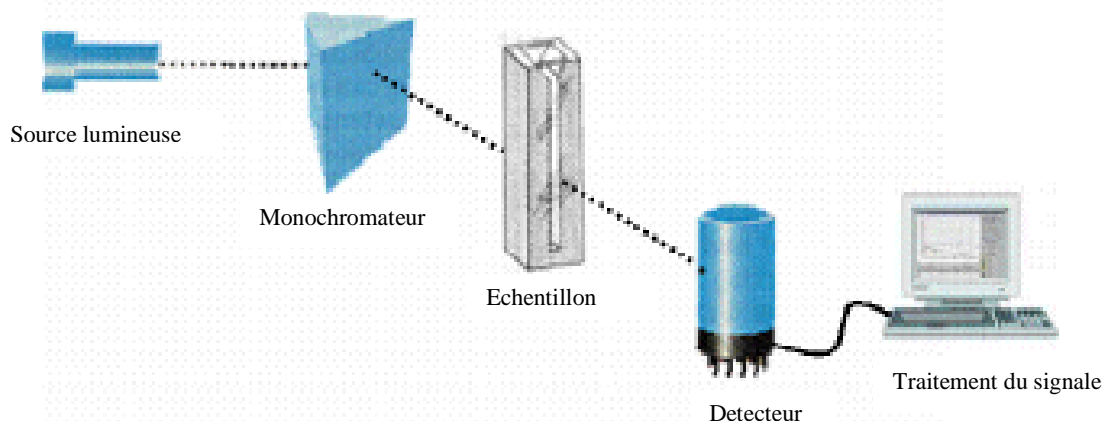


Figure 19. Composition d'un spectromètre d'absorption moléculaire.

- **Sources de rayonnement** : 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, Lampes à filament de tungstène.
- **Monochromateurs**
- **Échantillons** : le plus fréquemment, il s'agit de substances en solution. En général, on utilise des récipients (cellules) d'épaisseur fixe et calibrée (Cuve).
- **Détecteurs** : Photomultiplicateur.

1.8. Champs d'application de la spectroscopie UV-vis

❖ Analyse quantitative de substances simples absorbantes (dosage directe) :

- Composés organiques insaturés : Composés aromatiques dans l'eau (acide benzoïque, etc.) ; Composés naturels (vitamine A, carotène, etc.) ; Composés contenant des chromophores (chlorophylle, hémoglobine, etc.) ;
- Les métaux de transition : Cu^{+2} ;
- Certains composés inorganiques.

❖ Analyse quantitative de substances simples non absorbantes (dosage indirecte) :

- Formation d'un complexe coloré (ex. : dosage du Fe^{2+} avec l'orthophénantroline).
- Réaction transformant la substance à doser en une substance « colorée » (ex. oxydation de Mn^{2+} en MnO_4^-).

❖ Titration photométrique.

4.3. Méthodes d'analyse spectrophotométrique

Il existe plusieurs procédés pour déterminer une concentration par dosage UV-vis. On cite deux :

- ❖ **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 $A = f(C)$. On détermine, finalement, l'absorbance de la solution inconnue, puis on reporte cette valeur sur la droite d'étalonnage pour en déduire la concentration.

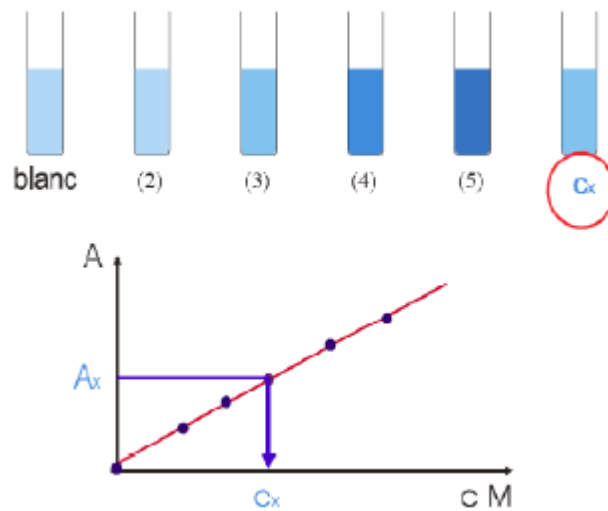


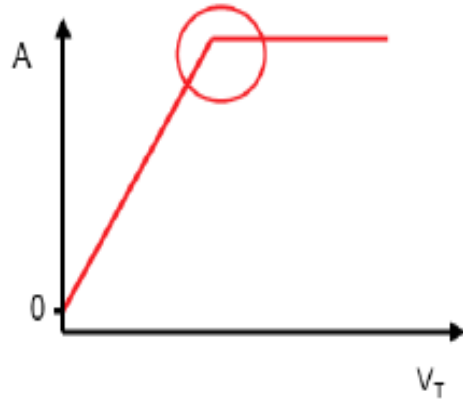
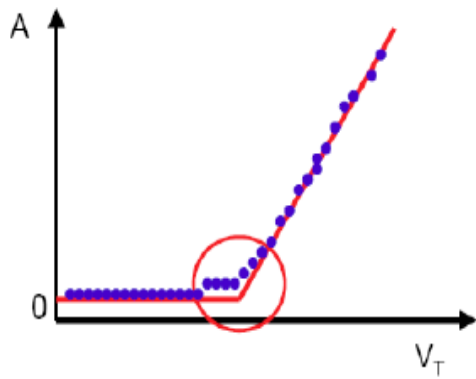
Figure 20. Méthode de la droite d'étalonnage.

- ❖ **Titration photométrique**

Le principe du titrage photométrique est identique à celui d'un titrage avec indicateur pH, 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 :

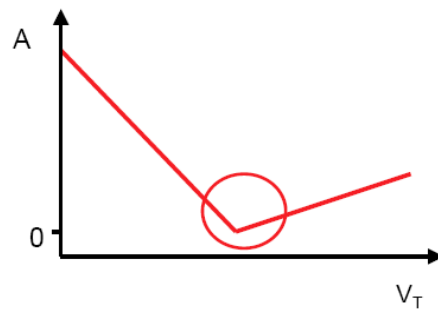
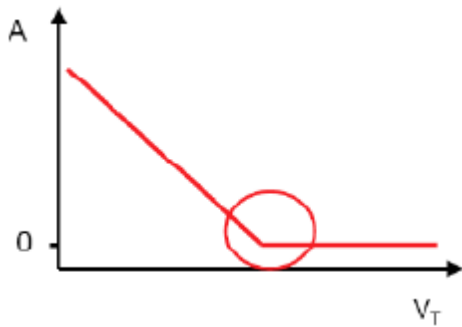
Cas 1. S et P n'absorbent pas et T absorbe

Cas 2. S et T n'absorbent pas et P absorbe



Cas 3. P et T n'absorbent pas et S absorbe

Cas 4. S et T absorbent et P n'absorbe pas



Cas 5. P et T absorbent et S n'absorbe pas

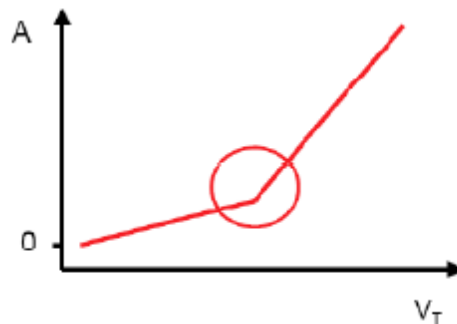


Figure 21. Différentes courbes de titrage photométrique

Exemple : Quelle est la concentration de l'acide amine tyrosine sachant qu'il a une absorbance de 0,70 obtenue à une longueur d'onde (λ) précise en utilisant une cuve de spectrophotomètre de 1 cm d'épaisseur. Le coefficient d'extinction molaire pour Lys (Epsilon) est $1\,420\text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). Quelle sera l'absorbance d'une solution de 0,35 mM de tyrosine?

La relation entre l'absorbance ou densité optique (DO) d'une solution et sa concentration (c) est donnée par l'équation de Beer-Lambert : $DO = \epsilon cl$, avec :

ϵ = coefficient d'extinction molaire (unités : $M^{-1} \times cm^{-1}$)

c = concentration (unité : mol/l = M)

l = trajet optique (épaisseur de la cuve; unité : cm)

Selon les données, on aura :

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

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

- La DO d'une concentration en Lys égale à 0,35 mM :

Equation de Beer-Lambert: $DO = \epsilon cl$

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

$$DO = 0,50.$$

2. Méthodes chromatographiques : Couche mince, CPG et HPLC

2.1. 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).

2.2. 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.

2.2.1. Chromatographies en phase liquide (CPL)

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

❖ 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).

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.

❖ **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, antigène-anticorps).

2.2.2. Chromatographies en phase gazeuse (CPG)

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.

2.3. Principaux constituants

2.3.1. 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 = HPLC).

2.3.2. 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.

2.4. Chromatographie Liquide à Haute Pression (HPLC)

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. C'est une technique extrêmement intéressante puisqu'elle permet l'étude de mélange dont les composants sont peu volatils ou qui se dégradent à haute température.

2.4.1. Instrumentation

Dans tous les appareils HPLC, 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'éluion. 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.

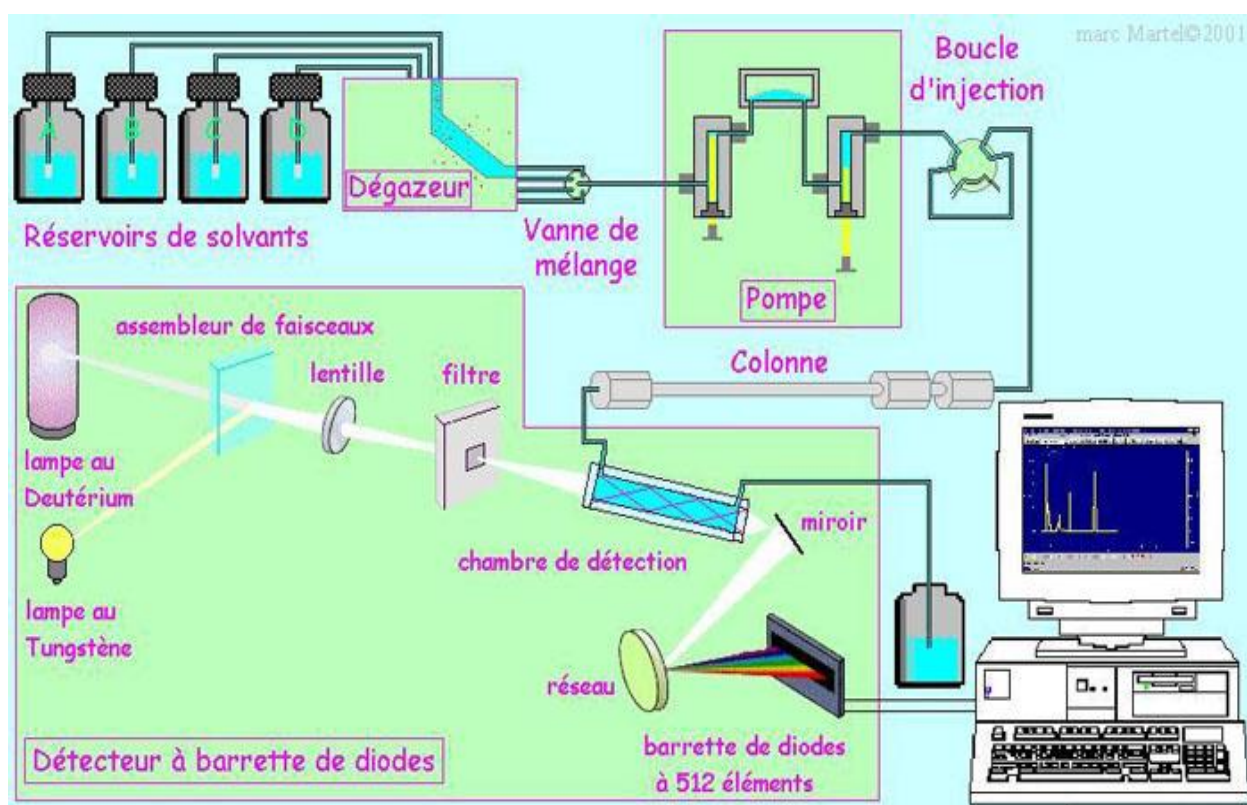


Figure 22. Principe de fonctionnement de l'appareil HPLC

2.4.2. Pompes

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. Les pompes actuelles permettent également un écoulement continu.

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. 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.
- ✓ **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.

2.4.3. Injecteur

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

Injection du solvant dans la boucle (tuyau métallique enroulé en boucle et de volume connu, typiquement de l'ordre de 10 μ l).

Injection de l'échantillon.

2.4.5. 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 μ m. La nature de la phase est fonction du type de chromatographie liquide que l'on souhaite réaliser (exclusion, adsorption, ...).

2.4.6. Détecteurs

Il existe en gros deux types de détections basés :

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

Les résultats sont obtenus sous forme de pics (chromatogramme) qui sont comparés par la suite à une base de données.

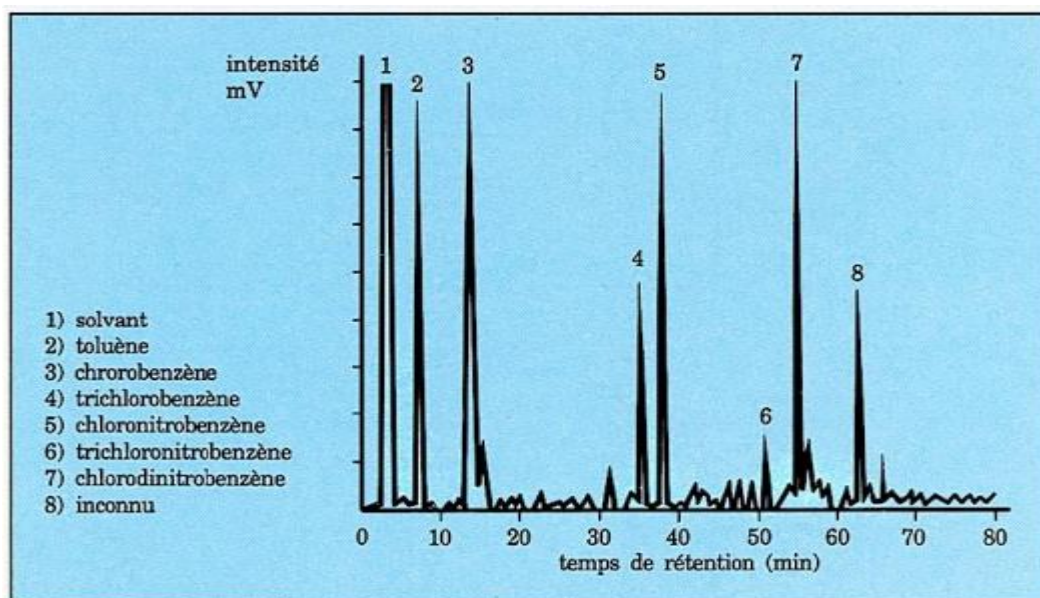


Figure 23. Chromatogramme HPLC (intensité mV en fonction de temps de rétention (min)).

2.4.7. Spectrométrie de masse (SM)

L'utilisation d'un couplage CG-SM permet le dosage des différentes familles de composés chromatographiables en phase gazeuse en utilisant un seul solvant d'extraction (ex.: le dichlorométhane) et une seule séparation chromatographique. Les composés sortant du chromatographe sont fragmentés par un bombardement d'électrons. L'ensemble des ions détectés (masse/charge) constitue le spectre caractéristique de la molécule. L'ordinateur vient au secours du technicien pour l'exploitation des spectres. Ce détecteur est le plus performant car il permet une identification des molécules même en cas de mauvaise séparation sur la colonne, d'où l'intérêt de la spectrométrie de masse par rapport aux détecteurs spécifiques.

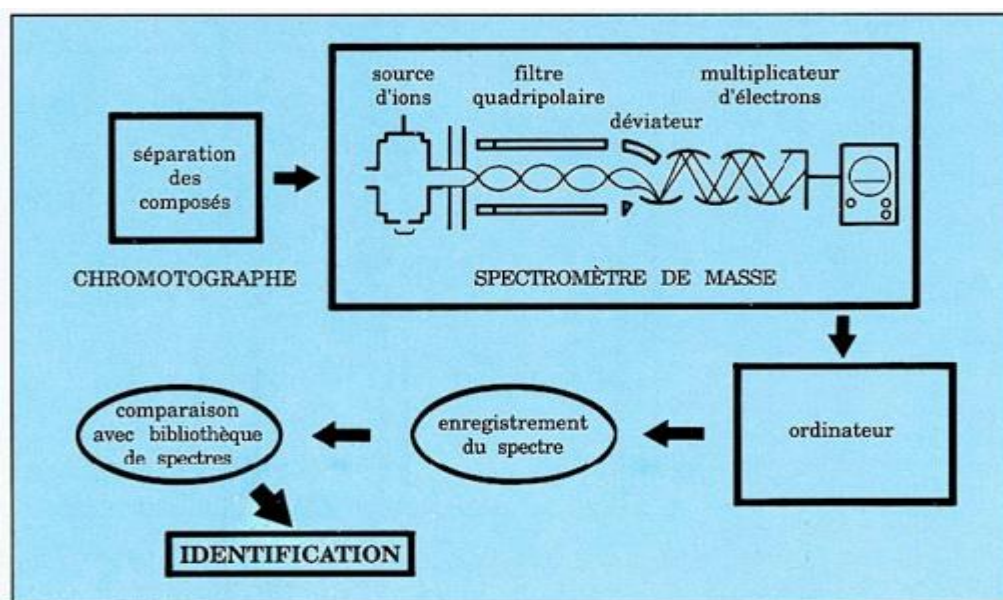
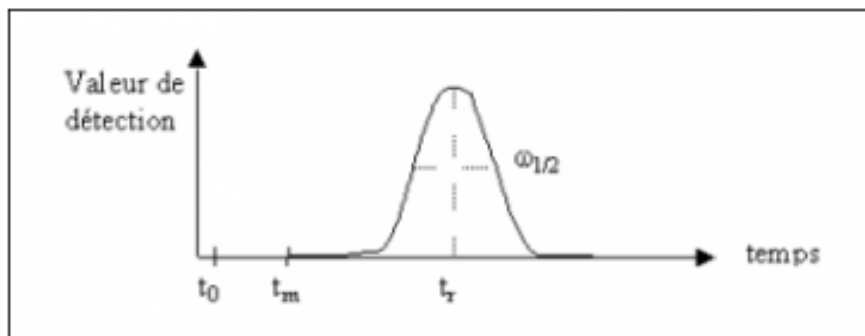


Figure 24. Principe de l'utilisation de spectrométrie de masse.

2.5. Notions fondamentale en chromatographie

❖ Notion de temps



t_0 est le temps du début de l'injection

- Le temps mort t_m est le temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire pour traverser la colonne (temps passé dans la phase mobile).
- Le temps de rétention t_r est le temps mis par un soluté pour traverser la colonne. C'est le temps passé dans la phase stationnaire et dans le volume mort de la colonne. Ce temps est caractéristique d'un soluté dans des conditions d'analyse donnée.

La surface du pic est en fonction de la quantité du constituant dont il est la trace.

- Le temps de rétention réduit t_r' est le temps passé par un soluté dans la phase stationnaire, soit

$$t_r' = t_r - t_m$$

❖ Notion de concentration

- Le coefficient de partage K :

A un instant donné, le soluté est à la concentration C_m dans la phase mobile et C_s dans la phase stationnaire. Leur rapport à l'équilibre est appelé coefficient de partage K .

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

❖ Notion d'efficacité

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

- le nombre de plateaux théoriques N_{th} :

$$N_{th} = 5,54 \left[\frac{t_r}{w_{1/2}} \right]^2$$

tr : temps de rétention

w 1/2 : largeur du pic à mi-hauteur

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

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

Question :

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

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

Lorsque le pH est supérieur au pHi ($\text{pH} > \text{pHi}$), l'acide aminé est chargé négativement (forme anionique).

Lorsque le pH est inférieur au pHi ($\text{pH} < \text{pHi}$), l'acide aminé est chargé positivement (forme cationique).

Le tableau ci-dessous donne les charges des 3 acides aminés, à pH = 2 et à pH = 7

<u>acide aminé :</u>	<u>pHi :</u>	<u>charge à pH = 2 :</u>	<u>charge à pH = 7 :</u>
Acide L-Glutamique (Glu)	3,22	+	-
L-Leucine (Leu)	5,98	+	-
L-Lysine (Lys)	9,74	+	+

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

A pH = 7, seuls Glu et Leu, chargés négativement, seront élués. Lys reste fixé à la colonne. Glu est élué en premier (pHi = 3,22) puis Leu (pHi = 5,98).

2.5. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

La chromatographie planaire, également connue sous le nom de chromatographie sur couche mince (CCM), est une technique complémentaire de la HPLC, ayant sa propre spécificité. Bien que la mise en oeuvre de ces deux techniques soit différente, le principe de la séparation et la nature des phases restent les mêmes. Méthode sensible, de faible coût, pouvant être automatisée, elle est devenue désormais indispensable sachant aussi qu'il est possible de mener plusieurs séparations en parallèle.

2.5.1.1. Mise en oeuvre de la CCM

La séparation par chromatographie planaire des constituants de l'échantillon est réalisée sur une fine couche (100–200 μm) de phase stationnaire, généralement à base de gel de silice, déposée sur une plaque rectangulaire de verre, de plastique ou d'aluminium, de quelques centimètres de côté. Pour maintenir la phase stationnaire sur le support et assurer la cohésion des particules, un liant organique est incorporé au cours de la fabrication de la plaque.

Le principe de la séparation entre phases est semblable à celui de la HPLC, mais la conduite de l'expérience de CCM est différente. On distingue trois étapes.

a. Dépôt de l'échantillon

On commence par déposer un petit volume (compris entre quelques nanolitres et plusieurs microlitres) de l'échantillon en solution diluée, à proximité du bord inférieur de la plaque sous forme d'une tache de 1 à 3 mm de diamètre. Ce dépôt est réalisé soit manuellement, soit de manière automatique, avec un capillaire à extrémité plane. La plaque ainsi préparée est introduite dans une cuve spéciale munie d'un couvercle, au fond de laquelle se trouve un peu de la phase mobile servant d'éluant. L'endroit où l'échantillon se trouve doit être situé au-dessus du niveau d'immersion.

b. Développement de la plaque

La phase mobile migre par capillarité à travers la phase stationnaire sèche, entraînant à des vitesses différentes les constituants à séparer. Le temps de migration (plusieurs minutes) dépend de divers paramètres. Quand le front de solvant a parcouru une distance considérée comme suffisante (quelques centimètres), on retire la plaque de la cuve, on repère la position limite atteinte par la phase mobile et on évapore cette dernière.

c. Révélation post-chromatographique

La localisation des composés après migration se fait sur la plaque débarrassée de l'éluant.

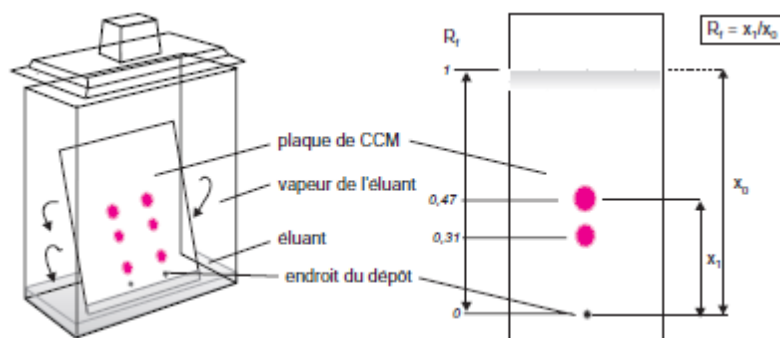


Figure 25. Principe de la chromatographie sur couche mince.

Les composés qui donnent des taches invisibles doivent être « révélés ». À cette fin la phase stationnaire contient un indicateur consistant en un sel de zinc qui émet une fluorescence verte lorsqu'on éclaire la plaque au moyen d'une lampe UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$). Tout composé qui absorbe à cette longueur d'onde apparaît sous forme d'une tache sombre (ou quelquefois colorée) sur un fond illuminé en vert.

Une autre méthode quasi universelle de révélation consiste à carboniser les composés en chauffant la plaque après l'avoir soumise à une pulvérisation d'acide sulfurique. Ce mode d'examen n'est cependant pas utilisable en CCM quantitative : on effectue, dans ce cas, la révélation par immersion dans des réactifs généraux (acide phosphomolybdique, vanilline), ou spécifiques (ninhydrine en solution alcoolique pour les acides aminés, par exemple). Plusieurs centaines de réactifs répertoriés servent à introduire des groupements chromophores ou fluorophores.

L'utilisation d'une plaque de forme carrée permet de faire de la chromatographie bidimensionnelle en procédant à deux éluations successives avec deux éluants différents. Une application typique de cette méthode est la séparation des acides aminés.

- ❖ Chaque composé est défini par R_f (le rapport frontal) qui correspond à sa migration relative par rapport au solvant :

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par le soluté}}{\text{Distance parcourue par le front de solvant}} = \frac{X}{X_0}$$

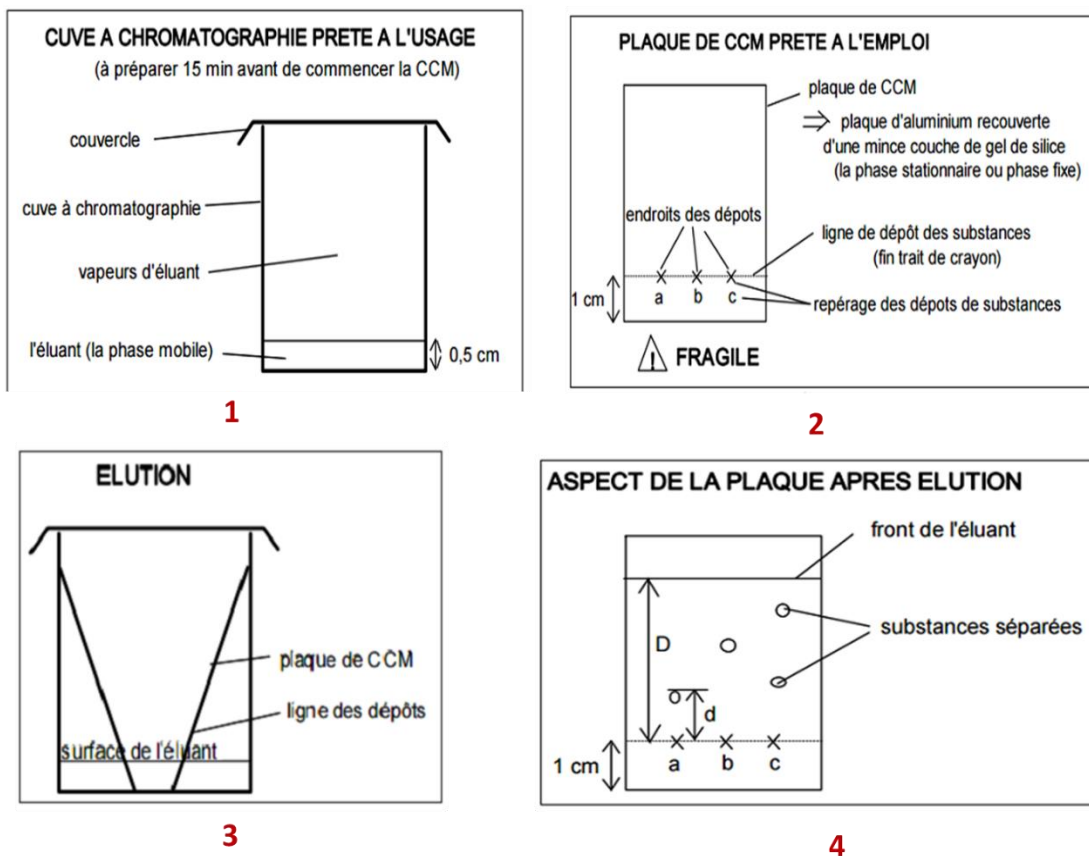


Figure 26. Différentes étapes de mise en oeuvre de la CCM.

Exemple :

On a réalisé la chromatographie de deux échantillons d'une référence. L'exploitation du chromatogramme a. fournit les résultats suivants :

- Front du solvant H= 8,0 cm
- échantillon A : deux taches situées à 3,0 cm et 4,0 cm de la ligne de base
- échantillon B une tache située à 5,0 cm de la ligne de base
- référence le menthol M : $R_f = 0,5$

a) faire le schéma du chromatogramme

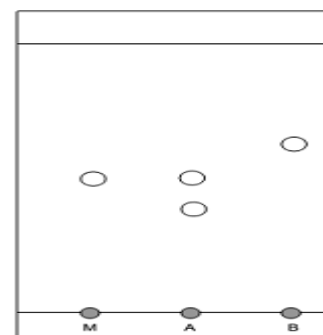
il faut déterminer la position de la tache de la référence ici le menthol à partir de son rapport frontal.

$R_f = h/H$ on en déduit $h = R_f \times H$

soit pour la tache unique du menthol M $h = 0,5 \times 8,0 = 4,0$ cm

Ce qui nous permet de construire le chromatogramme ci contre

b) La chromatographie a-t-elle mis en évidence des espèces chimiques pures ?



Ces espèces chimiques pures correspondent aux dépôts ayant donné qu'une seule tache après élution

M est évidemment un corps pur ainsi que B

c) Les échantillons A et B renferment-ils du menthol ?

Le dépôt A donne une tache située au même niveau que celle issue de M cette tache est donc du menthol.

Le dépôt a renferme donc bien du menthol.

2. 6. Chromatographie en phase gazeuse

2.6.1. Chromatographie gaz-liquide (partage)

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

2.6.2. 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.

2.6.3. Instrumentation

Un appareil de CPG comporte trois parties : injecteur, colonne et détecteur à travers lesquels un gaz vecteur entraîne les substances d'un mélange à séparer. Le gaz 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.

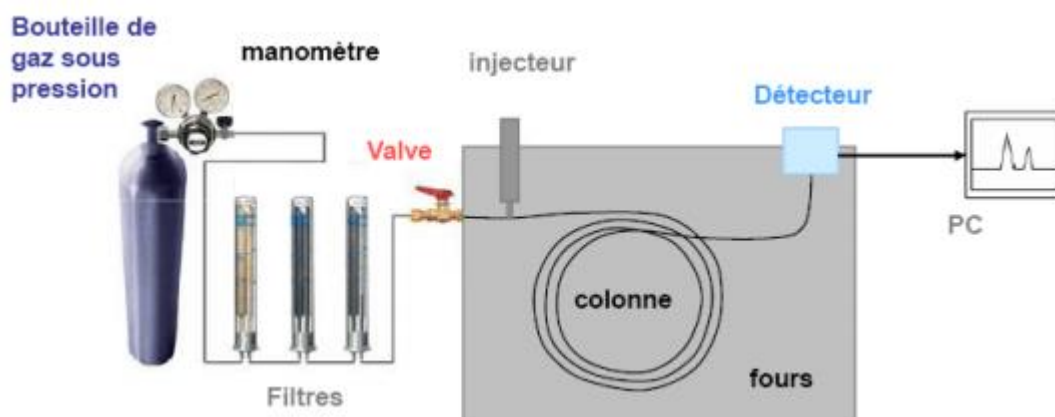


Figure 27. Schéma d'une chromatographie en phase gazeuse.

Echantillons

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 estérifiées par le butanol, les acides gras estérifiés par le méthanol,...

Injecteur

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

- A l'aide d'une microsiringue pour les liquides et les solutions.
- A l'aide d'une vanne à boucle pour les gaz.

En règle générale, la chambre d'injection doit être à température supérieure 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.

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).

Les détecteurs

Détecteur à ionisation de flamme (FID) : des ions sont formés par la flamme provenant de la combustion de l'hydrogène dans l'air. Si une substance organique est présente dans cette flamme, le nombre d'ions formés augmente. La réponse du détecteur FID est proportionnelle à la masse du soluté qui passe dans le brûleur.

Détection par spectrométrie de masse.

Exemple : Deux espèces chimiques, A et B sont séparées par chromatographie gazeuse isotherme, à l'aide d'une colonne de 2,00 m ayant 5000 plateaux théoriques au débit de 15,0 ml/min. Le pic de l'air non absorbé apparaît au bout de 30 s ; le pic de A apparaît au bout de 5 min et celui de B au bout de 12 min.

- (a) Calculer le volume mort V_M de la colonne, et les volumes de rétention V_A et V_B ?
- (b) Calculer les volumes réduits $V'A$ et $V'B$?
- (c) Calculer les coefficients de rétention $k'A$ et $k'B$?
- (d) Quelles sont les largeurs à la base des pics A et B ?
- (e) Quelle est la valeur de H pour cette colonne ?
- (f) Déterminer la valeur de la sélectivité α de cette séparation ?
- (g) Calculer la résolution R de la séparation ?
- (h) Commenter brièvement les valeurs de k' et de R ?

Correction

- (a) Formule $V_i = t_i \cdot D$

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

- (b) Formule $V'i = t'i \cdot D$ soit $V'i = V_i - V_M$

$$t'A = 5 - 0,5 = 4,5 \text{ min}, t'B = 12 - 0,5 = 11,5 \text{ min}$$

$$V'A = 4,5 \cdot 15 = 67,5 \text{ ml et } V'B = 11,5 \cdot 15 = 172,5 \text{ ml}$$

$$\text{Ou } V'A = 75 - 7,5 = 67,5 \text{ ml et } V'B = 180 - 7,5 = 172,5 \text{ ml}$$

- (c) Formule $t_R = t_M(k'+1)$ ou $k' = t'R/t_M$

$$k'A = 4,5/0,5 = 9 \text{ et } k'B = 23$$

- (d) Formule $N = 16 (t_R/\omega)^2$ donc $\omega = 4 \cdot t_R/\sqrt{N}$

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

- (e) Formule $H = L/N$

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

- (f) Formule $\alpha = t'B/t'A = k'B/k'A$

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

- (g) Formule $R = 2 (t_B - t_A)/(\omega_B + \omega_A)$

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

(h) Pour k' les valeurs sont élevées. Composés retenus donc temps de rétention long et surement élargissement des pics.

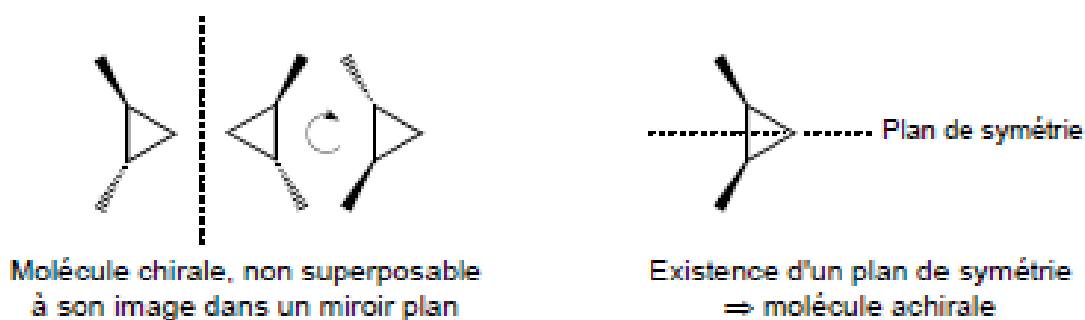
Valeur de R très importante. La résolution de la séparation est très bonne, mais le compromis entre le temps de rétention et la résolution n'est surement pas optimisé. Il est préférable de baisser le temps d'analyse et de perdre un peu en résolution.

3. Polarimétrie

1. Définitions

1.1. La polarimétrie est une technique expérimentale basée sur la mesure de pouvoir rotatoire, c'est-à-dire de la déviation du plan de polarisation d'une lumière polarisée traversant une solution composée par une ou de plusieurs molécules chirales. Cette méthode a été découverte par BIOT en l'an 1812 sur des cristaux puis en 1815 sur des molécules organiques. Cette méthode n'est applicable qu'aux molécules optiquement actives (chirales).

1.2. Molécule chirale (chiral du grec Main) une molécule chirale est non superposable à son image dans un miroir au moins un carbone asymétrique Cette asymétrie est à l'origine de l'activité optique des molécules chirales.



1.3. Lumière polarisée la lumière polarisée a été découverte par Malus en 1809. Une lumière "normale" est composée d'un champ électrique et d'un champ électromagnétique. Le champ électrique, celui auquel l'oeil est sensible peut prendre n'importe quelle direction. Dans une lumière polarisée, le champ électrique est limitée à une seule direction.

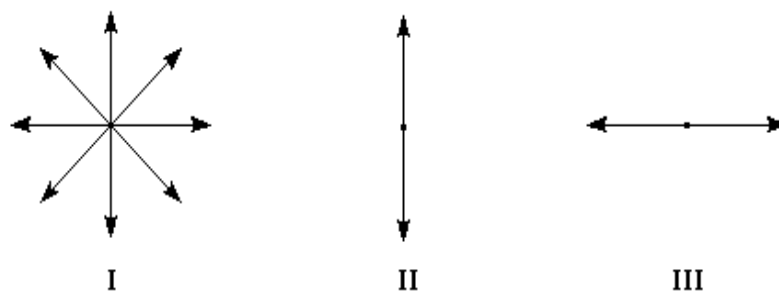


Figure	I	II	III
Lumière	naturelle	polarisation verticale	polarisation horizontale

1.4. Solution optiquement active solution renfermant des molécules chirales. Il existe deux variétés de substances optiquement actives :

a. **Les substances lévogyres** qui font dévier le plan d'une lumière polarisée dans le sens horaire vis-à-vis d'un observateur. On attribue a leur pouvoir rotatoire un signe (-).

b. **Les substances dextrogyres** qui font tourner le plan d'une lumière polarisée dans le sens anti-horaire vis-à-vis d'un observateur. On attribue a leur pouvoir rotatoire un signe (+).

2. Principe de la méthode

L'appareil qui permet de mesurer les rotations optiques est le **polarimètre**. Il existe :

2.1. Polarimètre manuel il existe plusieurs sortes de polarimètres. Il y a le célèbre polarimètre de Laurent, et d'autres construit sur le même principe (polarimètre de Lippich, de Zeiss).

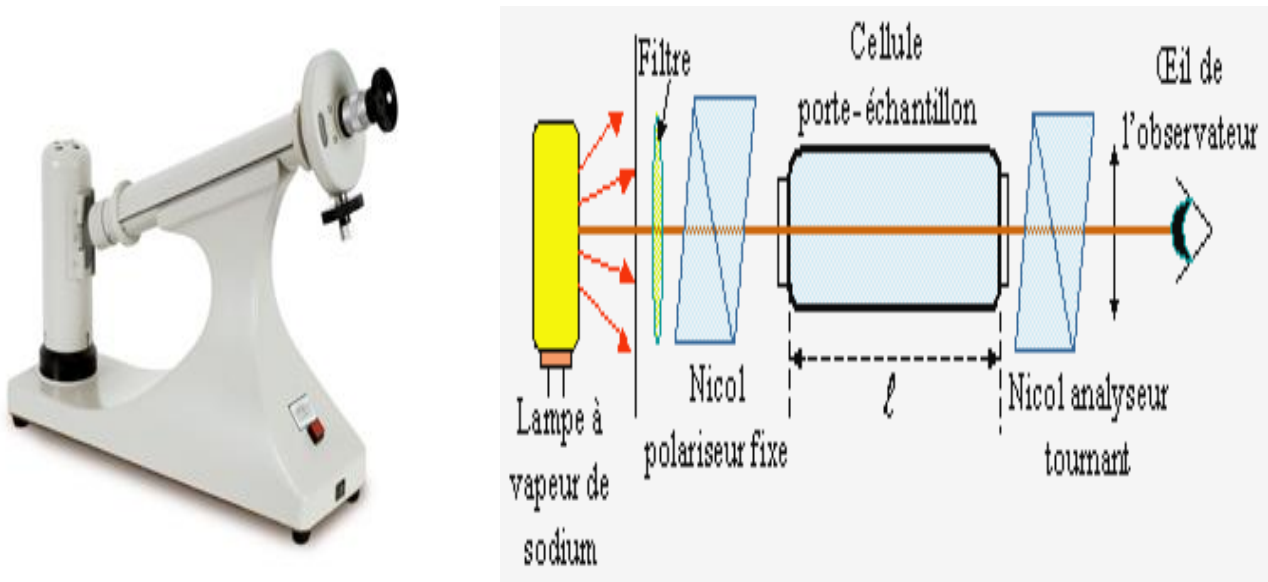


Figure 28. Principe de fonctionnement de polarimètre

Ses caractéristiques essentielles sont les suivantes :

- ✓ La source lumineuse la plus fréquemment employée est une lampe au sodium qui donne une lumière monochromatique ($\lambda = 589,3 \text{ nm}$).
- ✓ La lumière est d'abord polarisée grâce à un prisme de Nicol (prisme polariseur), formé de deux prismes de cristal de calcite.
- ✓ Elle trouve ensuite une cellule (tube polarimétrique) contenant l'échantillon.
- ✓ La rotation du plan est détectée par un autre prisme de Nicol ; le prisme analyseur qui peut être tourné manuellement.
- ✓ La différence mesurée en degrés est la rotation optique observée α de l'échantillon.
- ✓ Lecture : dans le polarimètre, on utilise une lame demi onde sur l'oculaire dont le but est d'obtenir deux champs de pénombre. La valeur de l'angle de rotation du plan de polarisation peut être mesuré une fois que l'on est en zone d'équipénombre.

- ✓ On applique **la loi de Biot** qui dit que l'angle de rotation est proportionnel à la longueur de cuve et à la concentration. La constante de proportionnalité est appelée pouvoir rotatoire de la substance (pouvoir rotatoire spécifique). Elle dépend de la température et de la longueur d'onde à laquelle l'expérience a été réalisée. On peut donc écrire la loi de Biot sous la forme :

$$\alpha = [\alpha]_T \cdot l \cdot c$$

α : angle de rotation observé en degrés.

l : longueur de la cuve en dm.

c : concentration de la solution en g / mL.

$[\alpha]_T$: pouvoir rotatoire spécifique.

2.2. Polarimètre numérique

Les polarimètres numériques et automatiques fonctionnent rapidement avec une haute résolution et une plus grande précision que les polarimètres classiques. Ils sont simples à utiliser et efficace du point de vue du temps passé.

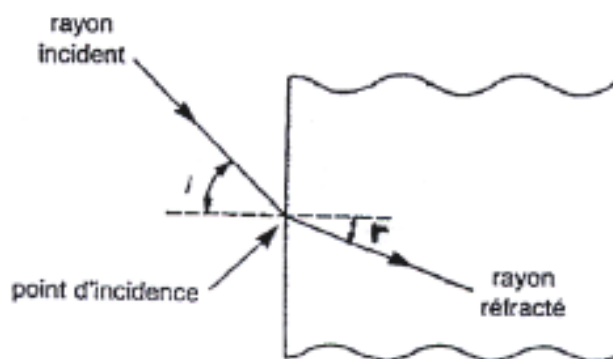
4. Réfractométrie

1. Définitions

La réfractométrie permet la mesure de l'indice de réfraction d'un milieu qui permet :

- d'identifier une espèce chimique ;
- de déterminer la composition d'un mélange.

On appelle réfraction le changement de direction que subit un rayon lumineux en passant d'un milieu optique donné à un autre. Ce changement est dû à une modification de la vitesse de propagation à partir du point, appelé point d'incidence, où le rayon lumineux incident frappe l'interface.



On appelle **dioptrie** l'interface entre deux milieux d'indices optiques différents.

L'indice de réfraction n d'un milieu caractérise la vitesse de propagation de la lumière dans ce milieu. Plus précisément, pour une onde monochromatique, de longueur d'onde λ à température et pression fixées l'indice n d'un milieu est défini par le rapport entre la vitesse de la lumière dans le vide, notée c et celle mesurée dans ce milieu, notée v :

$$n = c / v$$

L'indice décroît avec un accroissement de la température ou lorsque la longueur d'onde augmente. La pression est rarement mentionnée car elle a une influence moins importante que la température sur l'indice de réfraction des liquides.

Tableau I : Quelques valeurs d'indice de réfraction de liquide et solide à la longueur de référence de 589 nm et à la température de 20°C.

Eau	1,333
Acétone	1,359
Toluène	1,497
Diamant	2,418
Sel gemme NaCl	1,544
Verres	1,5 à 2

2. Description d'un réfractomètre

Le terme de réfractomètre est principalement utilisé pour nommer des appareils qui permettent de déterminer l'indice de réfraction d'un liquide, bien qu'il existe également des instruments qui permettent la détermination de l'indice de réfraction d'un solide. Les réfractomètres les plus largement répandus d'Abbe et de Pulfrich mesurent l'angle de réfraction i_2 d'un rayon lumineux qui est relié à l'angle d'incidence i_1 .

L'appareil se compose :

- D'un prisme mobile d'éclairage P' + lampe de Na;
- D'un prisme réfractométrique P fixe sur lequel on dépose une goutte du liquide dont on veut déterminer l'indice de réfraction n ;
- De deux oculaires O et O' , celui du bas (O) permet de pointer la ligne de séparation des deux zones claire et obscure, celui du haut (O') permet la lecture de l'échelle des indices. Ces deux

oculaires sont munis de système de lentilles dont le réglage permet une vision nette pour chaque utilisateur ;

- D'un dispositif permettant l'éclairage de l'échelle des indices;
- D'un bouton **M** permettant d'amener la limite de séparation dans le réticule de l'oculaire O. Il se situe à droite du réfractomètre lorsqu'on place l'oeil dans l'un des oculaires ;
- D'un bouton **M'** faisant tourner le système compensateur, série de prismes compensateurs, permettant de déterminer l'indice de réfraction équivalent à la raie u sodium et de supprimer les colorations que peut présenter la limite de séparation entre la plage sombre et la plage claire. Ce bouton **M'** se situe à gauche du réfractomètre lorsqu'on place son oeil dans l'un des oculaires.
- D'un thermomètre pour repérer la température lors de la mesure de l'indice de réfraction ;
- D'un système de régulation de la température.

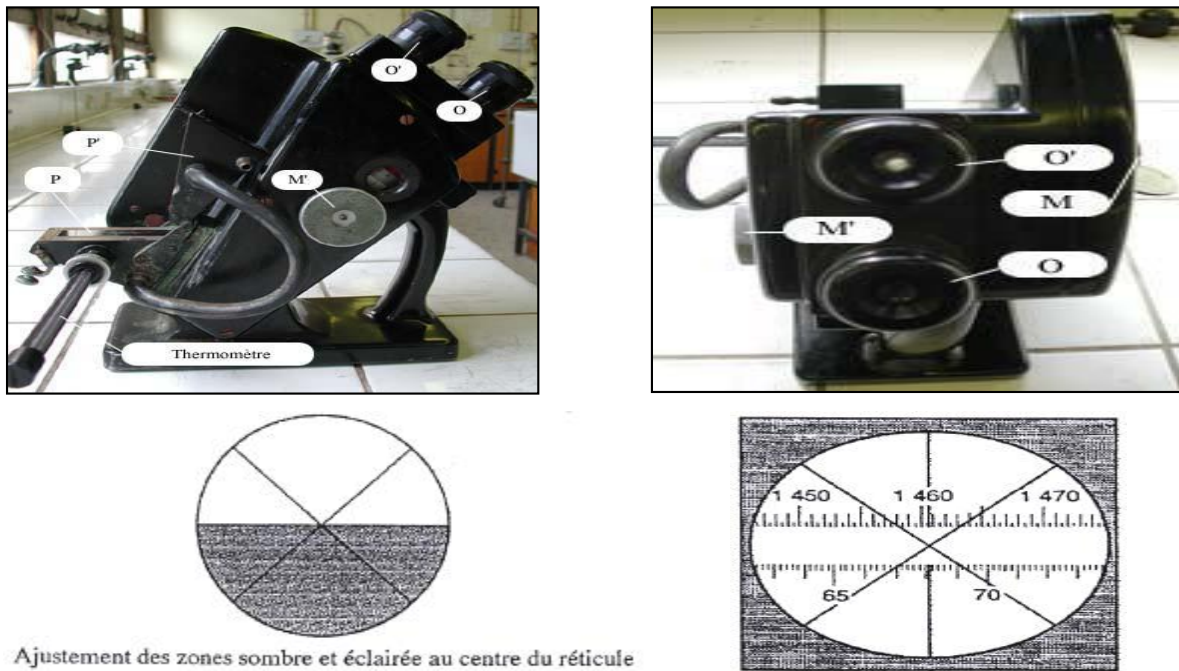


Figure 29. Description d'un réfractomètre et son mode de fonctionnement.

3. Mise en oeuvre expérimentale

3.1. Précautions

- Ne pas toucher les parties optiques avec les doigts ;
- Ne pas rayer les prismes : le liquide est déposé délicatement avec une pipette pasteur et les prismes nettoyés avec du coton, du tissu doux ou du papier fin imbibés d'éthanol.
- L'échantillon ne doit pas contenir de particules solides.

3.2. Mesure

- Diriger les prismes vers une source lumineuse ;
- Mettre en marche le système de régulation de température ;
- Soulever le prisme mobile et déposer une ou deux gouttes de liquide sur la surface du prisme fixe ;
- Rabattre doucement le prisme mobile ;
- Observer au travers de l'oculaire et utiliser une première molette (M) pour obtenir un bon contraste entre une zone claire correspondant aux rayons réfractés et une zone sombre correspondant à l'absence de rayons réfractés.
- Ensuite avec la deuxième molette (M'), amener la limite de séparation au centre du réticule.

5. Électrophorèse

1. Définition et principe

C'est une des nombreuses techniques de séparation et d'analyse de particules chargées par migration différentielles sous l'action d'un champ électrique.

L'électrophorèse est une technique permettant de déplacer des ions (molécules ayant perdu leur neutralité électrique) sous l'effet d'un champ électrique. Ceux-ci migrent vers leur électrode respective: si on dépose une espèce anionique (chargée négativement), elle migrera vers l'anode (+) et une espèce cationique (chargée positivement) du côté de la cathode (-). Pour les molécules non chargées, il n'existe pas de migration.

Du fait de leurs caractéristiques propres et des conditions de l'électrophorèse, la vitesse de migration et la distance parcourue dans la matrice par ces ions diffèrent, ce qui permet leur séparation.

2. Appareillage

Un générateur du courant continu stabilisé relié aux électrodes de la cuve. Ce courant crée un champ électrique qui va permettre de faire migrer les molécules.

Une cuve d'électrophorèse fermée (horizontale ou verticale) et éventuellement thermostatée comportant deux compartiments. Chaque compartiment est rempli du tampon de migration.

Des accessoires comme le support d'électrophorèse, les plaques de verre pour couler le gel et les peignes pour creuser des puits dans le gel, dans lesquels les composés à analyser seront déposés.

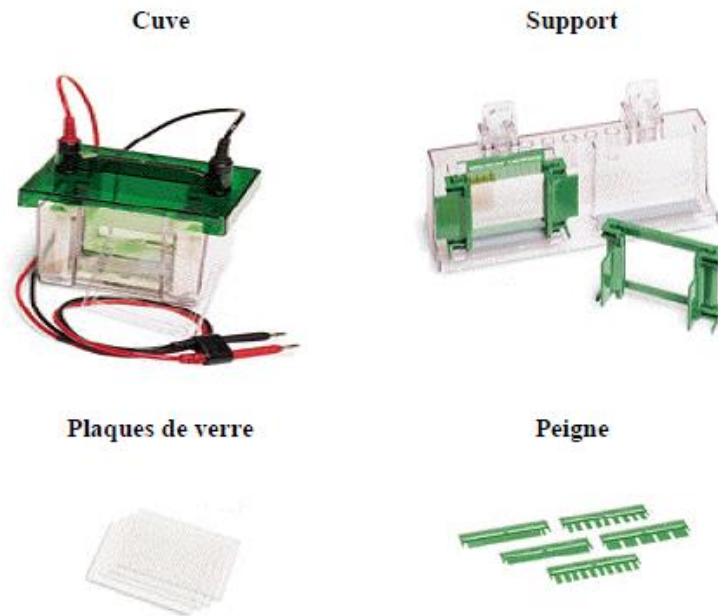


Figure 30. Différents constituants d'électrophorèse.

3. Facteurs influençant la mobilité électrophorétique

3.1. Nature de la molécule

La taille et la charge de la molécule influencent le processus électrophorétique. En effet, les petites molécules migrent facilement mais leur mobilité dépend des autres substances dissoutes susceptibles de diminuer leur vitesse. Le signe de la charge détermine le sens de migration et sa vitesse.

3.2. Composition ionique du tampon d'électrophorèse

Un tampon de pH dont les ions conduisent le courant d'un pôle à un autre.

3.3. Support

Certains supports possèdent des propriétés adsorbantes et peuvent fixer les molécules de solvants ou de solutés. Il en résulte un ralentissement de la migration.

3.4. Champ électrique

Le champ électrique est fourni par un générateur de courant continu.

4. Types d'électrophorèse

L'électrophorèse peut être en des conditions non dénaturantes ou en des conditions dénaturantes.

4.1. Electrophorèse en des conditions non dénaturantes

Les molécules sont séparées dans leur état le plus proche possible de leur état natif. La vitesse de migration dépend de la charge native de la molécule et de sa structure.

4.2. Electrophorèse en des conditions dénaturantes

Les molécules sont soumises à un traitement dénaturant avant la séparation électrophorétique, détruisant la structure native. La séparation est en fonction de la masse moléculaire. (exemple : l'agent de dénaturation SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) permettant de charger ainsi de séparer en fonction de la masse moléculaire les protéines).

Selon le support électrophorétique, il existe deux types d'électrophorèse:

4.3. Electrophorèse en veine liquide (électrophorèse libre)

Il s'agit de la première méthode électrophorétique décrite. La solution échantillon est placée dans un tube en U et recouverte d'une solution tampon de densité plus faible que celle de l'échantillon pour éviter les courants de convection. Les électrodes sont placées dans le tube où l'on applique le champ électrique. La migration dans ce cas s'effectue au sein d'un liquide constitué par une solution tampon dont les ions conduisent le courant d'un pôle à un autre.

Ce type de d'électrophorèse présente de multiples inconvénients (Appareillage coûteux, mise en oeuvre longue et délicate, séparation incomplète des particules).

4.4. Electrophorèse de zone sur support

Les mobilités obtenues en ce type d'électrophorèse sont plus faibles que celles de l'électrophorèse en veine liquide. Ce type utilise un support poreux stabilisant la phase liquide. Le mélange à séparer est déposé sur un support convenable, homogène, poreux, inerte et imprégné de tampon. Ce support peut être du papier, un dérivé de cellulose, de l'amidon, de l'agarose, du polyacrylamide PAGE (Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis), etc.

Les différents types d'électrophorèse de zone sont souvent nommés en fonction du type de support : Electrophorèse sur papier, sur acétate de cellulose, sur gel (amidon, agar, agarose, Polyacrylamide...).

4.4.1. Types de montage

a. Montage horizontal

Utilisé pour les supports en acétate de cellulose ou en en papier. Le support se présente sous forme de longue et étroite bande. Les extrémités du support plongent dans un tampon d'électrode, créant une mince couche d'eau à sa surface.

b. Montage vertical

Utilisé pour les supports en gel polyacrylamide ou d'agarose . Le gel est souvent préparé avant usage en le coulant entre 2 plaques de verre. Chaque extrémité du gel est mis en contact avec un tampon contenant des électrolytes qui permettra la propagation d'un courant dans le gel.

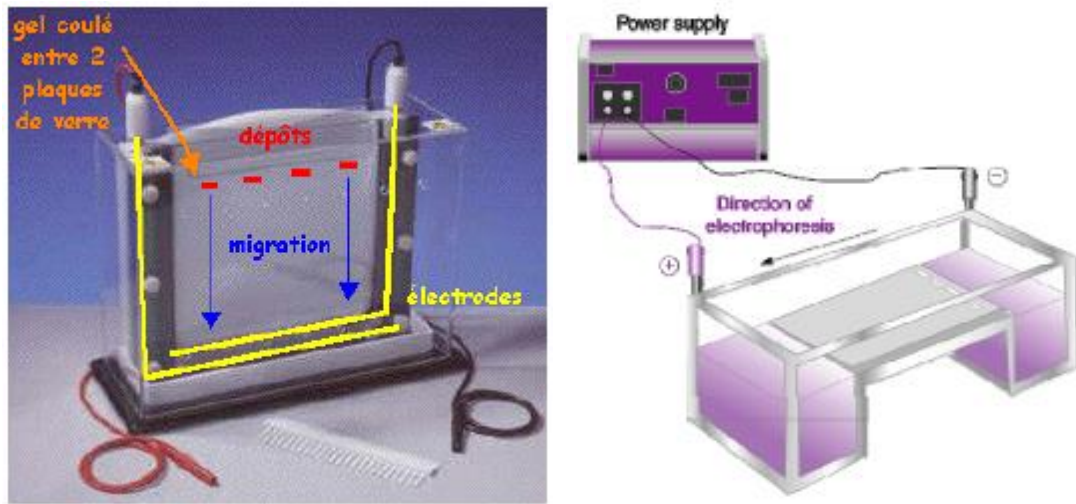


Figure 31. Types de montage d'électrophorèse.

4.4.2. Mise en œuvre (sur gel)

Elle consiste à:

- ✓ Préparer le gel de concentration et le gel de séparation.
- ✓ Couler le gel de séparation entre des plaques de verre fixées sur un support suivi par le gel de concentration.
- ✓ Déposer un peigne entre ces plaques.
- ✓ Retirer le peigne après formation des puits.
- ✓ Déposer l'échantillon et les marqueurs de masse moléculaire dans les puits.
- ✓ Placer les plaques de verre contenant le gel dans une cuve d'électrophorèse.
- ✓ Remplir la cuve avec le tampon de migration.
- ✓ Mettre en marche le générateur de courant.
- ✓ Enlever le gel à partir des plaques à la fin de la migration.
- ✓ Colorer puis décolorer le gel.
- ✓ Analyser le gel.

a. Préparation du gel

Elle consiste à préparer deux gels: un gel de séparation dont les pores sont serrés et un gel de concentration dont les pores sont lâches. Le gel de séparation permet la séparation de la solution à analyser. Le gel de concentration est coulé en haut du gel de séparation et permet une entrée homogène de l'échantillon dans le gel de séparation.

b. Préparation de l'échantillon

L'échantillon est soumis à l'action de plusieurs composés de dénaturation comme le SDS ou autres, des marqueurs colorés comme le bleu de bromophénol, l'ajout du sucrose ou glycérol donnent une densité à l'échantillon.

c. Les marqueurs de masse moléculaire

La détermination de la masse moléculaire des molécules inconnues nécessite l'utilisation des standards de masse moléculaire connue.

d. Le tampon de migration

Il contient des électrolytes qui sont responsables du transport du courant électrique.

e. La coloration

Une fois la migration électrophorétique terminée, le gel est démoulé, séché puis plongé dans un colorant.

f. La décoloration

Une succession de bains dans la solution de décoloration permet d'éliminer la coloration du fond de façon à faire apparaître les bandes correspondant aux diverses molécules séparées qui doivent être fixées avant décoloration.

Références bibliographiques

- Audigié, C. (1997).** Principes des méthodes d'analyses biochimiques. Tome 1. Nouvelle collection. EditionDion, 207p.
- Bonnard, R. (2001).** Rapport final (Le risque biologique et la méthode d'évaluation du risque), Unité Evaluation des Risques Sanitaires Direction des Risques Chroniques, INERIS DRC-01- 25419-ERSA-RBn-383/microb6.doc, p38.
- Burgot, G. and Burgot, J.L. (2011).** Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications: Méthodes chromatographiques, électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques. Lavoisier.
- Chappuis, P. (1995).** Techniques d'analyse des oligoelements chez l'homme. Edition Tec et Doc, 158p.
- Cruz, R.M.S., Khmelinskii, I. and Vieira, M. (2014).** Methods in food analysis. CRC, Boca Raton, FL.
- Deymie, B. and Multon, J.P. (1981).** Techniques d'analyses et contrôle dans les IAA. Tome 4, Editeur Tec et Doc, 409 p.
- Folco, L., Anja, H., Laurent, T., Robert, M., Guillaume, G. and Benjamin, D. (1999).** Dossier Couplage : Les principales methodes d'analyse. p5.
- Grasmick, A. (1997).** Laboratoire de Génie procédés et d'élaboration de Bioproduits LGPEB/UMII)
- Heftmann, E. (1983).** Chromatography: fundamentals and applications of chromatographic and electrophoretic methods. P. A, Fundamentals and techniques.
- Jaffrezic Renault, N. (2003).** Développements analytiques: microcapteurs électrochimiques pour le suivi in-situ des contaminants. *Revue de la Faculte des Sciences de Bizerte*. 02, 92-98
- Marie-Claire, H. (2005).** L'évolution des systèmes analytiques, impact sur les formations, Laboratoire Environnement et chimie Analytique, ESPCI, Paris, JOURNEES MIEC-JIREC.
- Mendham, J., Denney, R., Barnes, J. and Thomas, M. (2005).** Analyse chimique quantitative de Vogel. 1ère Edition edn. De Boeck.
- Merck, M. (2016).** Méthodes générales de test et d'analyse des produits alimentaires (Solutions pour les méthodes d'analyse instrumentale réglementée utilisant la SAA, la CPG, l'HPLC, l'ICP, le titrage KF et la CCM). www.merckmillipore.com/food-analysis . p1-79.

- Multon, J.P. (1981).** Techniques d'analyses et contrôle dans les IAA. Tome 1 et 2, Editeur Tec et Doc, 244 p.
- Nicole, J.R., Claude, M. and Paul C. (2006).** Club Microcapteurs Capteurs chimiques et biochimiques Chimiques (CMC2) Ingénierie et Fonctionnalisation des Surfaces (UMR 5621) de l'École Centrale de Lyon.
- Nollett, L.M.L. and Toldra, F. (2012).** Food analysis by HPLC, 3rd edn. CRC, Boca Raton, FL.
- OCDE. (1998).** Série sur les principes de bonnes pratiques de laboratoire et vérification du respect de ces principes. (Les Principes de L'OCDE de Bonnes pratiques de laboratoire). Direction de l'Environnement Organisation de Coopération et de Développement Economiques. Paris.
- Ötleş, S. (2008).** Handbook of food analysis instruments. CRC, Boca Raton, FL.
- Perrin-Drouin, Y. (1958).** Chromatographie en phase gazeuse: méthode de partage gaz-liquide.
- Poole, C.F. (2003).** The essence of chromatography. Elsevier.
- Rouessac, F., Rouessac, A. and Cruché, D. (2004).** Analyse chimique-6ème édition-Méthodes et techniques instrumentales modernes: Méthodes et techniques instrumentales modernes. Dunod.
- Skoog, D.A., Holler, F.J. and Nieman, T.A. (2003).** Principes d'analyse instrumentale. De Boeck Supérieur.

EXERCICES SUR LES TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

Exercice 01 : On détermine les temps de rétention (t_r) au cours d'une chromatographie sur Sephadex, des protéines suivantes dont on connaît la masse moléculaire (MM) (Le débit de la colonne est de 5 ml / min) :

	MM	t_r (min)
Aldolase	145000	10,4
Lactate déshydrogénase	135000	11,4
Phosphatase alcaline	80000	18,4
Ovalbumine	45000	26,2
Lactoglobuline	37100	28,6

1 - Calculer les volumes d'élution (V_e) correspondants. Porter le log de MM en fonction de V_e - Que remarquez-vous ?

2 - Pour la glucokinase, $t_r = 21$ min. Déterminer sa masse moléculaire à l'aide du graphique précédent. Existe-t-il une autre méthode pour déterminer la MM ?

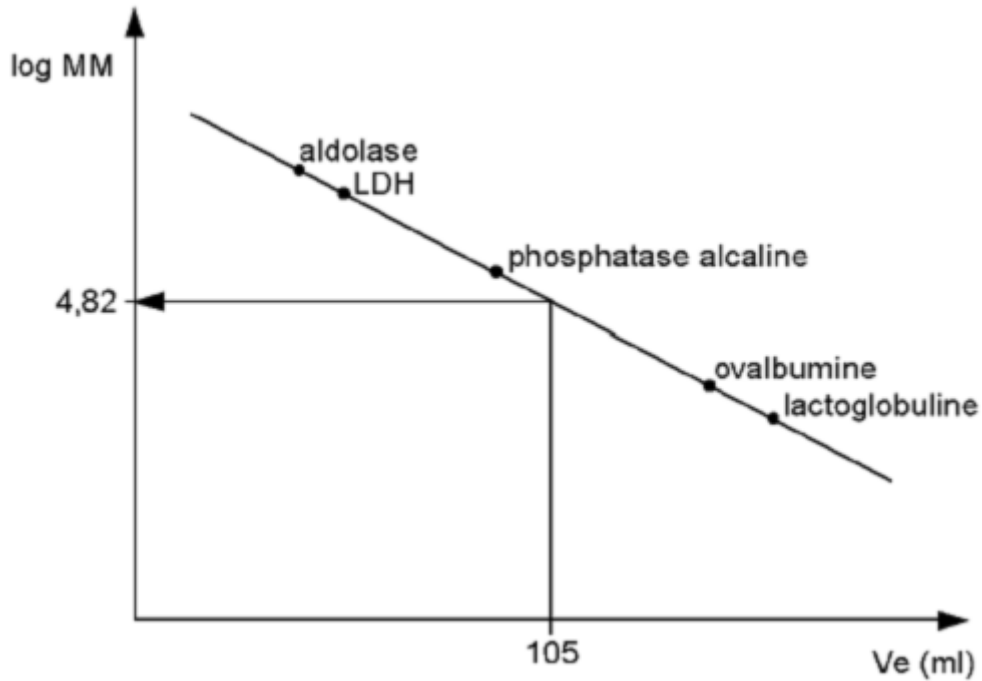
Correction

1 - Cet exercice met en jeu une chromatographie d'exclusion (encore appelée : tamisage moléculaire, gel filtration, perméation de gel). La connaissance du débit de la colonne (5 ml / min) et des différents temps de rétention nous permet de calculer le volume d'élution pour chaque composé (voir tableau), selon la relation :

$$V_e \text{ (volume d'élution)} = d \text{ (débit)} \times t_r \text{ (temps de rétention)}$$

La représentation graphique du log de la masse moléculaire (log MM) qu'il faut calculé préalablement (voir tableau) en fonction du volume d'élution (V_e) nous donne une droite :

	MM	<u>Log MM</u>	t_r (min)	<u>V_e (ml)</u>
Aldolase	145000	5,16	10,4	52
Lactate déshydrogénase	135000	5,13	11,4	57
Phosphatase alcaline	80000	4,9	18,4	92
Ovalbumine	45000	4,65	26,2	131
Lactoglobuline	37100	4,57	28,6	143



Le fait de visualiser une droite signifie qu'aucune protéine n'est exclue du gel.

2 - La glucokinase, avec un temps de rétention de 21 min, est éluée à un volume d'éluion de $5 \times 21 = 105$ ml. Il suffit de se reporter au graphe pour déterminer un log de $MM = 4,82$ environ, soit une masse moléculaire de 66070 Da (ou 66070 g/mol ou 66,07 kDa), environ.

Ici, on a tracé le logarithme de la masse moléculaire en fonction du volume d'éluion :

$\log MM = f(Ve)$.

L'autre représentation serait de porter le logarithme de la masse moléculaire en fonction du KAV, le coefficient de partage entre la phase liquide et la phase gel : **$\log MM = f(KAV)$.**

$$KAV = (Ve - Vm) / (Vt - Vm)$$

Mais pour cela, il faudrait connaître le volume mort (Vm) et le volume total de la colonne (Vt).

Exercice 02 :

Un mélange de six iodures d'alkyle est séparé par chromatographie gazeuse à l'aide d'une colonne remplie de poudre de brique réfractaire enrobée d'huile de silicone (longueur $L = 365$ cm). La colonne est chauffée de telle sorte que sa température croisse linéairement durant toute l'opération. Le tableau donne les résultats relevés.

Pic	Identité	t_R (min)	ω (min)	Température (°C)	Surface (cm ²)
1	Air	$t_M = 0,5$	Petite	55	Petite
2	CH ₃ I	6,60	0,55	100	13,0
3	C ₂ H ₅ I	9,82	1,00	127	12,0
4	Iso-C ₃ H ₇ I	11,90	1,04	139	10,0
5	n-C ₃ H ₇ I	13,04	1,08	148	7,2
6	CH ₂ I ₂	19,10	1,60	193	2,0

(a) Calculer la résolution entre les pics 2-3, 3-4, 4-5, 5-6 ?

(b) la séparation vous convient elle ?

(c) Quelle longueur de colonne aurait il fallu pour que la résolution des pics 4 et 5 ait été de $R' = 1,5$?

Correction

(a) **Formule $R = 2 (t_B - t_A) / (\omega_B + \omega_A)$**

$$R_{2-3} = 2 (9,82 - 6,6) / (0,55 + 1) = 4,15$$

$$R_{3-4} = 2 (11,9 - 9,82) / (1 + 1,04) = 2,04$$

$$R_{4-5} = 2 (13,04 - 11,9) / (1,04 + 1,08) = 1,08$$

$$R_{5-6} = 2 (19,1 - 13,04) / (1,6 + 1,08) = 4,52$$

(b) Les pics 4 et 5 sont mal résolus.

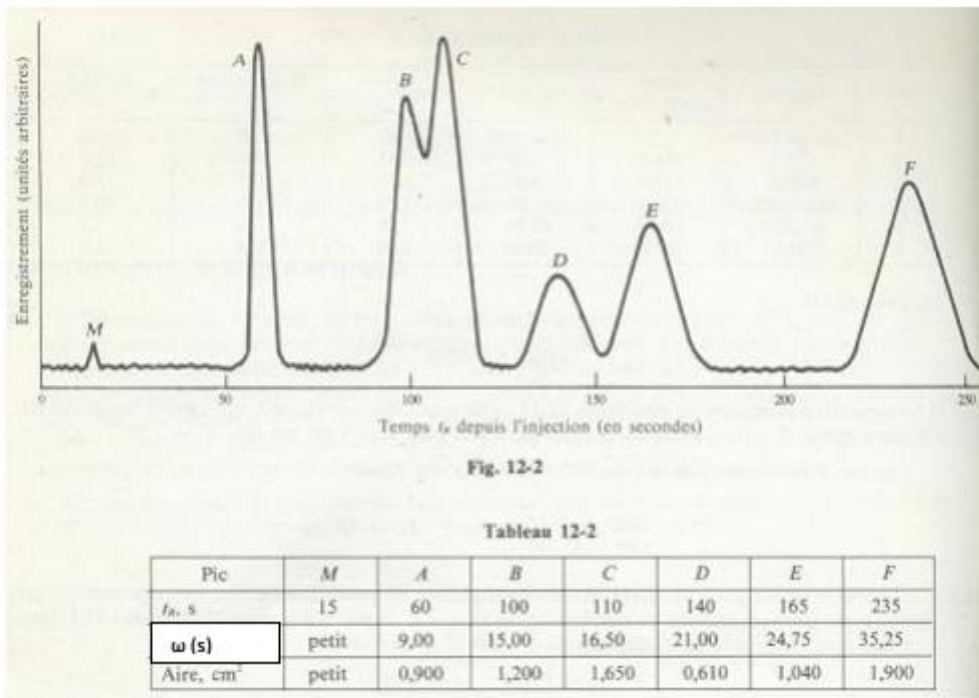
(c) Comme R est proportionnel à \sqrt{L} , alors, $R'/R = \sqrt{L'/L}$

$$\text{Ainsi, } (1,5/1,08) = \sqrt{L'/365} \quad L' = 365 \cdot (1,5/1,08)^2 = 704 \text{ cm}$$

Exercice 03 :

Le chromatogramme suivant a été obtenu pour un mélange de chaînes droites d'hydrocarbures : C_nH_{2n+2}. Le pic M est dû à un corps non absorbé ; le pic A est celui de C₃H₈ ; le pic F est celui de C₂₀H₄₂.

La colonne mesure 120 cm de longueur et est utilisée à température constante avec un débit de gaz de 50,0 cm³/min. On trouve les données concernant les temps de rétention et la largeur des pics dans le tableau suivant.



- Trouver le nombre de plateaux théoriques N_A en se basant sur le pic A ?
- Calculer la résolution entre les pics B-C, D-E ?
- Quelle longueur de colonne aurait il fallu pour que la résolution des pics B et C ait été de $R' = 1,5$?
- En déduire la nouvelle résolution des pics D et E ?
- Déterminer le t_R de F sur une colonne de longueur déterminée au (d) et conclure ?

Correction

(a) **Formule $N = 16 (t_R/\omega)^2$**

$N_A = 16 (60/9)^2 = 711$ plateaux

(b) **Formule $R = 2 (t_B - t_A)/(\omega_B + \omega_A)$**

$R_{B-C} = 2 (110-100)/(15+16,5) = 0,63$ mal résolus.

$R_{D-E} = 2 (165-140)/(21+24,75) = 1,09$ mal résolus.

(c) Comme R est proportionnel à \sqrt{L} , alors, $R'/R = \sqrt{(L'/L)}$

Ainsi, $(1,5/0,63) = \sqrt{(L'/120)}$ $L' = 120.(1,5/0,63)^2 = 680$ cm

(d) On peut déduire R_{D-E} avec une colonne de 680 cm

Ainsi, $(R'/1,09) = \sqrt{(680/120)}$ $R' = 2,6$

(f) On a $t_R = 235$ sec = 3,9 min sur une colonne de 120 cm

Ainsi, sur une colonne de 680 cm, $t_R = 235.(680/120) = 1331,7$ sec $t_R = 22,2$ min

Trop long donc peut être changée la nature de la colonne

Exercice 04

Nous étudions la séparation de trois composés par chromatographie haute performance (HPLC). L'expérience a lieu à 20 °C avec une pression de la colonne de 49 bar. Le débit de la phase mobile est de 1 ml/min et la longueur de la colonne est de 15 cm. Le temps mort est de **41 s**. La séparation chromatographique a donné les résultats présentés dans le tableau suivant :

Tableau 01 : Résultats de la séparation par HPLC de trois composés.

Composés	Symbole	t_R (min)	w (min)
Toluène	T	1,83	0,14
Diéthylphtalate	E	2,62	0,34
Diméthylphtalate	M	3,23	0,42

1) Le principe de fonctionnement de l'HPLC ?

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

- 2) La chromatographie utilise une colonne C18 et un mélange de solvant d'éluion ethanol/hexane. Préciser le type de chromatographie utilisé ?

C'est une chromatographie de partage en phase inverse. (Phase stationnaire apolaire).

- 3) Calculez pour chaque composé :

Le facteur de rétention k' ,

$$k' = \frac{t_R - t_m}{t_m}$$

Le nombre de plateaux théoriques

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{W}\right)^2$$

D'où le tableau de résultats :

Composés	Symbole	k'	N
Toluène	T	1,68	2734
Diéthylphtalate	E	2,83	950
Diméthylphtalate	M	3,73	946

- 4) Calculez pour les couples toluène/diéthylphtalate et diéthylphtalate/diméthylphtalate : ?

Le facteur de sélectivité α

$$\alpha = \frac{t_{RB} - t_m}{t_{RA} - t_m} = \frac{k'_B}{k'_A}$$

et la résolution R_s

$$R_s = \frac{2(t_{RB} - t_{RA})}{W_A + W_B}$$

D'où le tableau de résultats :

Composés	α	R_s
Toluène/ Diéthylphtalate	1,68	3,29
Diéthylphtalate/ Diméthylphtalate	1,31	1,61

- 5) Qu'en conclure sur la séparation des composés ?

$\alpha > 1$ et $R_s > 1,5$: tous les composés sont correctement séparés.

Exercice 05 :

La carboxyméthylcellulose (CM-cellulose) est un support échangeur de cations. Elle est obtenue en substituant la cellulose par des groupements carboxyméthyls (-CH₂-COOH).

1 - Quelle est la proportion des groupements carboxyméthyls chargés négativement aux pH suivants : 1 ; 4,76 ; 7 et 9 (on considérera que le pKa du groupement carboxyl des radicaux carboxyméthyls est 4,76).

2 - Parmi les protéines suivantes : Ovalbumine (pHi = 4,6), Cytochrome c (pHi = 10,65) et Lysozyme (pHi = 11), quelles sont celles qui sont retenues par la CM-cellulose à pH 7 ? (On considérera que les interactions protéine-CM-cellulose sont uniquement d'ordre électrostatiques).

Correction

Cet exercice met en jeu une chromatographie échangeuse de cations. La carboxyméthylcellulose (CM-cellulose) est donc chargée négativement.

Lorsque le pH est supérieur au pHi (pH > pHi), la protéine est chargée négativement (forme anionique).

Lorsque le pH est inférieur au pHi (pH < pHi), la protéine est chargée positivement (forme cationique).

Protéine :	pHi :	Charge à ph = 7 :
Ovalbumine	4,6	négative
Cytochrome c	10,65	positive
Lysozyme	11	positive

Ainsi, seule l'ovalbumine, qui à pH = 7 est chargée négativement, ne sera **pas** retenue sur la colonne. Le cytochrome c et le lysosyme seront retenus.