
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université A.Mira- BEJAIA
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (FSNV)
Département de Biotechnologie



جامعة بجاية
Tasdawit n'Bgayet
Université de Béjaïa

Polycopies de cours :

Techniques d'Analyse Biologique

Préparé par :
Dr BOUCHACHI-MESKI SAMIRA

Année Universitaire 2025/2026

Préface

Ce polycopié est destiné aux étudiants de première année de Master (spécialité Biochimie fondamentale et Pharmacotoxicologie), ainsi qu'aux étudiants de Licence 3 (spécialité Biotechnologie microbienne).

Il constitue un support pédagogique de base pour l'apprentissage des méthodes d'analyse spectroscopique et des techniques de séparation, qui occupent une place centrale dans l'identification, la caractérisation et la purification des molécules d'intérêt biologique. Ces méthodes sont essentielles en biochimie, en pharmacologie, en toxicologie et en biotechnologie, tant pour la recherche que pour les applications industrielles.

Rédigé conformément au canevas pédagogique, ce polycopié vise à accompagner les étudiants dans la maîtrise progressive de ces outils analytiques. Il propose un contenu structuré, clair et illustré, permettant de renforcer les acquis théoriques et de mieux comprendre les principes fondamentaux ainsi que les applications pratiques de ces techniques.

Le présent polycopié est structuré en sept chapitres présentant les principes fondamentaux des principales méthodes d'analyse et quelques exercices d'application.

Le premier chapitre introduit les bases de la spectroscopie, tandis que le deuxième est consacré à la spectroscopie UV-visible.

Le troisième chapitre traite de la fluorométrie, alors que le quatrième aborde la spectroscopie infrarouge.

Le cinquième et sixième chapitres portent sur la chromatographie, et enfin le septième chapitre est dédié à la centrifugation.

Table des matières

Chapitre I : Généralités sur la spectroscopie

I.1. Introduction	1
I. 2. Définition de la lumière.....	2
I.3. Radiation électromagnétique	2
I.3.1. La longueur d'onde (λ) :.....	3
I.3.2. Le nombre d'onde (σ).....	3
I.3.3. La période (T)	3
I.3.4. La fréquence (ν)	4
I.3.5. L'énergie de la radiation.....	4
I.4. Energie interne d'une molécule	4
I.5. Le spectre électromagnétique	6
I.6. Classification des spectres	7
I.6.1. Spectres d'absorption	7
I.6.2. Spectres d'émission.....	7
I.7. Domaine d'application de la spectroscopie	7
I.8. Exercices d'application	8

Chapitre II : La Spectroscopie UV-Visible

II.1. Définition	11
II.2. Domaine UV-visible.....	11
II.3. Principe de la spectroscopie UV - Visible	12
II.4. Types de transitions électroniques.....	12
II.4.1. Transition $\sigma \rightarrow \sigma^*$	14
II.4.2. Transition $\pi \rightarrow \pi^*$	14
II.4.3. Transition $n \rightarrow \sigma^*$	14
II.4.4. Transition $n \rightarrow \pi^*$	15
II.5. Relation entre l'absorbance et la structure de la molécule.....	15
II.5.1. Groupements chromophores.....	15
II.5.2. Groupements auxochromes	15
II.6. Le spectre UV- visible	17
II.7. Appareillage	20
II.7.1. Source de lumière monochromatique.....	20
II.7.2. Monochromateur (sélection de la longueur d'onde)	21

II.7.3. Diviseur de faisceau ou photomètre.....	21
II.7.4. Cellule à échantillon.....	21
II.7.5. Détecteur	22
II.8. Classification des spectrophotomètres UV-Visible :	22
II.8.1. Les appareils à simple faisceau.....	22
II.8.2. Les appareils à double faisceau, à montage optique direct.....	22
II.9. Applications de la spectroscopie UV-visible	23
II.9.1. Analyse qualitative.....	23
II.9.2. Analyse quantitative.....	23
II.9.3. Additivité des absorbances	24
II.10. Domaines d'utilisation de l'UV-Visible	24
II.11. Exercices d'application.....	25

Chapitre III : La Fluorimétrie

III.1. Définition.....	29
III.2. La luminescence.....	29
III.3. Photoluminescence.....	29
III.4. La Fluorescence	30
III.4.1. Définition de fluorophore.....	30
III.5. Règle de multiplicité.....	31
III.6. Principe de la fluorimétrie	32
III.7. Aspect du Spectre.....	34
III.8. Aspects quantitatifs	34
III.8.1. Rendement quantique de fluorescence ϕ_f	35
III.8.2. Intensité de fluorescence.....	36
III.8.3. Durée de vie à l'état excité	37
III.9. Facteurs influençant la fluorescence.....	37
III.9.1. Facteurs liés à la molécule	38
III.9.2. Facteurs liés au solvant	38
III.9.3. Facteurs liés à l'environnement.....	40
III.9.4. Phénomènes d'inhibition.....	40
III.10. Instruments.....	42
III.11. Applications de la fluorescence.....	43
III.11.1. Applications qualitatives	43
III.11.2. Applications quantitatives	44
III.12. Domaine d'application.....	45

III.13. Exercices d'application.....	45
--------------------------------------	----

Chapitre IV : La spectroscopie Infrarouge (IR)

IV.1. Définition.....	49
IV.2. Le rayonnement Infrarouge	49
IV.3. Principe de la spectroscopie IR.....	50
IV.4. Etude des vibrations d'une molécule.....	51
IV.4.1. Vibrations d'élongation (ou stretching).....	51
IV.4.2. Vibrations de déformation	52
IV.5. Calcul du nombre de modes de vibration attendus pour une molécule isolée formée de N atomes	53
IV.6. Détermination du nombre d'onde	55
IV.7. Allure du spectre infrarouge	58
IV.8. Appareillage.....	59
IV.9. Exercice d'application.....	61

Chapitre V : La turbidité

V.1. Photométrie des milieux troubles	66
V.2. Principe de la diffusion de la lumière en milieu trouble.....	67
V.2.1. Loi de diffusion de Rayleigh	67
V.2.2. Facteurs influençant la diffusion	68
V.3. Définition de la turbidité.....	68
V.4. Méthodes de mesure de la turbidité.....	69
V.4.1. Méthode de disque de Secchi	69
V.4.2. La méthode de bougie de Jackson	71
V.4.3. Turbidimétrie.....	72
V.5. Turbidimètre.....	72
V.6. Néphélométrie	74
V.6. Unités de mesure de la turbidité.....	74
V.7. Domaine d'application de la néphélométrie et de la turbidimétrie.....	75

Chapitre VI : la chromatographie

VI.1. Généralités	77
VI.2. Principe de la chromatographie	77
IV.3. Les différents types de chromatographies	78
VI.3.1. Chromatographie en phase liquide (CPL).....	80
VI.3.2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	95

VI.3.3. Chromatographie liquide à haute performance HPLC.....	96
VI.3.4. Chromatographie en phase liquide à base pression	97
VI.4. Matériel	99
VI.4.1. Une colonne	99
VI.4.2. Un détecteur	100
VI.5. Exploitation et analyse	100
VI.5.1. Chromatogramme et grandeurs caractéristiques	100
VI.5.2. Paramètres de séparation	101
VI.6. Paramètres de performance des colonnes	103
VI.6.1. La sélectivité	103
VI.6.2. Efficacité d'une colonne	104
VI.7. Exercices d'application	107

Chapitre VII : Centrifugation

VII. 1. Définition	111
VII.2. Principe	111
VII.3. Vitesse de sédimentation.....	113
VII.4. Appareillage	114
VII.5. Types de centrifugation	117
VI.5.1. Centrifugation simple (unique)	117
VI.5.2. Centrifugation différentielle (en série)	118
VII.5.3. Centrifugation en gradient de densité.....	119
VII.6. Fractionnement	121
VII.7. Les précautions de base pour travailler avec une centrifugeuse	121
VII.8. Exercices d'application	122
Références Bibliographiques	124

Chapitre I : Généralités sur la spectroscopie

I.1.Introduction

La *spectroscopie* est une technique d'analyse qui étudie les interactions entre la matière et les radiations électromagnétiques. Elle exploite les propriétés **d'absorption** ou **d'émission** des substances (**Figure.I.1**), qu'elles soient à l'état liquide, solide ou gazeux, pour **identifier**, **quantifier** et **déterminer la composition chimique** d'un élément de manière **non invasive**, c'est-à-dire sans dégrader l'échantillon.

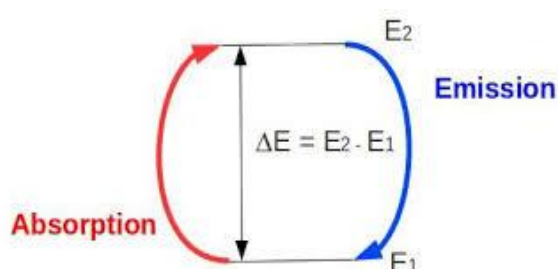


Figure I.1. Absorption/émission de lumière par transitions électroniques.

Tout comme il existe différents types de rayonnements électromagnétiques, il existe plusieurs types de spectroscopie, selon la fréquence de l'onde électromagnétique utilisée (**Tableau I.1**).

Tableau I.1 : Classification des méthodes spectroscopiques en fonction du type de rayonnement

Nature de l'espèce	Mécanisme d'activation	Domaine spectral	Méthodes basée sur le phénomène d' absorption	Méthode basée sur le phénomène d' émission et de fluorescence
Moléculaire	Transitions d'électrons de valence	UV/Visible	Spectrométrie UV/Visible	Fluorescence Phosphorescence
	Transitions vibrationnelles et rotationnelles	Infrarouge	Spectroscopie IR	
Atomique	Transition d'électrons de valence	UV/Visible	Spectrométrie d'absorption atomique	-Fluorescence atomique -Spectrométrie d'émission atomique

				(ICP-AES) et photométrie de flamme
	Transition d'électrons des couches internes	Rayons X		Fluorescence X
	Transition des états de spin de noyaux soumis à un champ magnétique	Ondes radio	Résonance magnétique nucléaire	

I. 2. Définition de la lumière

La **lumière** est une **onde électromagnétique**. Selon la théorie électromagnétique de la lumière développée par James Clerck Maxwell, une onde électromagnétique est caractérisée par la propagation simultanée de **champs électrique** (E) et **magnétique** (B) oscillants, perpendiculaires entre eux et à la direction de propagation (**Figure I.2**). Ainsi, la lumière présente une nature ondulatoire; on parle alors d'onde lumineuse ou onde électromagnétique. Contrairement aux vagues à la surface d'un lac, qui se propagent dans toutes les directions plutôt que dans un seul plan.

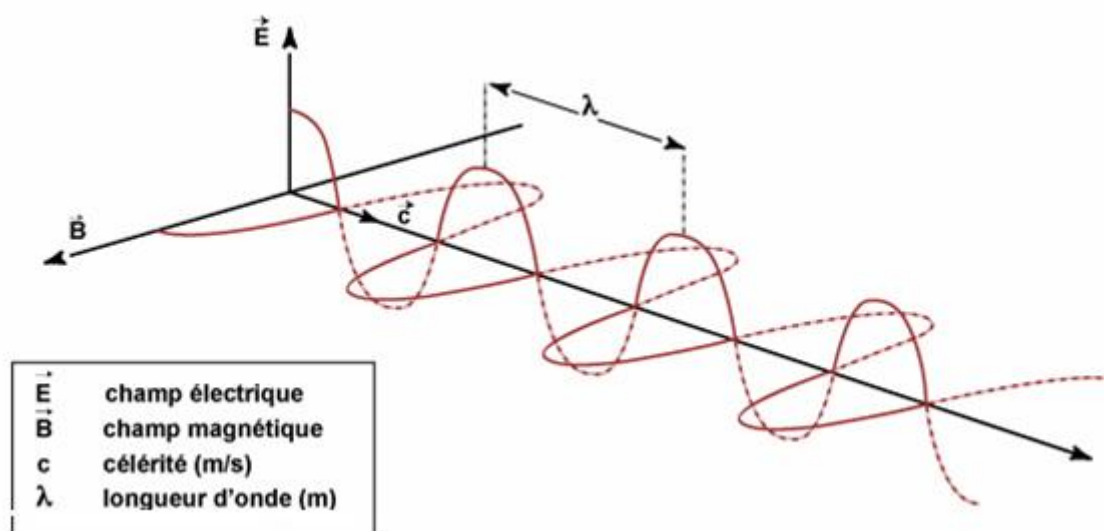


Figure I.2. Nature de propagation d'une onde électromagnétique.

I.3. Radiation électromagnétique

La radiation est une série discontinue de « paquets » ou « quanta » d'énergie appelés **photons** : c'est le caractère quantique de la lumière. Les interactions entre la matière et la

lumière manifestent par **l'absorption** ou **l'émission** de l'un de ces quanta d'énergie par la matière. Les caractéristiques principales de chaque radiation électromagnétique sont : la longueur d'onde, le nombre d'onde, la période, la fréquence et l'énergie.

I.3.1. La longueur d'onde (λ) :

C'est la distance mesurée entre deux points d'ondes consécutifs qui sont en phase le long de la ligne de propagation de la lumière (**Figure I.3**). L'unité de λ dans le système international est le mètre. Mais cette unité est trop grande pour les ondes lumineuses. C'est pourquoi, on utilise généralement des unités plus petites comme : micromètre (μm), nanomètre (nm) et angstrom (\AA).

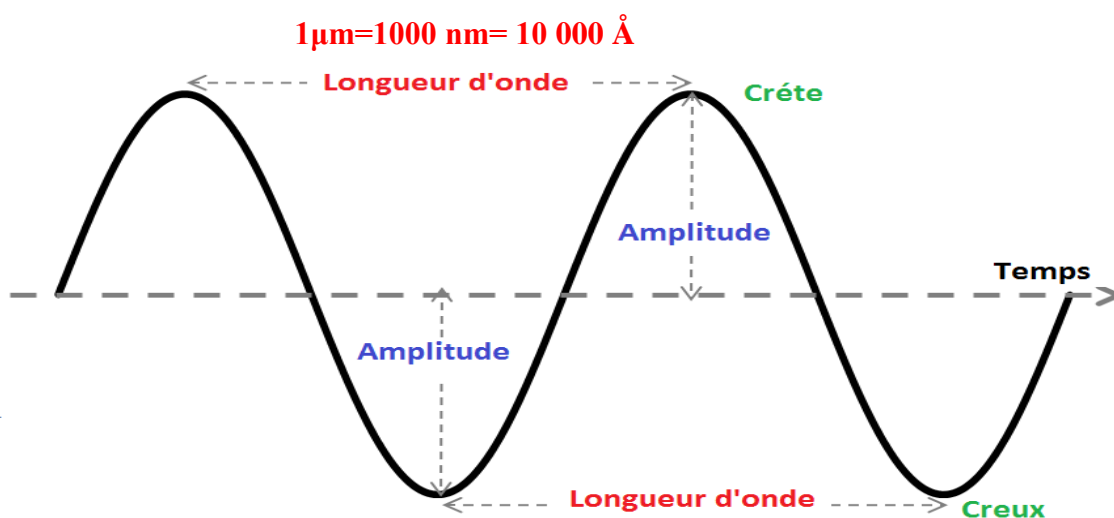


Figure I.3. Longueur d'onde.

I.3.2. Le nombre d'onde (σ)

Il désigne le nombre de longueur d'onde qu'il y a dans une radiation électromagnétique. On distingue le nombre d'onde dans le vide dont le symbole est $(\bar{\nu})$ et le nombre d'onde dans un milieu dont le symbole est « σ ». La relation entre longueur d'onde λ et le nombre d'onde est :

$$\sigma = \frac{1}{\lambda} \quad (\text{cm}^{-1}) \quad (\text{I.1})$$

I.3.3. La période (T)

Elle présente le temps nécessaire pour que l'onde effectue un cycle. Son unité est la seconde. Elle représente donc l'intervalle de temps entre deux points consécutifs en phase (Exp : deux crêtes). Son unité dans le système international (SI) est la seconde (s).

I.3.4. La fréquence (ν)

C'est le nombre de cycles de l'onde qui passent par un point donné en une seconde. Elle est aussi définie comme l'inverse de la période. Son unité est le hertz (Hz) (Hz), soit 1Hz = 1cycle/seconde

Elle est donnée par cette relation :

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \text{ on a aussi } \nu = \frac{1}{T} \quad (I.2)$$

Avec : T : c'est la période en seconde).

C : vitesse de lumière (C = 3. 10⁸ m/s).

I.3.5. L'énergie de la radiation

Chaque photon transporte une **quantité d'énergie** qui dépend directement de la **fréquence** de l'onde électromagnétique. Cette relation est donnée par la formule de **Planck** :

$$E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad (I.3)$$

h est la constante de PLANCK, h = 6.623. 10⁻²⁷ J.s.

I.4. Energie interne d'une molécule

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

$$E_{\text{totale}} = E_{\text{électronique}} + E_{\text{vibration}} + E_{\text{rotation}} \quad (I.4)$$

- **E_{élec}** : Energie électronique **associée aux élections** de la molécule dans leurs niveaux d'Energie.
- **E_{vib}** : Energie associée aux **déformations des longueurs de liaison** et des **angles** de valence autour d'une position d'équilibre.
- **E_{rot}** : Energie associée aux **mouvements de rotation** autour d'un axe passant par le centre d'inertie.

Les ordres de grandeurs sont très différents : Ee >>Ev >>Er

Les niveaux d'énergie électroniques, vibrationnels et rotationnels d'une molécule peuvent être représentés à l'aide d'un diagramme dans lequel chaque niveau d'énergie est schématisé par un **trait horizontal** (Figure I.4). Ces niveaux sont organisés verticalement en fonction de leur valeur énergétique (plus on monte dans le diagramme, plus l'énergie est élevée).

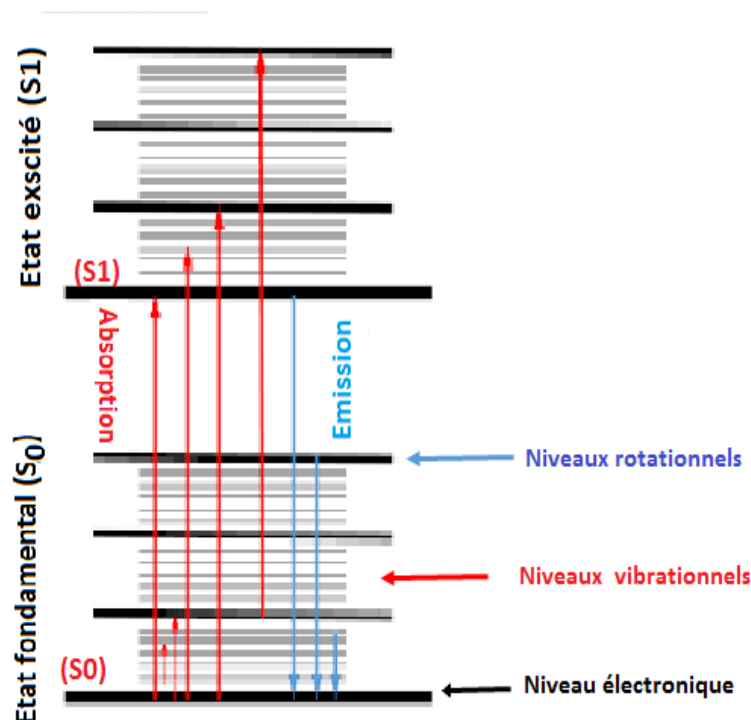


Figure I.4 : Diagramme d'énergie.

Chaque niveau est caractérisé par un **ensemble de nombres quantiques** qui définissent l'état de la molécule :

- **n**: **nombre quantique électronique**, qui détermine l'état énergétique des électrons.
- **v** : **nombre quantique vibrationnel**, qui correspond aux différents modes de vibration de la molécule.
- **J** : **nombre quantique rotationnel**, qui décrit les états de rotation de la molécule.

Remarque :

- Les atomes d'une molécule peuvent vibrer les uns par rapport aux autres. Ces niveaux d'énergie vibratoire sont également quantifiés. Une transition d'énergie vibratoire fait intervenir des radiations infrarouges.

- Une molécule possède des électrons pouvant occuper des niveaux d'énergie quantifiés ne pouvant prendre que certaines valeurs discrètes. Une transition d'énergie électronique fait intervenir des radiations visibles ou ultraviolettes

I.5. Le spectre électromagnétique

Les ondes électromagnétiques sont classées et réparties en fonction de leur longueur d'onde ou de leur fréquence ; cette répartition est appelée spectre électromagnétique. Ce spectre est représenté sur la **Figure I.5**. Il regroupe l'ensemble des types de **rayonnements électromagnétiques** présents dans l'univers.

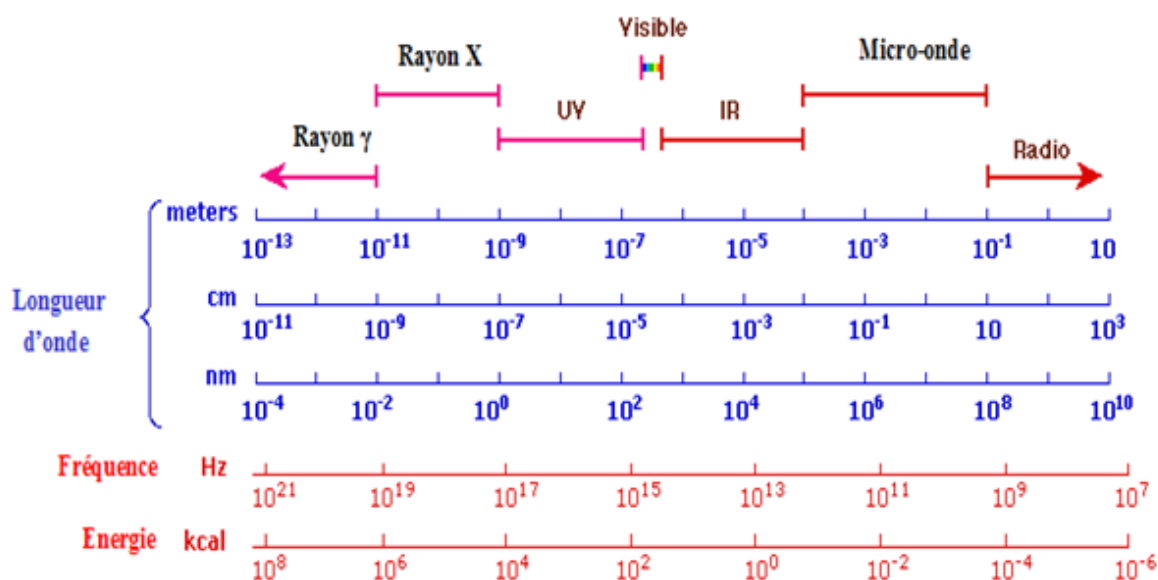


Figure I.5. Spectre électromagnétique.

L'observation de spectres électromagnétiques peut être réalisée sur un très large domaine de fréquences, allant des ondes radio aux rayons gamma. Le type de rayonnement observé dépend du **type de transition électronique** au sein de l'atome ou de la molécule.

- Lorsqu'un **électron périphérique** (situé dans les couches externes d'un atome ou d'une molécule) change de niveau d'énergie, cela se traduit par l'**absorption ou l'émission** de rayonnement dans le **domaine de l'ultraviolet (UV)** ou de la **lumière visible**.
- Lorsque c'est **les électrons proches du noyau** (électrons internes) qui sont impliqués dans la transition, l'énergie nécessaire est bien plus élevée : on observe alors un rayonnement dans le domaine des **rayons X**.

I.6. Classification des spectres

On distingue les spectres d'émission et d'absorption (**Figure I.6**).

I.6.1. Spectres d'absorption

L'absorption atomique est le phénomène observé lorsqu'un atome à l'état fondamental absorbe un rayonnement électromagnétique à une longueur d'onde spécifique et passe à un état excité. Il en résulte un spectre de raies noires sur fond clair (Spectre d'absorption) (**Figure I.6**).

I.6.2. Spectres d'émission

Quand des atomes ou molécules sont soumis à des effets thermiques intenses (chauffé) ou à des décharges électriques, ils peuvent absorber de l'énergie et deviennent excités. En retournant à leur état fondamental, ils peuvent émettre une radiation. L'énergie perdue lors de la transition est émise sous forme de lumière. Il en résulte un spectre de raies claires sur fond noir (**Figure I.6**).

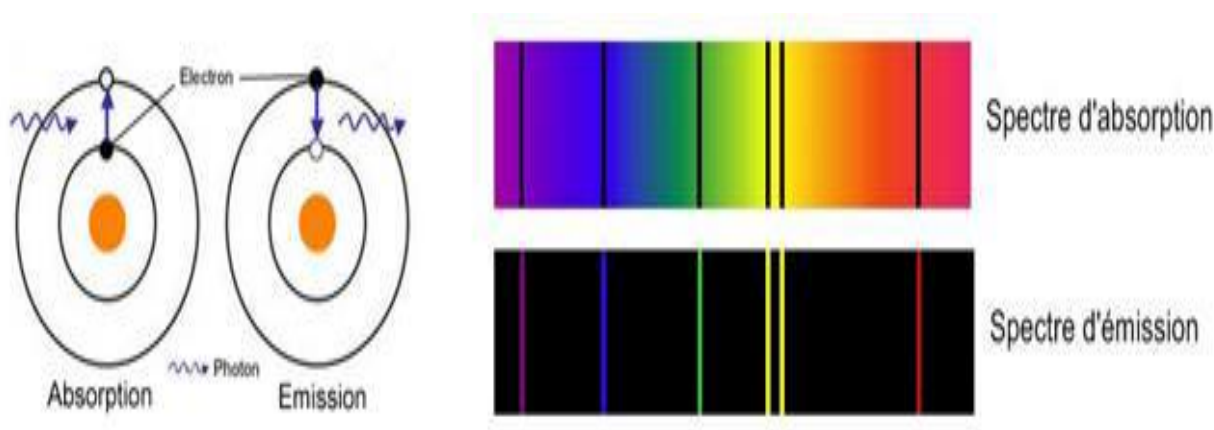


Figure I.6 : Spectre d'adsorption et d'émission

I.7. Domaine d'application de la spectroscopie

Les applications des techniques spectroscopiques couvrent différents domaines :

- Domaine d'analyse en biochimie et toxicologie.
- Domaine d'analyse environnementale.
- Domaine industriel (industrie pharmaceutique, chimique,...).

La spectroscopie permet :

- L'identification des molécules
- La détermination des structures

- L'étude des cinétiques de réaction
- La détermination des mécanismes réactionnels
- Les dosages
- Les analyses médicales (IRM, scintigraphie, mamographie,...).

I.8. Exercices d'application

Exercice N°1

1. Rappeler la relation entre la fréquence ν d'une onde et la longueur d'onde λ . En déduire que $1 \text{ Hz} = 1 \text{ s}^{-1}$.
2. La longueur d'onde d'une onde électromagnétique de fréquence très élevée est-elle plus grande ou plus petite que celle d'une onde de petite fréquence ?
3. Convertir les longueurs d'onde des ondes électromagnétiques suivantes en mètre : 500 nm ; 3,5 μm ; 15 pm ; 2,5 mm. Indiquer l'(les) onde(s) appartenant au domaine du visible.
4. Donner un ordre de grandeur, en hertz, des fréquences suivantes : 10^7 THz , 700 MHz, $6 \cdot 10^{15} \text{ Hz}$ et 5 GHz. Attribuer chacune des fréquences à un domaine d'application d'ondes électromagnétiques : Scanner, téléphonie mobile, fibroscopie, Wifi.
5. Calculer la longueur d'onde de l'onde électromagnétique qui existe dans un four micro-onde sachant que sa fréquence est $\nu = 2,45 \text{ GHz}$ et que la célérité des ondes électromagnétiques est $c = 3 \cdot 10^8 \text{ m/s}$. Justifier alors l'appellation de four micro-onde.

Solution :

1. La relation fondamentale entre λ et ν :

$$\nu = \frac{c}{\lambda}$$

Avec : C : vitesse de lumière ($C = 3 \cdot 10^8 \text{ m/s}$).

Pour déduire que $1 \text{ Hz} = 1 \text{ s}^{-1}$, on utilise l'analyse dimensionnelle :

$$\begin{cases} [\nu]: (\text{Hz}) \\ [C]: \text{m} \cdot \text{s}^{-1} \\ [\lambda]: (\text{m}) \end{cases} \quad [\nu] = \frac{[C]}{[\lambda]} \Rightarrow (\text{Hz}) = \frac{(\text{m} \cdot \text{s}^{-1})}{(\text{m})} = (\text{s}^{-1})$$

Donc : $(1 \text{ Hz}) = (1 \text{ s}^{-1})$.

2. La fréquence est inversement proportionnelle à la longueur d'onde, donc une **onde de fréquence très élevée** a une longueur **d'onde plus petite**.

3. La conversion des unités

Valeur de λ	500 nm	3,5 μm	15 pm	2.5 mm
Valeur en (m)	500. 10^{-9}	3,5. 10^{-6}	15. 10^{-12}	2.5. 10^{-3}
Valeur en (nm)	500	3,5. 10^3	15. 10^{-3}	2.5. 10^6
Domaine	Visible	Infrarouge	Rayon X	Micro-ondes

4. Les valeurs de la fréquence :

Valeur de ν	10^7 THz	700 MHz	$6 \cdot 10^{15}$ Hz	5 GHz
Valeur en (Hz)	10^{19}	$7 \cdot 10^{19}$	$6 \cdot 10^{15}$	$5 \cdot 10^9$
Domaine d'application	Scanner, radiographie X	Téléphone mobile	fibroscopie	Wifi

5. Calcul de la longueur d'onde du micro-onde :

$$\lambda = \frac{c}{\nu} = \frac{3 \cdot 10^8}{2,45 \cdot 10^9} = 0,122 \text{ m}$$

Cette longueur d'onde appartient au domaine des micro-ondes, d'où l'appellation four à micro-ondes.

Exercice N°2 :

1. Une station FM émet sur une onde radio de 105,6 MHz. Si, dans l'air, les ondes électromagnétiques diffèrent très peu de c . Quelle est la valeur de la célérité de l'onde. Quelle est la longueur d'onde correspondante ?
2. Une onde se propage à la vitesse de 40 m/s. Sa fréquence est de 50 Hz. Quelle est sa longueur d'onde ?
3. Une onde sinusoïdale a pour longueur d'onde $\lambda = 3,0 \text{ mm}$. Sa célérité est $V = 2,5 \times 10^{-6} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$. Calculer sa période puis sa fréquence.

Solution :

$$\lambda = \frac{c}{\nu} = \frac{3 \cdot 10^8}{105,6 \cdot 10^6} = 2,84 \text{ m}$$

2. Calcul de la longueur d'onde :

$$V = 40 \text{ m/s} \quad \text{et} \quad \nu = 50 \text{ Hz}$$

$$\lambda = \frac{c}{\nu} = \frac{40}{50} = 0.8 \text{ m}$$

4. Calcul de la fréquence et la période

$$\begin{cases} \lambda = 3 \text{ nm} \\ \nu = 2.5 \cdot 10^{-6} \text{ m/s} \end{cases} \quad \nu = \frac{2.5 \cdot 10^{-6}}{3 \cdot 10^{-9}} = 833.66 \text{ s}^{-1}$$

$$\text{La période : } T = \frac{1}{\nu} = \frac{1}{833.33} = 0.0012 \text{ s}$$

Chapitre II : La Spectroscopie UV-Visible

II.1. Définition

La **spectroscopie d'absorption UV-Visible**, également appelée **spectrométrie ultraviolet-visible** est l'une des méthodes d'analyses de la spectroscopie moléculaire. Elle est basée sur la capacité des molécules à absorber certaines radiations lumineuses de longueur d'onde bien déterminée.

II.2. Domaine UV-visible

Le domaine UV-Visible s'étend environ de 100 à 800 nm (**Figure II.1**).

- Ultraviolet lointain (100 nm – 200 nm),
- Proche ultraviolet (200 nm - 400 nm) ,
- Visible (400 nm - 800 nm).

La plupart des spectrophotomètres commerciaux couvrent la gamme allant de 200 à 800 nm.

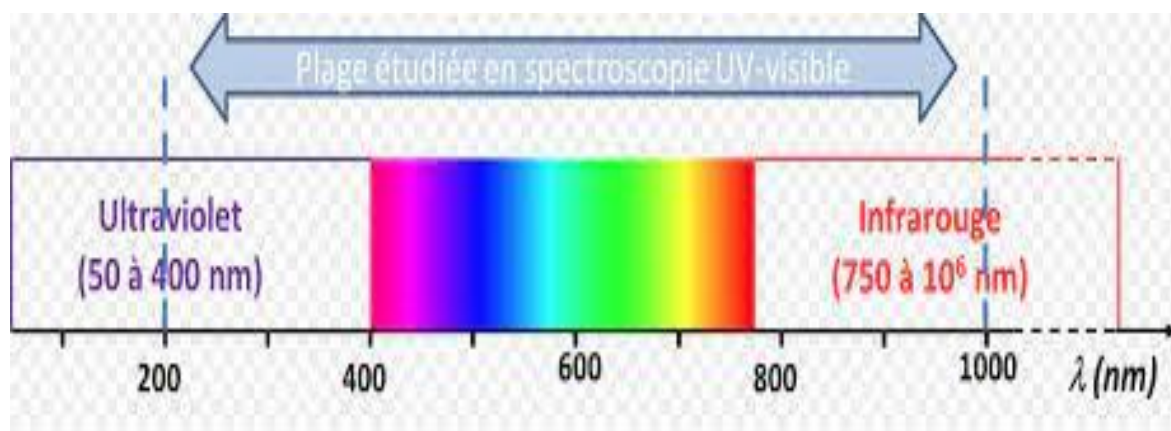


Figure II.1 : Domaine du visible

Le domaine 100 nm à 190 nm est aussi celui de l'UV. Il n'est pas utilisé en analyse courante car l'oxygène et l'anhydride carbonique absorbent dans ce domaine, ce qui nécessite l'utilisation d'un appareillage spécial. Le domaine **100-190 nm** est appelé l'**UV du vide**.

II.3. Principe de la spectroscopie UV - Visible

La technique de spectrophotométrie ou d'absorptionmétrerie concerne l'absorption d'énergie électromagnétique pour des radiations appartenant au domaine du visible et de l'ultraviolet. Lorsqu'un photon de longueur d'onde λ (200-800 nm) et de fréquence ν , est absorbé par la matière, il s'opère une transition : un électron passe d'un **niveau d'énergie fondamental (E_1)** à un **niveau excité (E_2)**, à condition que l'énergie du photon corresponde exactement à la différence d'énergie entre ces deux niveaux (**Figure II.2**). Cette relation est exprimée par la formule de Planck-Einstein :

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda} \quad (II.1)$$

h : constante de Planck ($h = 6,63 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$)

c : vitesse de la lumière dans le milieu où se propage l'onde ($c = 3 \cdot 10^8 \text{ m/s}$ dans le vide)

λ : longueur d'onde du rayonnement, exprimée habituellement en nanomètres (nm).

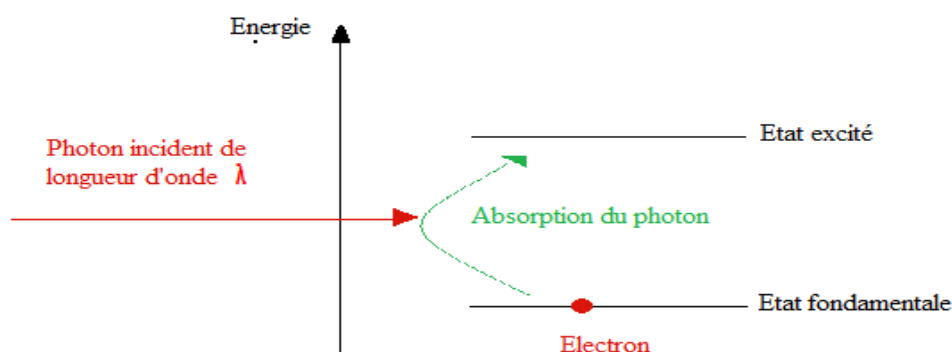


Figure II.2. Transition électronique.

II.4. Types de transitions électroniques

Soumis à un rayonnement dans cette gamme de longueurs d'onde, les **molécules**, les **ions** ou les **complexes** sont susceptibles de subir une ou plusieurs **transitions électroniques**. Ce sont des transitions des électrons **des orbitales moléculaires (OM) liantes ou non liantes** remplies vers des orbitales **anti-liants non remplies** (**Figure II.3**).

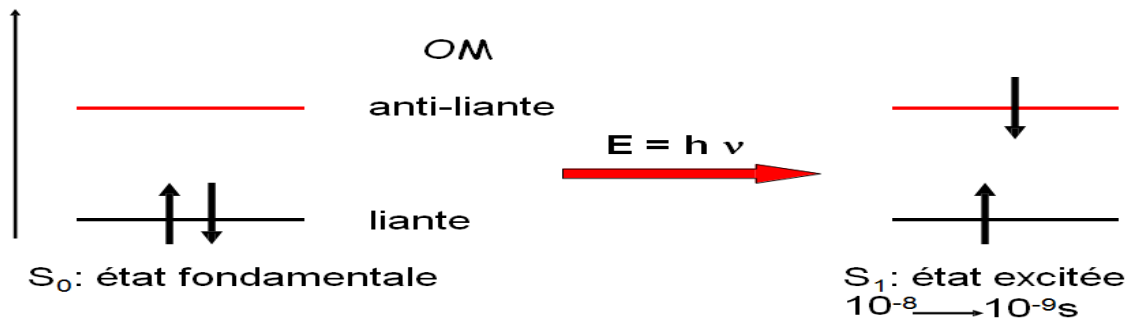
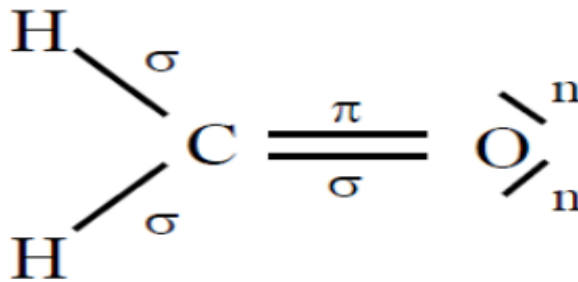


Figure II.3. Type d'orbitales moléculaires et transition électronique

Les atomes H, C, N, O, les plus fréquemment rencontrés pour les molécules organiques, sont à l'origine de liaison σ et π qui conduisent avec les doublets non-liants n à des transitions électroniques se traduisant par des absorptions dans le proche UV. Chacune est repérée par sa position médiane (en nm) et par son coefficient d'absorption molaire ϵ ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) calculé pour cette position et avec le solvant utilisé.



Les différentes transitions électroniques sont représentées sur la **Figure II.4** :

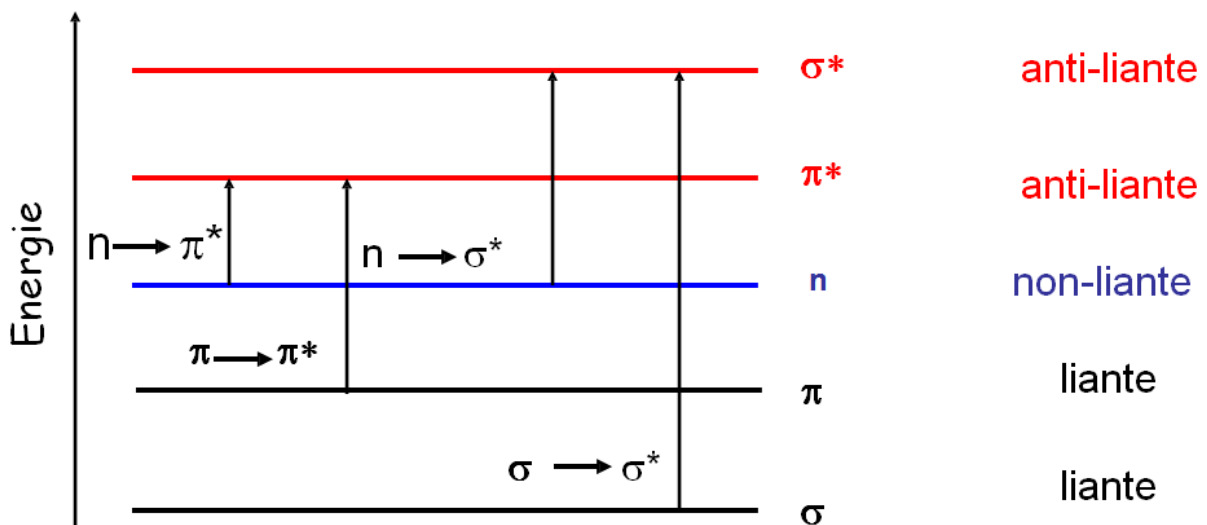


Figure II.4 : Type de transition électroniques

II.4.1. Transition $\sigma \rightarrow \sigma^*$

La grande stabilité des liaisons σ des composés organiques se traduit par un écart important entre les niveaux orbitaux frontières correspondants. Cette transition d'un électron d'une OM liante σ dans une OM antiliante σ^* **demande beaucoup d'énergie** : elle est intense et **située dans le lointain UV** (≈ 150 nm).

Exemple : hexane : $\lambda_{\max} = 135$ nm, $\epsilon = 10\,000$.

II.4.2. Transition $\pi \rightarrow \pi^*$

Caractéristique des composés qui possèdent **une double liaison ou un système conjugué**. Elle correspond au passage d'un électron d'un orbital moléculaire liant de type π à un orbital non liant π^* . Cette transition nécessite une énergie relativement faible, ce qui se traduit par une **forte absorption** dans la région de l'**ultraviolet (vers 170-290 nm)**.

Exemple : éthylène : $\lambda_{\max} = 170$ nm, $\epsilon = 16\,000$,

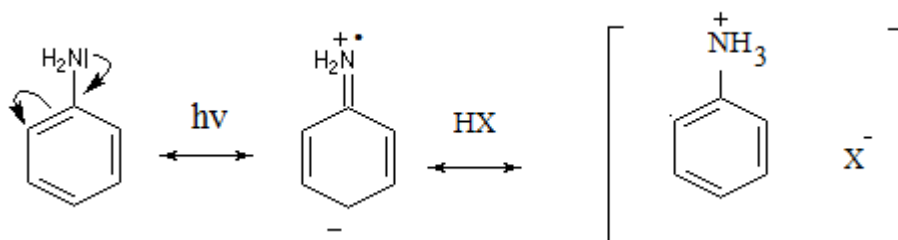
Éthanal : $\lambda_{\max} = 180$ nm, $\epsilon = 10\,000$).

II.4.3. Transition $n \rightarrow \sigma^*$

Le transfert d'un électron **d'une paire libre** (doublet n) des atomes (O, N, S, X) à un niveau σ^* conduit à **une transition d'intensité moyenne**, observée **à l'extrême limite du proche UV (150-250 nm)**.

Exemple : Elle se situe vers **180 nm** pour **les alcools**, vers **190 nm** pour **les éthers ou les dérivés halogénés** et vers **220 nm** pour **les amines**.

Ci-dessous un exemple de transition $n \rightarrow \sigma^*$ d'une amine primaire. L'absorption correspondant à cette transition disparaît lorsqu'on ajoute un équivalent d'un acide protonique HX par suite de formation d'un sel d'ammonium.



II.4.4. Transition $n \rightarrow \pi^*$

Ce sont des transitions **peu intenses**, situées entre **270 et 295 nm**, rencontrées dans le cas de molécules comportant **un atome avec un doublet non liant (hétéroatome) appartenant à un système insaturé** (exp : C=O ou N=O).

Exemple : éthanal : $\lambda_{\max} = 290 \text{ nm}$, $\epsilon = 15$

II.5. Relation entre l'absorbance et la structure de la molécule

II.5.1. Groupements chromophores

Un **chromophore** est un groupe fonctionnel ou une partie d'une molécule responsable de l'absorption de la lumière dans le spectre visible ou ultraviolet, ce qui donne à la molécule sa couleur. Il absorbe les photons à certaines longueurs d'onde, ce qui provoque une transition électronique, généralement de type $\pi \rightarrow \pi^*$ ou $n \rightarrow \pi^*$.

Les chromophores sont associés à des systèmes conjugués (liaisons doubles alternées ou cycles aromatiques), qui permettent aux électrons d'être plus mobiles et d'absorber l'énergie de la lumière dans certaines gammes de longueurs d'onde. Des groupes comme **C=O** (carbonyle), **C=N** (imine), **N=N** (azo), **-NO₂** (nitro), etc., peuvent également fonctionner comme chromophores en raison de leurs capacités à absorber dans le spectre UV-visible.

Remarque :

La couleur d'un composé dépend des longueurs d'onde absorbées par ses chromophores (groupes fonctionnels comme les cétones, amines, dérivés nitrés, etc.).

Si une molécule possède plusieurs chromophores isolés, c'est-à-dire **n'interagissant pas l'un sur l'autre car séparés** par au moins deux liaisons simples, leurs effets s'additionnent.

Si ces chromophores sont **voisins et conjugués**, ils interagissent l'un sur l'autre, ce qui **modifie les niveaux d'énergie électroniques**.

- Déplacement vers les grandes longueurs d'onde (*effet bathochrome*).
- Augmentation de l'absorption (*effet hyperchrome*)

II.5.2. Groupements auxochromes

A côté des chromophores, on distingue les groupements auxochromes (**Tableau II.1**) qui sont des atomes comme **les halogènes**, ou groupements d'atomes comme les restes **amino (-NH₂)**,

hydroxyle(-OH) qui contiennent des électrons moins mobiles que ceux des chromophores et qui, sans être eux-mêmes absorbants dans l'UV, ont pour effet d'augmenter (effet bathochrome) ou de diminuer l'absorption des chromophores (effet hypsochrome). L'action des groupements auxochromes dépend de la position par rapport à celle de chromophore et s'effectue par des effets d'induction électrostatique ou de résonance électronique (Figure II.5).

- *Effet bathochrome* : correspond à un déplacement du maximum d'absorption d'une bande vers des longueurs d'onde plus grandes
- *Effet hypsochrome* : déplacement des bandes vers les courtes longueurs d'onde (c'est le phénomène inverse de l'effet bathochrome).
- *Effet hyperchrome* : correspond à l'augmentation du coefficient d'extinction molaire au maximum d'absorption (augmentation de l'intensité d'absorption).
- *Effet hypochrome* : diminution de l'intensité d'absorption.

Ces effets sont illustrés sur la figure suivante :

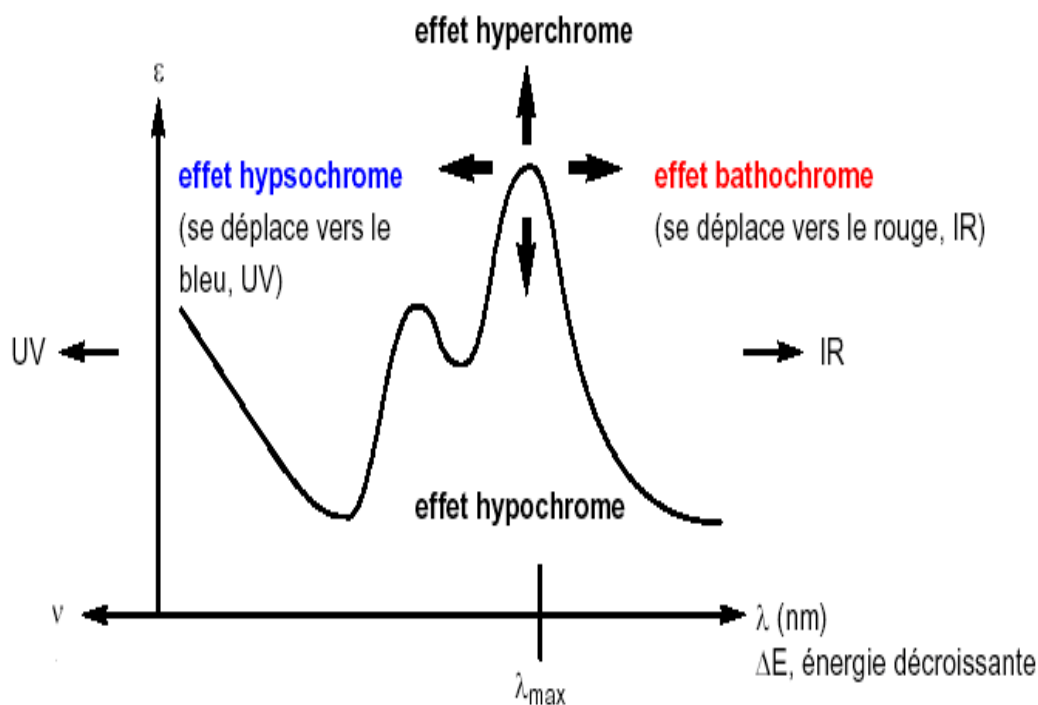


Figure II.5 : Les différentes propriétés des spectres UV-visible.

Tableau II.1: Principaux groupes chromophores et auxochromes classés par intensité croissante.

Groupes chromophores	Groupes auxochromes
----------------------	---------------------

Azo(-N=N-)	Amino(-NH ₂)
Nitroso(NO- ou -N-OH)	Méthylamino(-NHCH ₃)
Carbonyl (=C=O)	Diméthylamino(-N(CH ₃) ₂)
Vinyl(-C=C-)	Hydroxyl (HO-)
Nitro(-NO ₂ ou =NO-OH)	Alkoxy (-OR)
Sulphure (>C=S)	Groupes donneurs d'électrons

Exemples :

- **Molécule d'aniline** : Le groupe **-NH₂** (auxochrome) est lié au noyau benzénique (chromophore), ce qui modifie la couleur de la molécule.
- **Colorant azoïque** : Le groupe **-N=N-** (azo) est le chromophore, et des groupes comme **-OH** (hydroxy) ou **-NH₂** (amino) sont des auxochromes. Ces derniers augmentent l'intensité de la couleur et modifient la teinte.

II.6. Le spectre UV- visible

On appelle spectre d'adsorption d'une substance en solution, la courbe traçant la transmittance **T** ou l'absorbance **A** en fonction de la **longueur d'onde** (nanomètres) en abscisses.

- La transmittance : représente le rapport entre l'intensité lumineuse transmise (**I_t**) et l'intensité incidente (**I₀**) (**Figure II.6**), pour une longueur d'onde donnée. **T** s'exprime par un nombre compris entre 0 et 1 ou sous forme de pourcentage :

$$T = \frac{I_t(\lambda)}{I_0(\lambda)} \quad \text{ou} \quad \% T = \frac{I_t(\lambda)}{I_0(\lambda)} \cdot 100 \quad (\text{II.2})$$

$$\text{L'absorbance est définie par : } A = -\log T = \log\left(\frac{I_0(\lambda)}{I_t(\lambda)}\right) \quad (\text{II.3})$$

L'absorbance est une grandeur sans dimension, mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.

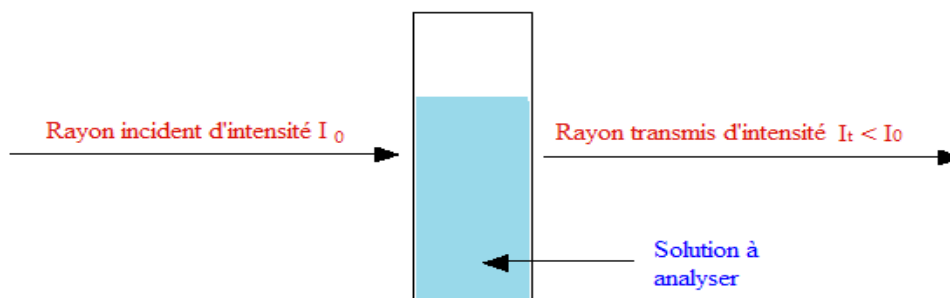


Figure II.6. Transmission et absorption d'un rayonnement à travers une solution

La **Figure II.7** donne un exemple de spectre d'absorption d'une protéine.

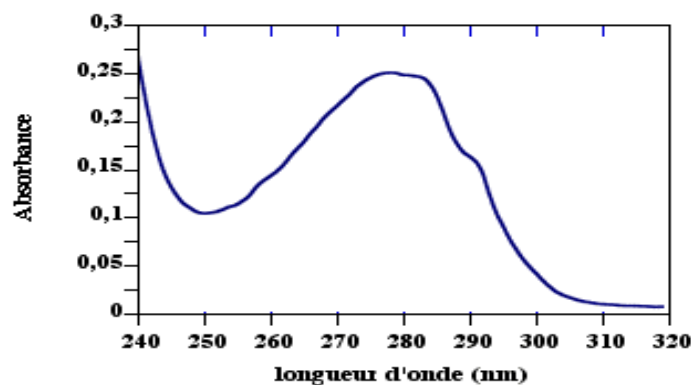


Figure II.7 : Spectre d'absorption d'une protéine.

Bien que le spectre parait simple, il résulte de la somme des absorptions des acides aminés chromophores présents dans la protéine (comme le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine).

Les deux paramètres importants en spectroscopie UV-Visible sont **la longueur d'onde du maxima d'absorption** et **l'intensité** de son absorption (coefficient d'extinction molaire). Ainsi dans le cas de cette protéine, on note un maxima d'absorption à 280 nm et un épaulement à 295 nm.

Remarque : un épaulement est une bosse secondaire, située à **côté d'un pic principal**. Il indique qu'il existe une **autre transition électronique, moins intense**, partiellement masquée ou proche en énergie de la transition principale (permet de différencier les contributions des chromophores (acides aminés)).

➤ **6.1. La relation entre le spectre d'absorption et la couleur**

- Quand une espèce chimique absorbe une seule région du spectre visible, sa **couleur perçue** correspond à la **couleur complémentaire** de la **lumière absorbée** (Tableau II.2).
- Deux couleurs sont complémentaires si leur **superposition** donne une **lumière blanche**.

Tableau II.2 : Absorbance et couleur.

Longueurs d'onde	Couleur absorbée	Couleur complémentaire
650-780	rouge	Bleut-vert
595-650	orange	Bleu turquoise
560-595	Jaune-vert	Pourpre
500-560	Vert	Rouge pourpre
490-500	Bleu-vert	Rouge
480-490	Turquoise	Orange
435-480	Bleu	Jaune
380-435	Violet	Jaune-vert

Exemple :

1. Une solution de CoSO_4 est de couleur bordeaux-magenta. On peut supposer qu'elle absorbe le **vert** puisque le **magenta** résulte du mélange de **bleu** et **rouge**. Son absorption se situerait alors entre 500 et 560 nm.
2. Si une substance en solution absorbe à $\lambda=540$ nm, cela signifie que la seule couleur absorbée est le **vert**, et l'œil voit la solution **rouge pourpre**.

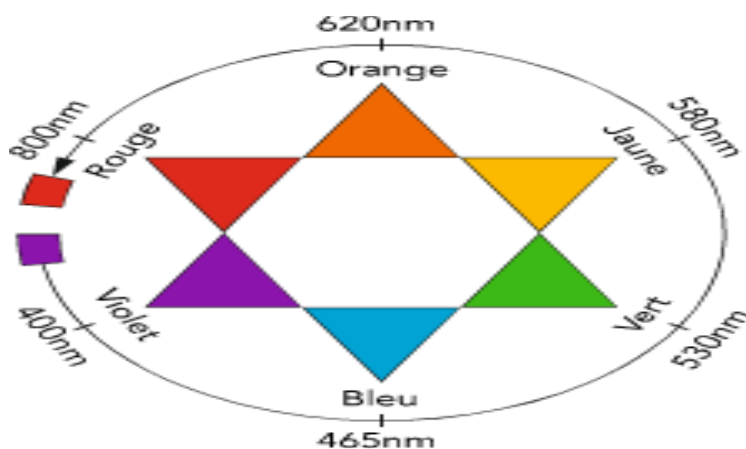
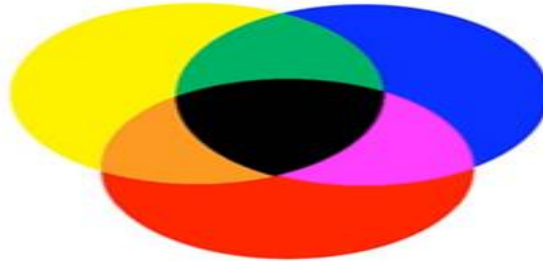


Figure II.8 : Cercle chromatique

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

Exemple :

Les ions chrome (III), Cr^{3+} , absorbent dans **le violet** ($\lambda_{\text{max}} = 430 \text{ nm}$), couleur complémentaire **du jaune**, et dans **l'orangé** ($\lambda_{\text{max}} = 640 \text{ nm}$), couleur complémentaire du **bleu** : ils donnent donc des solutions **vertes**



II.7. Appareillage

L'étude des absorptions nécessite l'utilisation d'un appareil appelé **spectrophotomètre UV-Visible**. Il est constitué des éléments suivants :

II.7.1. Source de lumière monochromatique

Le rôle de la source est de fournir la radiation lumineuse.

- **Dans le domaine du visible** (400- 800 nm) : la source de lumière utilisée est une lampe à incandescence équipée d'un filament de tungstène qui se chauffe jusqu'à 3000K (**Figure II.9**). l'enveloppe e en verre de silice (quartz), matériaux résistant à la chaleur.



Figure II.9 : Lampe à incandescence équipée d'un filament de tungstène.

- **Dans le domaine de l'ultra-violet**, on utilise des lampes à hydrogène (H_2) ou a arc au deutérium (isotope de l'hydrogène) (**Figure II.10**).



Figure II.10 : Lampe à deutérium pour analyse spectrale

II.7.2. Monochromateur (sélection de la longueur d'onde)

Le monochromateur a pour rôle de disperser le rayonnement polychromatique provenant de la source et d'obtenir des radiations monochromatiques (c'est-à-dire il sépare les différentes longueurs d'onde d'un faisceau lumineux). Il y a 2 types de monochromateur (**Figure II.11**): **dispersion** de la lumière par **un prisme (2)** ou **diffraction** de la lumière par **un réseau (1)** ou par **un cristal**.

Afin d'éviter de détériorer l'échantillon avec le rayonnement UV provenant de la source, celui-ci est placé à la sortie du monochromateur, et ne sera donc traversé que par un domaine étroit de longueurs d'onde.

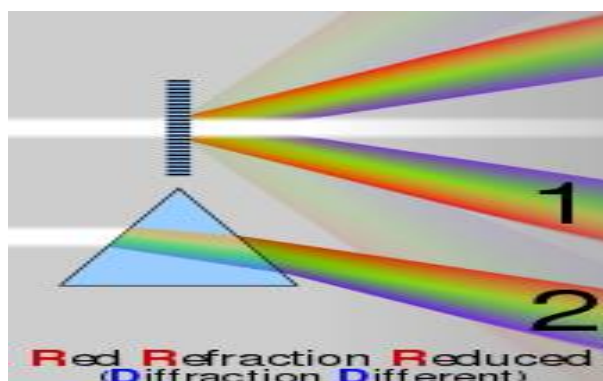


Figure II.11 : Réfraction et dispersion de la lumière dans un prisme.

II.7.3. Diviseur de faisceau ou photomètre

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

II.7.4. Cellule à échantillon

La solution à étudier doit être placée dans une cellule ou cuve. Les cuves ont différentes épaisseurs et sont en **quartz** pour le domaine **UV-visible (200 – 400nm)**. Le **verre** est réservé aux mesures dans le domaine **visible (400 - 800 nm)** uniquement.

Précautions d'usage :

- Ne pas mettre les doigts sur les faces dépolies des cuves
- Bien orienter la cuve par rapport à l'axe du faisceau lumineux
- Supprimer les bulles d'air

II.7.5. Détecteur

Le détecteur convertit la lumière reçue en courant. Il est relié à un enregistreur qui permet de tracer un spectre d'absorption de l'échantillon analysé.

II.8. Classification des spectrophotomètres UV-Visible :

On peut les classer en deux catégories :

II.8.1. Les appareils à simple faisceau : eux-mêmes subdivisés en appareils à montage optique direct (**Figure II.12**) ou à montage optique inversé (**Figure II.13**) ;

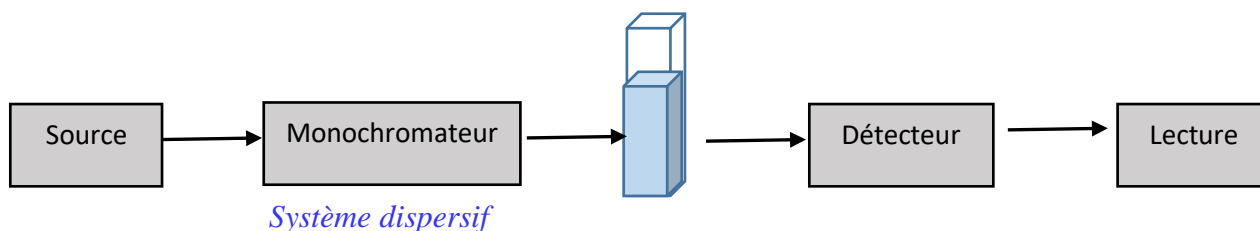


Figure II.12 : spectromètre à **montage direct**

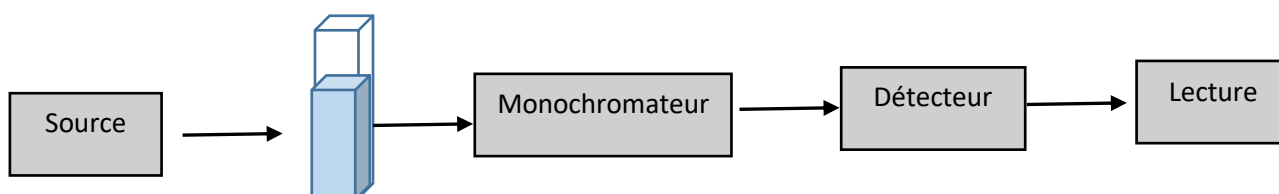


Figure II.13: spectromètre à **montage inversé**

II.8.2. Les appareils à double faisceau, à montage optique direct

La **Figure II.14**, représente le schéma de principe d'un spectromètre d'absorption UV-Visible double faisceau. La différence essentielle entre un spectrophotomètre à faisceau unique et un spectrophotomètre à double faisceau réside dans la façon dont le faisceau lumineux est utilisé :

- Dans un spectrophotomètre à **faisceau unique**, l'**ensemble** du faisceau lumineux **traverse** successivement l'échantillon, et une mesure de référence (blanc) est faite séparément.

→ Dans un appareil à **double faisceau**, le faisceau est **divisé** en deux parties : Une partie traverse la cuve contenant **l'échantillon** et l'autre partie traverse la cuve contenant le **blanc**.

Le choix des appareils va dépendre des problèmes à résoudre : on peut dire que les appareils à double faisceau sont les appareils les plus performants en termes de possibilités d'analyses diverses.

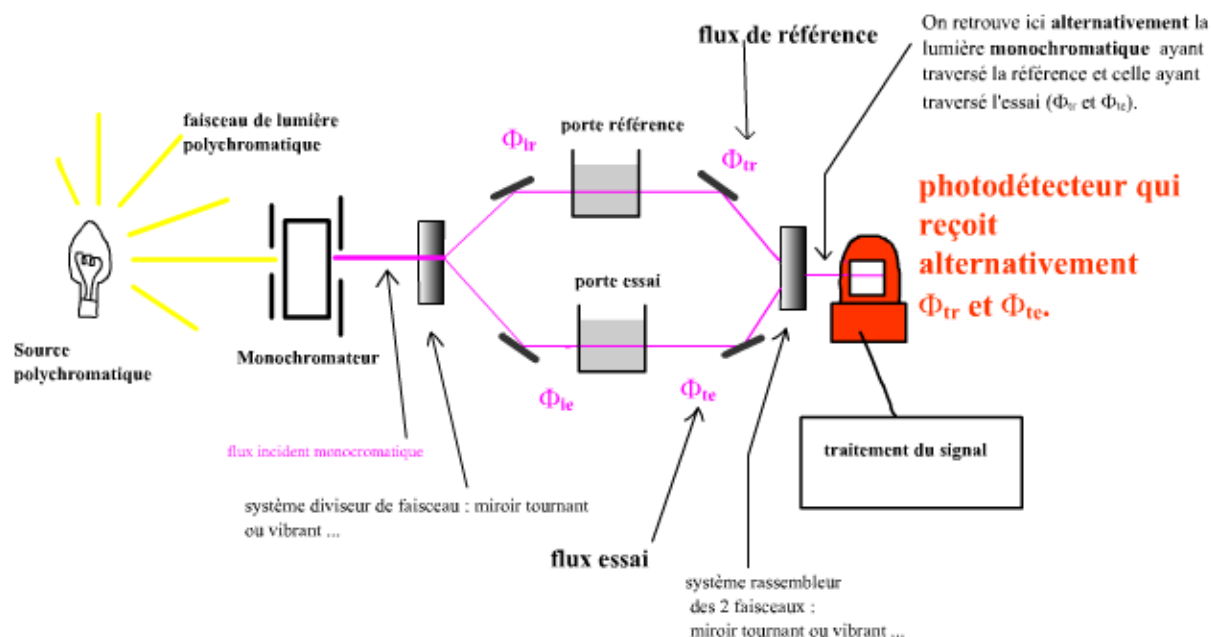


Figure II.14 : Spectromètre à **double faisceau**

II.9. Applications de la spectroscopie UV-visible

II.9.1. Analyse qualitative

La méthode détecte les groupements fonctionnels chromophores mais **ne permet pas l'identification de certaine des molécules**. Elle doit toujours être complétée par d'autres informations physiques d'origine spectrales (IR, RMN, masse) ou physico-chimiques comme les points de fusion, les points d'ébullition, les réactions colorées....

II.9.2. Analyse quantitative

Les performances de la spectrophotométrie en font une méthode de choix pour l'analyse quantitative. Les limites de détection sont comprises entre **10^{-4} et 10^{-6} mol. L⁻¹**. Elles varient

avec les valeurs du coefficient d'absorption molaire. L'exactitude et la reproductibilité varient de 1 à 4%. L'analyse quantitative par la spectrophotométrie UV-visible est très employée grâce à l'utilisation de **la loi de Beer-Lambert**.

La loi de Beer Lambert relie l'absorbance à la concentration d'un composé en solution (pour de faibles concentrations et à une longueur d'onde donnée) :

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot \ell \cdot C \quad (II.4)$$

Avec :

A_{λ} : est l'absorbance (paramètre sans dimension), ℓ est l'épaisseur (en **cm**) de la solution traversée dont la concentration molaire est C (**mol. L⁻¹**).

ε_{λ} : est le coefficient d'absorption molaire. Il dépend de la substance X étudiée, de la longueur d'onde, de la température et de la nature du solvant. Il s'exprime en **L.mol⁻¹, cm⁻¹**.

II.9.3. Additivité des absorbances

Pour une solution contenant un mélange de substances absorbantes X_i ($i=1$ à n), chacune présente à une concentration C_i , l'absorbance totale de la solution est la somme des absorbances dues à chaque substance absorbante :

$$A(\lambda) = \sum_i \varepsilon_i(\lambda) \cdot \ell \cdot C_i \quad (II.5)$$

Exemple : analyse d'un mélange de trois substances et enregistrement de l'absorbance à trois longueurs d'ondes : $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$:

$$\text{a } \lambda_1 : A_1 = \varepsilon_{1A} \cdot l \cdot C_A + \varepsilon_{1B} \cdot l \cdot C_B + \varepsilon_{1C} \cdot l \cdot C_C \quad (II.6)$$

$$\text{a } \lambda_2 : A_2 = \varepsilon_{2A} \cdot l \cdot C_A + \varepsilon_{2B} \cdot l \cdot C_B + \varepsilon_{2C} \cdot l \cdot C_C \quad (II.7)$$

$$\text{a } \lambda_3 : A_3 = \varepsilon_{3A} \cdot l \cdot C_A + \varepsilon_{3B} \cdot l \cdot C_B + \varepsilon_{3C} \cdot l \cdot C_C \quad (II.8)$$

La méthodologie ne convient qu'au mélange de substance dont les spectres sont significativement différents.

II.10. Domaines d'utilisation de l'UV-Visible

La spectrophotométrie est une méthode facile à mettre en œuvre. Elle constitue le mode de détection le plus courant en chromatographie liquide. De nombreuses applications ont été développées en particulier :

- Dans le domaine **pharmaceutique** telles que : contrôle de la **pureté des matières premières** et la **détermination de la teneur en principe actif** dans les formes pharmaceutiques.
- Dans l'**agroalimentaire**, l'environnement ou la toxicologie (Détection de **contaminants**, **additifs**, ou **polluants** et analyse de **résidus chimiques** dans les sols, l'eau ou les aliments).
- Il est utilisé en **biologie cellulaire**, lors de la réalisation du test MTT (méthode rapide de numération des cellules vivantes).
- En **biochimie et analyse clinique** : il permet donc de réaliser des dosages biochimiques de nombreux paramètres sériques ou plasmiques (Exp : glucose, urée, créatinine, calcium, albumine...) et des études de cinétique de réaction (détermination d'activité enzymatique).
- En **microbiologie**, Estimation de la **densité cellulaire** d'une culture bactérienne par turbidimétrie, en mesurant l'absorbance à 600 nm.

II.11. Exercices d'application

Exercice N°1 :

Une solution contenant 0,5 mg de caféine dans 100 mL d'eau, absorbe 48% de la lumière, pour $\lambda = 222$ nm (cuve de 1 cm de trajet optique).

1. Quelle est son absorbance pour cette longueur d'onde ?
2. Connaissant la formule de composition de la caféine ($C_8H_{10}N_4O_4$), calculer son coefficient d'absorbance molaire ϵ .

Solution :

1. Calcul de l'absorbance :

On a :

$$\left\{ \begin{array}{l} I_a = 48\% \text{ de } I_0 \text{ (l'intensité absorbée)} \\ I_0 = I_a + I_t \Rightarrow I_t = I_0 - I_a \\ A = -\log T = -\log\left(\frac{I_t(\lambda)}{I_0(\lambda)}\right) = \log\left(\frac{I_0(\lambda)}{I_t(\lambda)}\right) \end{array} \right.$$

$$A = -\log\left(\frac{I_t(\lambda)}{I_0(\lambda)}\right) = -\log\left(\frac{I_0 - I_a}{I_0}\right) = -\log\left(1 - \frac{I_a}{I_0}\right)$$

Donc :

$$A = -\log(1 - 0.48) = 0.284$$

2. Calcul du coefficient d'absorbance :

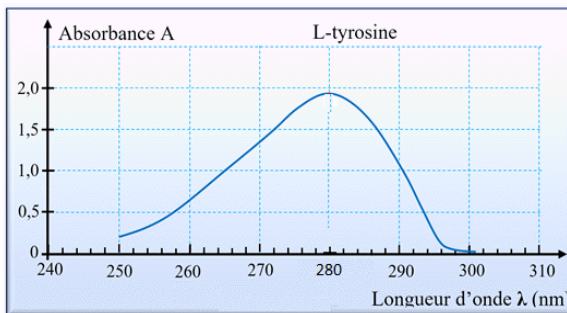
$$A = \varepsilon \cdot \ell \cdot C \Rightarrow \varepsilon = \frac{A}{\ell \cdot C}$$

$$C = \frac{m}{V} = \frac{0.5 \cdot 10^{-3}}{0.1} = 0.0221 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$\varepsilon = \frac{0.284}{1 \cdot 0.0221 \cdot 10^{-3}} = 12.85 \cdot 10^{+3} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Exercice N°2 :

La L-tyrosine $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$ peut être consommée en complément alimentaire sous forme de gélules pour lutter contre le stress et l'anxiété.



1. Déterminer λ_{max} de L-tyrosine à partir du spectre ci-dessus.
2. La solution L-tyrosine est-elle colorée ?

Les absorbances mesurées à la valeur du λ_{max} de L-tyrosine des cinq solutions étalons de concentration C sont rassemblés dans le tableau ci-dessous :

C (mmol.l ⁻¹)	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
A	0,4	0,78	1,18	1,48	1,84

3. Tracer la courbe d'étalonnage de L-tyrosine.

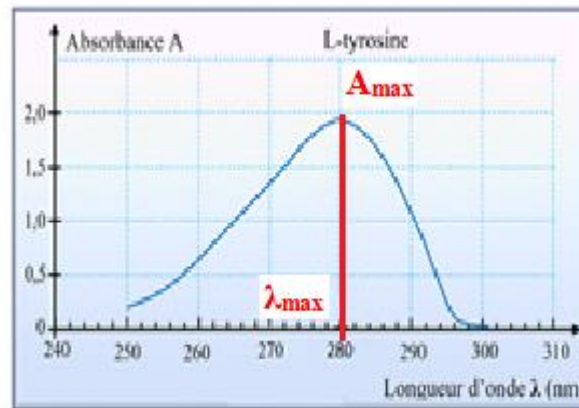
Dissoudre totalement une gélule de L-tyrosine dans un volume $V_S = 2,00 \text{ L}$ d'eau, soit S la solution obtenue. Mesurer, dans les mêmes conditions, l'absorbance de la solution S est $A(S) = 1$.

4. Déterminer la concentration molaire de cette solution

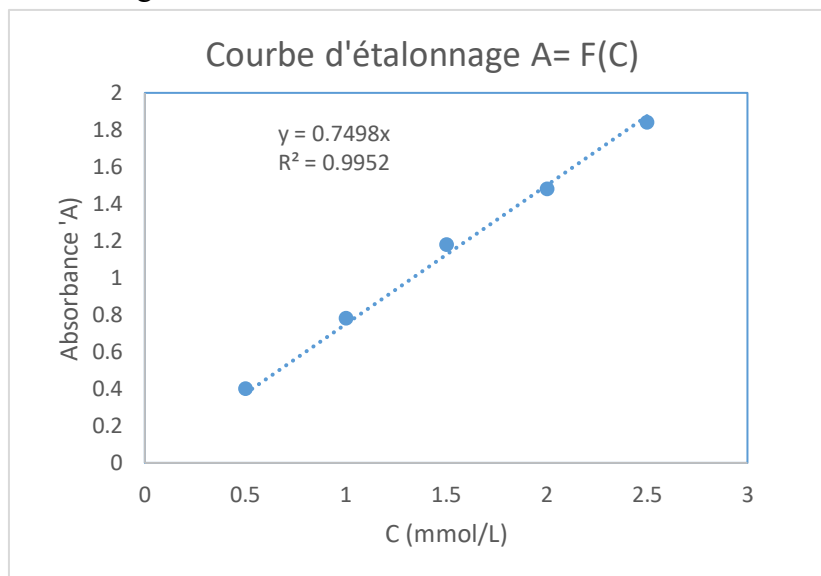
5. La masse de L-tyrosine contenue dans la solution S est-elle cohérente avec la masse indiquée dans l'étiquette ? - **Données** : Masse molaire : M (tyrosine) = $181,0 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Solution :

6. La longueur d'onde maximale est de 280nm.



7. La solution de L-tyrosine n'est pas colorée, car la longueur d'onde maximale déterminée à partir du spectre est de 280 nm, cette valeur appartient au domaine de l'ultraviolet.
8. La courbe d'étalonnage :



9. Détermination la concentration molaire d'une solution

D'après la courbe d'étalonnage, on a $A = 0.7498.C$, donc pour une absorbance de 1, la concentration est égale à $C = 1/0.749 = 1.33 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

10. Détermination de la masse de L-tyrosine qu'il y a dans cette solution :

$$C = \frac{m}{M \cdot V} \Rightarrow m = C \cdot V \cdot M = 1.33 \cdot 10^{-3} \cdot 2.181 = 482.10^{-3} \text{ g} = 482 \text{ mg}$$

Chapitre III : La Fluorimétrie

III.1. Définition

La spectrofluorimétrie (fluorimétrie) moléculaire est une **méthode d'analyse quantitative** basée sur la mesure de l'intensité de la **lumière émise** par fluorescence par une substance après excitation par des photons provenant du domaine du visible ou du proche UV.

III.2. La luminescence

La luminescence est la propriété qu'ont certaines substances **de restituer** sous forme de **photons (UV-VIS-IR)** d'origine non thermique. Contrairement à l'incandescence (lumière produite par la chaleur), la luminescence résulte d'une excitation électronique suivie d'un retour à un état d'énergie plus bas. Il s'agit donc de la **désactivation** d'une molécule **excitée** vers un **état énergétique moins élevé**. En fonction du mode d'excitation on distingue (**Figure III.1**) :

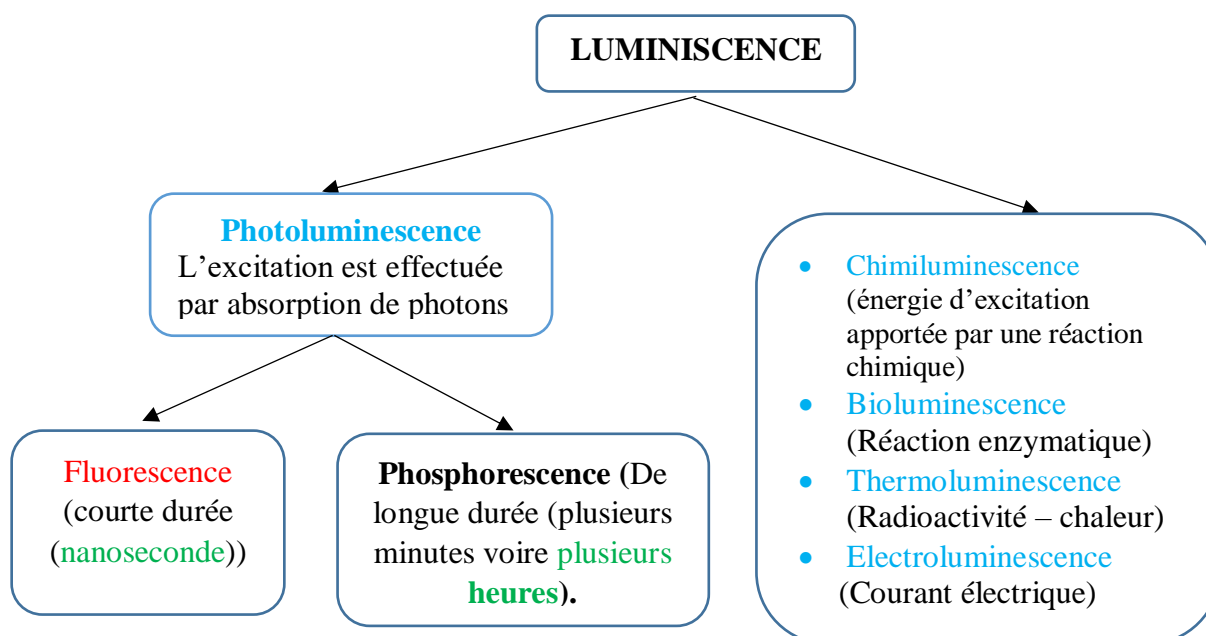


Figure III.1 : Différents type de luminescence

III.3. Photoluminescence

La photoluminescence est un phénomène de luminescence due à l'absorption de photons. Selon la durée de la luminescence, on distingue :

- **La phosphorescence** ; de longue durée (plusieurs minutes voire plusieurs heures).
- **La fluorescence** ; de courte durée (quelques nanosecondes).

III.4. La Fluorescence

La fluorescence est un phénomène qui survient lorsqu'un composé ayant auparavant **été excité par absorption** d'énergie issue d'une **source lumineuse** (du domaine du visible ou du proche ultraviolet), revient à son **état fondamental** en **libérant l'excès d'énergie** sous forme de rayonnement (photon). Celui-ci est émis de façon **quasi instantanée** à une longueur d'onde (λ nm) **plus grande** que celle de la **lumière d'origine**.

La fluorimétrie regroupe deux techniques analytiques distinguées comme le montre le **Tableau III.1**.

Tableau III.1 : Type de fluorimétrie

	Analyte	Domaine énergétique
Spectrométrie de fluorescence moléculaire	Molécule	Visible et proche UV
Spectrométrie de fluorescence atomique ou spectrométrie de fluorescence X	Atome	Rayons X

III.4.1. Définition de fluorophore

Le fluorophore est une **molécule fluorescente ajoutée** à un milieu pour permettre la détection spécifique de certaines substances cibles.

Cette molécule possède des **propriétés de fluorescence** et une **capacité à se lier** à tout ou partie des éléments recherchés dans le milieu, ce qui permet de localiser ou de quantifier ces éléments.

Il est important de noter que **toutes les molécules absorbantes ne sont pas fluorescentes**. La fluorescence est généralement observée chez des molécules :

- **Cycliques**,
- **Rigides**,
- **Riches en liaisons π conjuguées** (systèmes aromatiques étendus).

En pratique, les fluorophores les plus efficaces présentent les caractéristiques suivantes :

- Absorption dans le **visible** ou le **proche ultraviolet**
- Coefficient d'extinction molaire ϵ_{\max} important

- Fort rendement quantique (**0.8 - 0.9**)
- Très courte durée de vie de fluorescence

Sur la **Figure III.2**, sont présentés des composés fluorescents aromatiques.

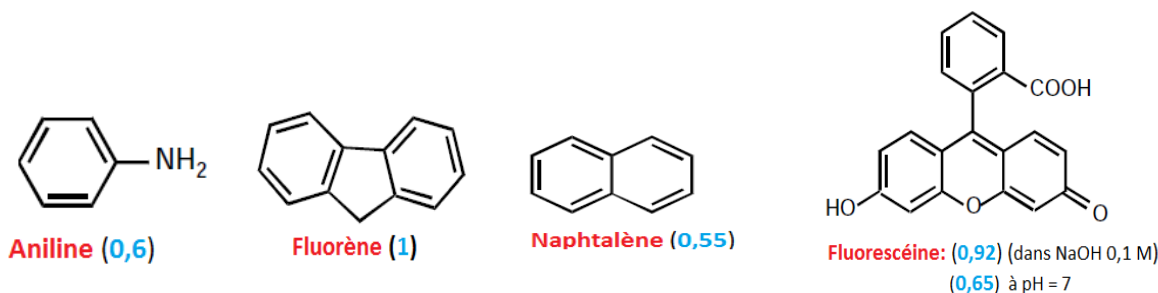


Figure III.2: composés fluorescents aromatiques (le rendement de fluorescence est donné entre paronhèse avec une couleur bleu (T=77K)).

Exemples de fluorophores naturels :

- Les acides aminés aromatiques (Phénylalanine, Tryptophane, Tyrosine)
- Les cofacteurs (NADH, FAD, ATP)
- Certaines vitamines (A, B2, B6, E(tocophérol))
- Les polyphénols : catéchine, acide gallique, quercétine....
- La chlorophylle, la porphyrine, la quinine

III.5. Règle de multiplicité

➤ *Nombres quantiques électroniques :*

Un électron est caractérisé par les nombres quantiques suivant :

- « **n** » : nombre quantique principal (il indique la couche ou se trouve l'électron »)
- « **l** » : nombre quantique secondaire (il indique la sous couche)
- « **m** » : nombre quantique magnétique.
- « **spin** » : le spin ($\pm 1/2$)

Selon le principe de Pauli les électrons doivent se différencier par leur état de spin. A l'état excité il y a deux possibilités d'orientation des spins.

➤ *La multiplicité :*

La multiplicité **M** définit deux état électroniques : **Singulet** ou **triplet**.

$$M = 2S + 1 \quad (III.1)$$

Avec S : somme de « m » des électrons d'une orbitale moléculaire.

Etat fondamental : les électrons appariés sont de spin opposés ($\uparrow\downarrow$)

$$\text{Cas } (S_0) : M = 2 * \left(\left(+\frac{1}{2} \right) + \left(-\frac{1}{2} \right) \right) + 1 = 1 \quad (M=1 ; \text{état fondamental Singulet})$$

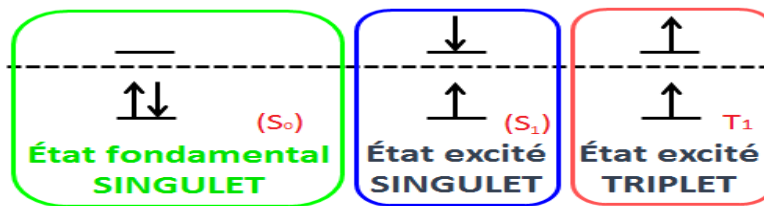
Etats excités

Cas (S_1) : $M=1$; état **excité Singulet**

$$\text{Spin} = \left(+\frac{1}{2} \right) + \left(-\frac{1}{2} \right) \text{ donc } M = 2 * \left(\left(+\frac{1}{2} \right) + \left(-\frac{1}{2} \right) \right) + 1 = 1$$

Cas (T_1) : $M=3$; état **excité Triplet**

$$\text{Spin} = \left(+\frac{1}{2} \right) + \left(+\frac{1}{2} \right) \text{ donc } M = 2 * \left(\left(+\frac{1}{2} \right) + \left(+\frac{1}{2} \right) \right) + 1 = 3$$



III.6. Principe de la fluorimétrie

Le diagramme de Jablonski représenté sur la **Figure III.3**, illustre l'absorption et l'émission de photons par une molécule fluorescente.

- ✓ **Absorption (Processus 1)** : l'absorption de la lumière UV/Vis par des molécules ou espèces génère une population de molécules dans des états électroniques excités. Chaque état électronique excité possède une multitude de niveaux d'énergie vibrationnelle et les molécules excitées se répartissent dans ces différents niveaux. Le plus souvent, cet état est un état singulet (S_1). Cela signifie qu'il n'y a pas eu de retournement de spin au cours de l'absorption. Tous les électrons ont leurs spins appariés.
- ✓ **Relaxation vibrationnelle (Processus 2)** : les molécules excitées perdent alors leur énergie vibrationnelle pour tomber dans l'état vibrationnel le plus bas de l'état électronique excité. Ce processus est appelé **relaxation vibrationnelle et non radiatif**. L'énergie vibrationnelle est abandonnée aux molécules de solvant.

La molécule peut alors retourner dans l'état électronique fondamental soit par :

- ✓ **Conversion interne (processus 3)** : c'est le retour à l'état fondamental par un **phénomène non radiatif**. Dans ce cas, l'énergie est abandonnée aux molécules de solvant et il y a production de **chaleur**.
- ✓ **Fluorescence (processus 4)** : c'est la **transition** de la molécule d'un **état excité singulet (S_1)** à l'**état fondamental singulet (S_0)**. Il est admis que la durée de vie de l'état excité est inférieure à 10^{-8} s. Après avoir subi **une relaxation vibrationnelle dans l'état excité**, la

molécule retombe dans l'état fondamental à un niveau vibrationnel plus élevé qu'avant excitation, la radiation émise par fluorescence est de plus faible énergie qu'avant excitation. De ce fait la longueur d'onde de la radiation émise est plus élevée que celle absorbée. La fluorescence est également suivie par une **relaxation vibrationnelle dans l'état fondamental**.

- ✓ **Conversion inter système (processus 5)** : avec certains composés : un autre phénomène appelé conversion inter système peut se produire. Une molécule dans l'état vibrationnel le plus bas de l'état excité (état singulet S1) passe dans un état triplet, état possédant un niveau d'énergie intermédiaire entre les états fondamental et excité. La conversion inter système s'effectue avec retournement de spin d'où la multiplicité.
- ✓ **Relaxation vibrationnel (Processus 6)** : La molécule tombe ensuite dans l'état vibrationnel le plus bas de l'état triplet par relaxation vibrationnelle. L'état triplet a une durée de vie beaucoup plus élevée que l'état singulet excité (S1) (elle est de l'ordre de 10^{-4} à 10 s).
- ✓ **Processus (7)** : Le passage de l'état triplet à l'état fondamental peut se faire également sans émission de lumière
- ✓ **Phosphorescence (processus 8)** : la molécule peut alors revenir à l'état fondamental par émission d'une radiation. Ce type de luminescence s'appelle phosphorescence.

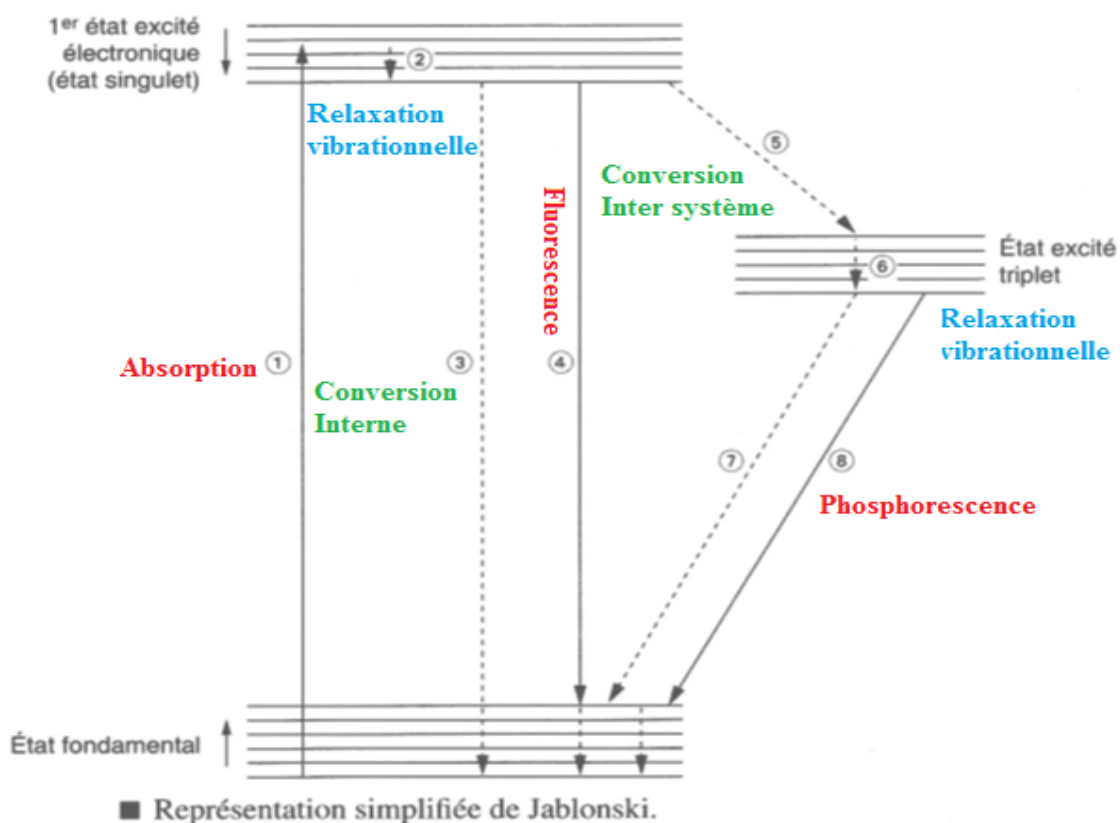


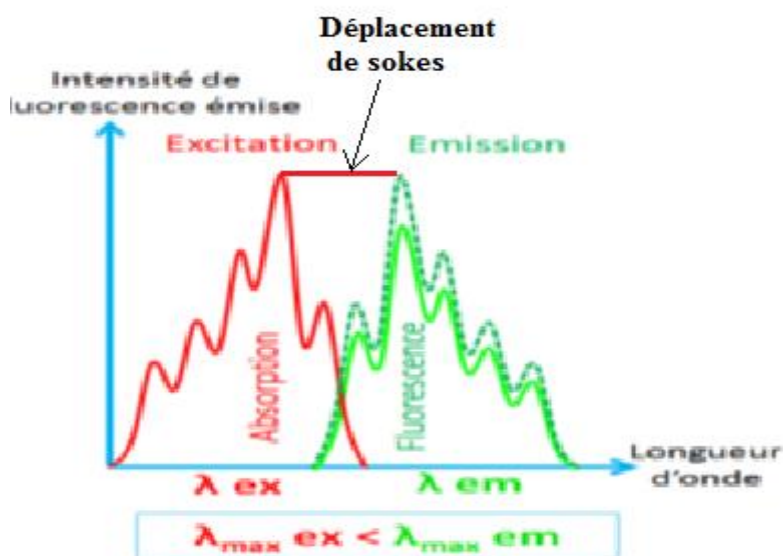
Figure III.3 : Représentation simplifier de Jablonski

III.7. Aspect du Spectre

Un fluorophore est caractérisé par deux spectres (**Figure III.4**) : le spectre **d'absorption** (de la lumière incidente) et le spectre **d'émission** de fluorescence. Ces deux spectres présentent généralement une certaine symétrie. Toutefois, une différence notable entre les spectres d'excitation (absorption) et d'émission peut indiquer la présence d'impuretés dans l'échantillons. En effet, la présence d'impuretés modifie plus facilement le spectre d'excitation que celui d'absorption.

Les transitions d'absorption nécessitent plus d'énergie que les transitions d'émission. De ce fait, la **longueur d'onde maximale d'émission** est **plus grande** que la **longueur d'onde d'absorption**. Ce décalage $\Delta\lambda$ est appelé **déplacement de Stokes**.

Les spectres d'absorption et d'émission sont bien évidemment caractéristiques de la molécule étudiée.

**Figure III.4:** spectre d'émission et d'excitation

III.8. Aspects quantitatifs

Soit une solution S placée dans une cuve et irradiée par un faisceau lumineux monochromatique d'intensité I_0 . La substance fluorescente émet une lumière d'intensité F (**Figure III.5**).

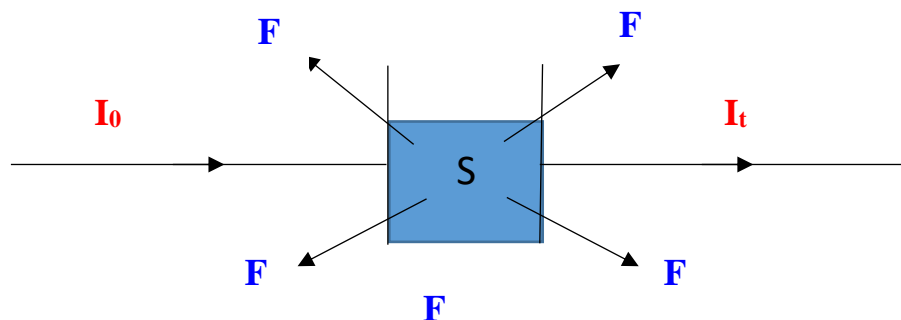


Figure III.5 : Irradiation d'une substance fluorescente par un rayonnement monochromatique.

L'intensité de la **lumière émise** est mesurée à un angle de 90° par rapport à la direction du **faisceau incident**. Avant d'atteindre le détecteur, la lumière passe à travers un filtre optique conçu pour bloquer le rayonnement incident (non fluorescent) et ne laisse passer que la radiation de fluorescence.

III.8.1. Rendement quantique de fluorescence ϕ_f

Pour les solutions, on définit le rendement quantique de fluorescence ϕ_f ($0 < \phi_f < 1$) qui mesure l'efficacité d'une molécule à fluorescer. Ce paramètre est très important sur le plan théorique car il permet d'évaluer la compétition entre les processus radiatifs (émission de photons) et non radiatifs (transfert d'énergie, dissipation d'énergie,..) et de mieux comprendre la dynamique des états excités d'une molécules.

$$\phi_f = \frac{\text{nombre de photons émis}}{\text{nombre de photons absorbés}} = \frac{I_f}{I_a} \quad (\text{III.2})$$

Avec :

I_f : Intensité de fluorescence.

I_a : Intensité absorbée.

$\phi_f = 0$: Indique absence de fluorescence

$\phi_f = 1$: *Fluorescence maximale*. Ceci indique une fluorescence très efficace (peu de pertes par processus non radiatifs), tandis qu'un **rendement faible** suggère que **d'autres processus** (relaxation non radiative, conversion interne, transfert d'énergie, etc.) **dominent**.

III.8.2. Intensité de fluorescence

Puisque il ne peut pas avoir, emission par fluorescence sans absorption de lumière, il est logique de poser que l'intensité de la radiation de fluorescence **F** est **proportionnelle** au flux de lumière absorbé (**$I_0 - I_t$**).

On a $I_a = I_0 - I_t$ (I_t : représente l'intensité de la lumière transmise

$$I_f = \phi_f \cdot I_a = \phi_f (I_0 - I_t) \quad (III.3)$$

$$I_f = I_0 \phi_f \left(1 - \frac{I_t}{I_0} \right) \quad (III.4)$$

On a $A = \log\left(\frac{I_0}{I_t}\right)$ donc

$$I_f = I_0 \phi_f (1 - 10^{-A}) \quad (III.5)$$

Le développement limité en série de Taylor du terme entre parenthèse est donné comme suit :

$$10^{-A} = 1 - 2,303A + \frac{(2,303A)^2}{2!} - \dots + \dots \quad (III.6)$$

$$e^{-x} = 1 - x + \frac{x^2}{2!} - \frac{x^3}{3!} + \dots \quad (\text{relation de Mac Laurin; si } x \ll 1, \text{ on trouve: } e^{-x} = 1 - x)$$

Dans le cas ou la solution est diluée, le terme A est très petit et le terme 10^{-A} est donc proche de $1 - 2,3A$. l'expression précédente devient alors :

$$I_f = 2,3 \cdot I_0 \phi_f A \quad (III.7)$$

$$I_f = 2,3 \cdot I_0 \phi_f \epsilon \cdot \ell \cdot C \quad (III.8)$$

Avec :

I_0 : intensité de la radiation excitatrice.

C : Concentration molaire de la substance.

ϵ : Coefficient d'absorption molaire.

ℓ : Epaisseur de la cuve.

ϕ_f : Rendement de la fluorescence.

Dans le cadre d'un dosage par fluorescence, les paramètres propres au composé étudié et à l'appareil sont fixes. En les réunissant dans un meme facteur K, on écrira pour les très faibles concentrations ($A < 0,01$).

$$I_f = K \cdot I_0 \cdot C \quad (III.9)$$

III.8.3. Durée de vie à l'état excité

C'est la durée caractéristique pendant laquelle la molécule reste à l'état excité avant de retourner à l'état fondamental. Cette durée est assimilable à la demi-vie de l'état excité. C'est un indicateur du temps dont, on dispose pour enregistrer les modifications de l'état des molécules, notamment leurs interactions avec l'environnement (changement de polarité, présence d'ions, interaction moléculaire).

La durée de vie moyenne de l'état excité est précisée par l'étude de la relation qui donne l'intensité de fluorescence en fonction du temps :

$$I_F = I_{F0} \cdot e^{-kt} \quad (III.10)$$

Avec :

I_F : l'intensité de fluorescence à l'instant t

I_{F0} : l'intensité de la fluorescence à l'instant t_0

K : le coefficient d'émission spontanée (s^{-1})

La durée de vie moyenne de l'état excité est définie par :

$$\text{Pour } \tau = t: I_F = \frac{I_{F0}}{e} \Rightarrow \tau = \frac{1}{K} \quad (III.11)$$

Ou bien :

$$\text{Pour } t = \tau: [MS] = \frac{[MS]_0}{e} = \frac{[MS]_0}{2,718} \quad (III.12)$$

MS : Nombre de molécules excitées au temps t

MS_0 : Nombre de molécules initialement excitées

τ : Temps de vie radiatif

$e = 2,718$ (base des logarithmes népériens).

III.9. Facteurs influençant la fluorescence

Ils existent plusieurs facteurs influençant sur la densité de fluorescence, les plus importants sont rassemblés sur la **Figure III.6** :

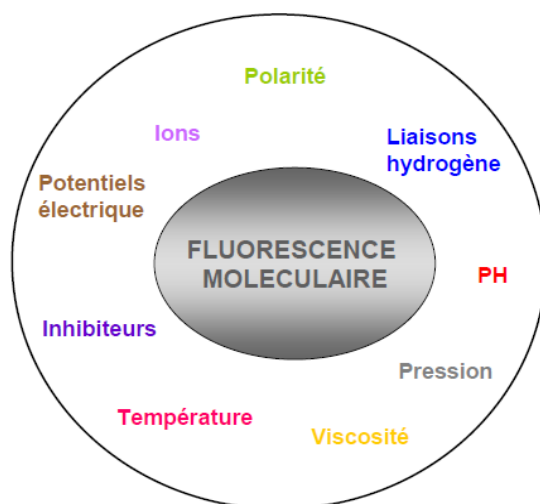


Figure III.6 : Facteurs influençant la fluorescence

III.9.1. Facteurs liés à la molécule

La fluorescence est privilégiée par les molécules :

- Cycliques
- Rigides
- Possédant des liaisons π

La fluorescence est augmentée par la présence de groupements électro donneurs (OH, NH₂, R ...) et est diminuée par la présence de groupements électroattracteurs (NO₂, COOH, X ...).

III.9.2. Facteurs liés au solvant

Le solvant peut avoir pour effet de modifier les niveaux énergétiques des molécules. Il peut favoriser ou au contraire inhiber la fluorescence.

a. Effet de la polarité : Une augmentation de la polarité, diminue I_f et augmente $\lambda_{\text{émission}}$.

Exemple 1 :

L'émission de fluorescence du : **6-bromoacétyl-2-iméthyllaminonaphthaène** dans des solvants de différentes polarités (Figure III.7).

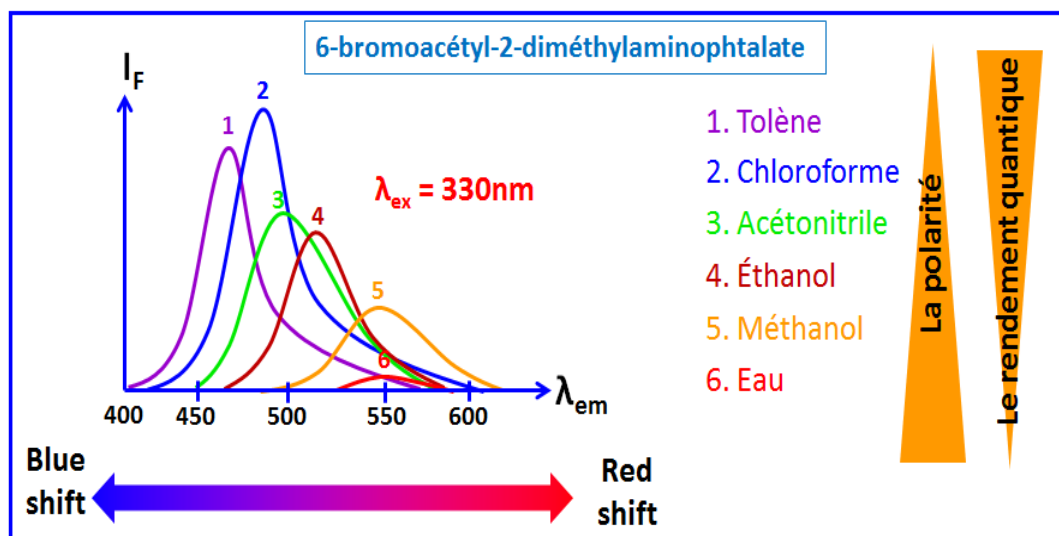


Figure III.7: Effet de la polarité du solvant sur l'intensité de fluorescence du : 6-bromoacétyl-2- iméthyllaminonaphthaène.

Exemple 2 :

La **quinoléine** n'est pas fluorescente en milieu apolaire alors qu'elle est fluorescente en milieu polaire.



b. Diffuser la lumière incidente : l'irradiation d'un solvant par une lumière monochromatique excitatrice provoque des interactions entre les photons et les électrons des molécules de solvant. Elles se traduisent par l'émission d'une lumière diffuse polychromatique perpendiculaire au trajet optique incident. On distingue deux phénomènes de diffusion (**Figure III.8**):

- **Diffusion de Rayleigh :** caractérisée par une raie intense de même longueur d'onde que la lumière excitatrice et donc les photons diffusés par les électrons de la molécule de solvant ont la même énergie que les photons de rayonnement incident.
- **Diffusion de Raman :** provient du transfert d'une partie de l'énergie de la radiation excitatrice aux molécules de solvant sous forme d'énergie de vibration (100 à 1000 fois plus faible que la diffusion de Rayleigh).

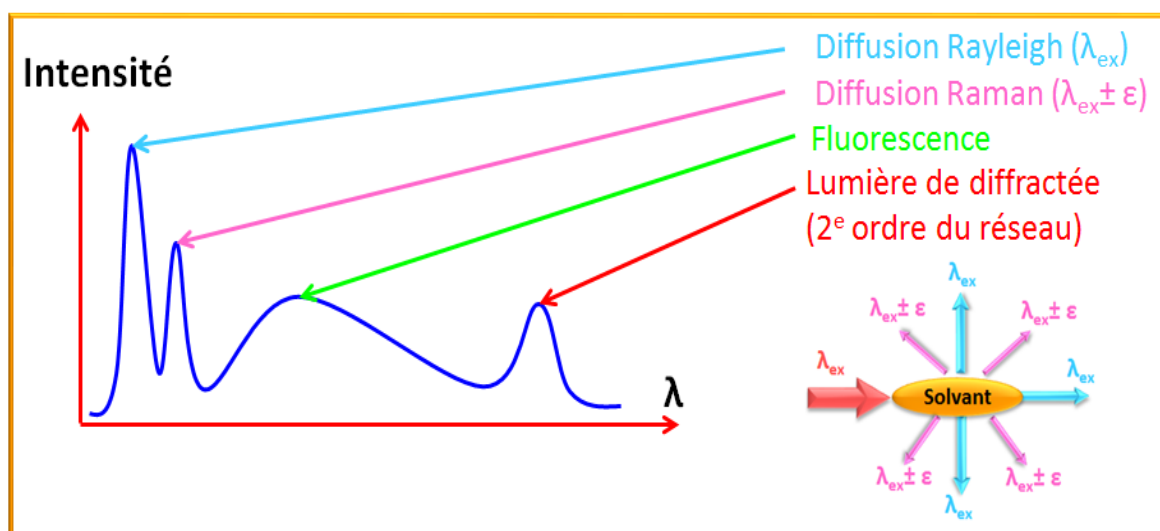


Figure III.8 : les diverses composantes d'un spectre de fluorescence.

Remarque :

Raie du 2^{ème} ordre : Positionnée à deux fois la longueur d'onde maximale d'excitation ($\lambda_d = 2 \lambda_{ex}$), il s'agit d'un phénomène purement optique dû à la diffraction de la lumière sur les réseaux d'appareillage.

III.9.3. Facteurs liés à l'environnement

Une **augmentation de la température** et/ou une **diminution de la viscosité** favorisent les chocs entre les molécules et la dissipation de l'énergie acquise par la forme excitée sous forme thermique (relaxation non radiative) ce qui entraîne **une diminution du rendement quantique** de fluorescence.

III.9.4. Phénomènes d'inhibition

Ils peuvent être classés en deux catégories :

- **Phénomènes internes (effet de filtre interne)** : ils ont pour origine la molécule elle-même.
 - a) **Effet de la concentration de la solution** : L'augmentation de la concentration de la solution provoque la diminution de la fluorescence, alors que pour les solutions très diluées, la fluorescence est identique en tout point de la solution (la linéarité de $I_f = F(C)$ est vérifiée).
 - b) **La photo décomposition** : Diminution de l'émission de fluorescence après un temps d'excitation prolongé due à la destruction du fluorophore par la lumière excitatrice.

➤ **Phénomène externes (en anglais Quenching)** : ils sont dus à la présence d'impuretés dans la solution, ou à la modification de certaines propriétés physiques (température) ou chimiques (solvant).

a) **Inhibition par collision (quenching statique)** : il se produit suite à la formation d'un complexe non-fluorescent à l'état fondamental entre le fluorophore et le quencheur comme indiqué dans la **Figure III.9**.

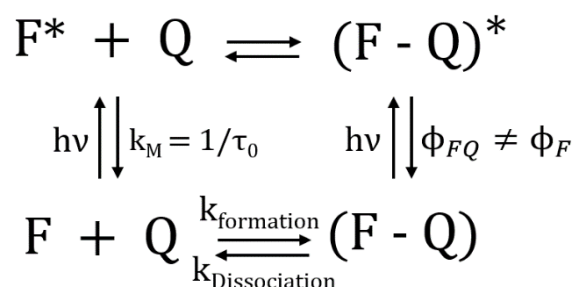


Figure III.9 : Processus d'interaction entre F^* et Q lors d'un quenching statique.

b) **Inhibition par collision (Quenching dynamique)** : résulte d'une interaction biomoléculaire entre F^* et Q contrôlée par la diffusion. Il se forme alors un complexe entre la molécule fluorescente (F) et une espèce inhibitrice (Q). Ceci provoque le transfert de l'énergie à la particule Q qui ensuite perd celle-ci sous forme de chaleur (la température favorise ce phénomène et la dilution a tendance à le minimiser).



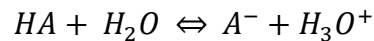
c) **Photoblanchiment (Photobleaching)** : est un **processus de dégradation photochimique** d'un fluorophore, c'est-à-dire lorsqu'un fluorophore est excité par la lumière, il passe à un **état excité**. Il peut ensuite revenir à son état fondamental en émettant un photon (fluorescence). Cependant, une partie des molécules excitées peuvent réagir avec des **espèces réactives de l'oxygène**, générées durant l'illumination. Ces réactions conduisent à des **modifications chimiques irréversibles** du fluorophore, ce qui le rend **non fluorescent**.

d) **Effet du pH**

La modification de structure qui résulte de la variation du pH influe sur la fluorescence de la molécule.

➤ Si la forme moléculaire d'un acide HA (de concentration C_0) est fluorescente :

$$I_F = k \cdot [HA] \quad (III.13)$$



$$K_a = \frac{[A^-] \cdot [H_3O^+]}{[HA]} \Rightarrow [HA] = \frac{[A^-] \cdot [H_3O^+]}{K_a} \quad (III.14)$$

$$[A^-] = C_0 - [HA] \quad (III.15)$$

On remplace l'expression de $[A^-]$ dans l'expression de $[HA]$ on obtient :

$$[HA] = \frac{(C_0 - [HA]) \cdot [H_3O^+]}{K_a} \Rightarrow [HA] = \frac{C_0 \cdot [H_3O^+]}{K_a + [H_3O^+]} \quad (III.16)$$

$$I_F = k \cdot [HA] \Rightarrow I_F = k \cdot \frac{C_0 \cdot [H_3O^+]}{K_a + [H_3O^+]} \quad (III.17)$$

Quand pH augmente → $[H_3O^+]$ diminue → la densité de fluorescence diminue

➤ Si la forme moléculaire basique A^- est fluorescente :

$$I_F = k \cdot [A^-] \quad (III.18)$$

$$\text{on a: } [A^-] = C_0 - [HA] \quad \text{et } [HA] = \frac{C_0 \cdot [H_3O^+]}{K_a + [H_3O^+]}$$

$$\text{donc on obtient: } [A^-] = C_0 - \frac{C_0 \cdot [H_3O^+]}{K_a + [H_3O^+]} = \frac{C_0 \cdot K_a}{K_a + [H_3O^+]}$$

L'intensité de fluorescence de la base est donc égale à :

$$I_F = k \cdot [A^-] \Rightarrow I_F = k \cdot \frac{C_0 \cdot K_a}{K_a + [H_3O^+]} \quad (III.19)$$

Quand pH augmente → $[H_3O^+]$ diminue → la densité de fluorescence augmente

III.10. Instruments

Le fluorimètre permet de mesurer l'intensité de la fluorescence d'une molécule. La fluorescence est généralement mesurée à 90° pour ne pas avoir le faisceau incident dans l'axe de la mesure.

L'instrumentation d'un fluorimètre est classique et comporte 5 parties (**Figure III.9**) :

- Source lumineuse : généralement une lampe à arc xénon.
- Monochromateur ou filtre.

- Compartiment à échantillon.
- Détecteur : photomultiplicateur ou photodiode.

La lumière émise par la source traverse d'abord le monochromateur d'excitation qui permet de sélectionner une bande étroite de longueurs d'onde (d'environ 15 nm) correspondant à la longueur d'onde d'excitation optimale de l'analyte. Cette lumière monochromatique est ensuite dirigée vers l'échantillon, ou elle excite les fluorophores présents.

La fluorescence émise par les molécules est ensuite recueillie soit à 90° (perpendiculairement), soit dans l'axe du faisceau incident (géométrie parallèle), selon le modèle de l'appareil.

Spectrofluorimètre

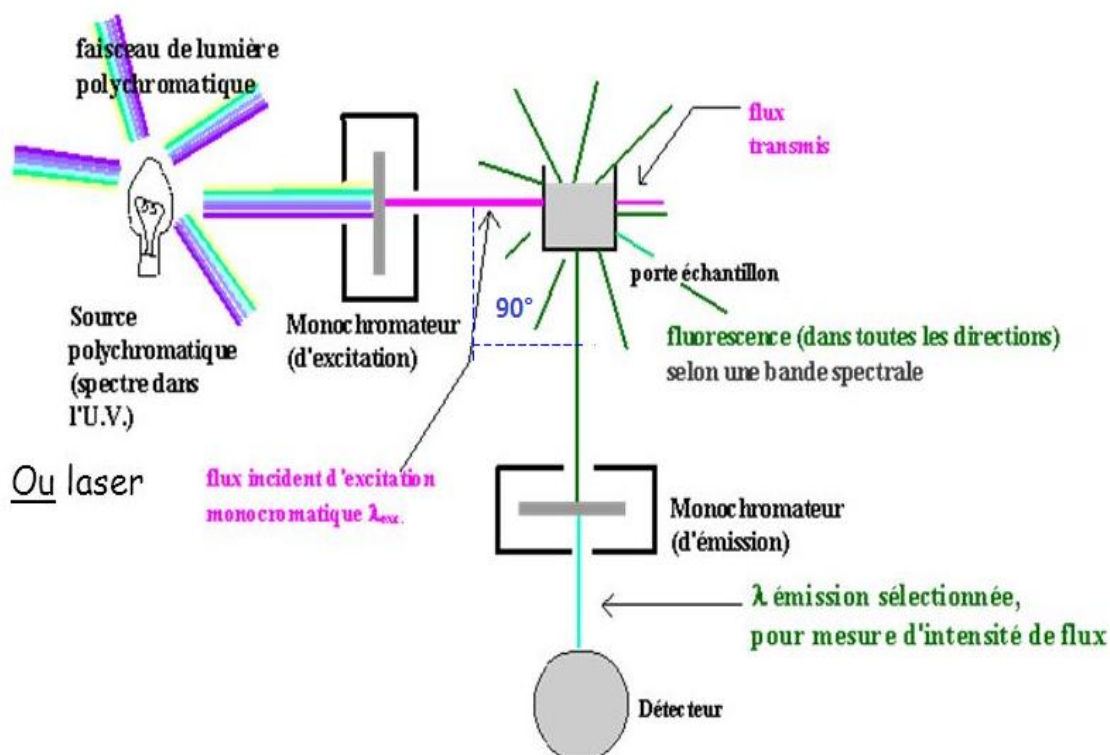


Figure III. 9 : spectrofluoromètre

III.11. Applications de la fluorescence

III.11.1. Applications qualitatives

La mise en œuvre des deux processus, absorption et émission rend la spectrofluorométrie plus spécifique que la spectrophotométrie UV visible.

- Un spectre de fluorescence obtenue en 3D (trois dimensions) $I_f = f(\lambda_{\text{émission}}, \lambda_{\text{excitation}})$ est une signature de la molécule d'où la sélectivité de la spectrofluorimétrie.
- Grâce à des bases de données, il est possible d'identifier les substances chimiques fluorescentes.
- Les déplacements des maxima d'intensité des spectres d'absorption et d'émission est en relation avec les modifications moléculaires.

III.11.2. Applications quantitatives

La spectrofluorométrie est une méthode **rapide**, de **limite de détection très faible** (jusqu'à à 10^{-9} mol/L) plus **sélective** que la spectrophotométrie UV-visible. Cette sélectivité provient du fait que **toutes les substances absorbantes ne sont pas fluorescentes**, ce qui constitue un **avantage majeur** en présence d'impuretés ou de matrices complexes.

a. Analyse directe : La fluorescence est mesurée **directement** sur les molécules **naturellement fluorescentes**, sans traitement chimique préalable.

Exemple : Quinine et dérivés, protéines aromatiques (comme le tryptophane) et certaines vitamines (riboflavine)

b. Analyse fondée sur le phénomène d'inhibition : Mesure de l'atténuation de la fluorescence.

c. Analyse après modification : Certaines substances **non fluorescentes à l'état naturel** peuvent être rendues **fluorescentes** par des modifications chimiques ou physico-chimiques, permettant leur détection par spectrofluorométrie.

→ **Modification de la structure chimique sous l'influence du pH** :

Exemple : L'aniline



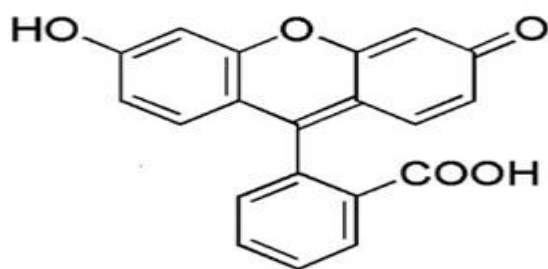
III.12. Domaine d'applications

- Pharmaceutique (étude du métabolisme des médicaments).
- Biochimie (détermination des salicylates dans le sang)
- Biologie (analyse des substances végétales complexes (chlorophylles, huiles))
- Environnement
- Toxicologie ...

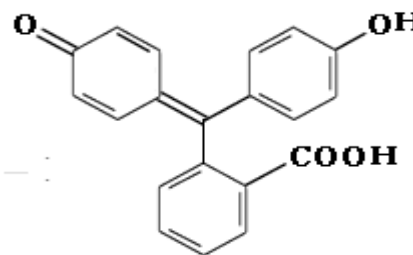
III.13. Exercices d'application

Exercice N°1

1. Parmi les composés ci-dessous, lequel devrait avoir le rendement quantique de fluorescence le plus élevé ? expliquer



Fluorescéine



Phénolphtaléine

Le composé qui devrait avoir le rendement quantique de fluorescence le plus élevé et la molécule de **la Fluorescéine** car elle est **plus rigide** que la phénolphtaléine.

Remarque :

Le **rendement quantique** est d'autant **plus élevé** que les possibilités de **dissipation de l'énergie** électronique d'excitation en énergie vibratoire (relaxation vibrationnelle, conversion interne et conversion inter système) **sont faibles** ce qui est le cas **des molécules de structure rigide**, telles les molécules **cyclisées riches en doubles liaisons**.

2. Dans quel solvant la fluorescence du naphthalène sera-t-elle la plus élevée : 1-chloropropane, 1-bromopropane ou 1-iodopropane ? Expliquez.

($X(I) < X(Br) < X(Cl)$, X : c'est l'électronégativité)

La fluorescence du naphthalène est la plus élevée dans le **solvant 1-Iodopropane** car il est le **moins polaire** par rapport aux autres solvants.

Remarque :

La polarité est due à la différence d'électronégativité entre les atomes qui la composent, aux différences de charge qu'elle induit, et à leur répartition dans l'espace. **Plus la différence d'électronégativité est importante, plus la molécule est polaire.**

L'augmentation de la polarité du solvant provoque :

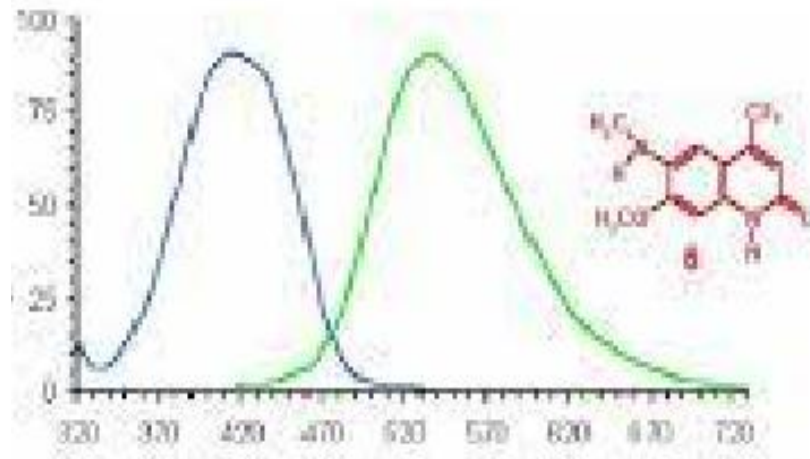
- La diminution du rendement quantique de la fluorescence
- L'augmentation de la longueur d'onde d'émission (effet bathochrome) .

Exercice N°2

1. Identifiez spectre ci-dessous le spectre d'émission, le spectre d'excitation, les axes et leurs unités.
2. Déterminez :
 - a) La longueur d'onde d'émission
 - b) La longueur d'onde d'excitation.
 - c) Le shift de Stokes
3. Calculez le rendement quantique de fluorescence (Φ)
4. Calculez la transmittance, l'absorptivité molaire et dérivez une équation qui les relie.
5. Discutez deux manières différentes pour augmenter le rendement quantique de fluorescence.

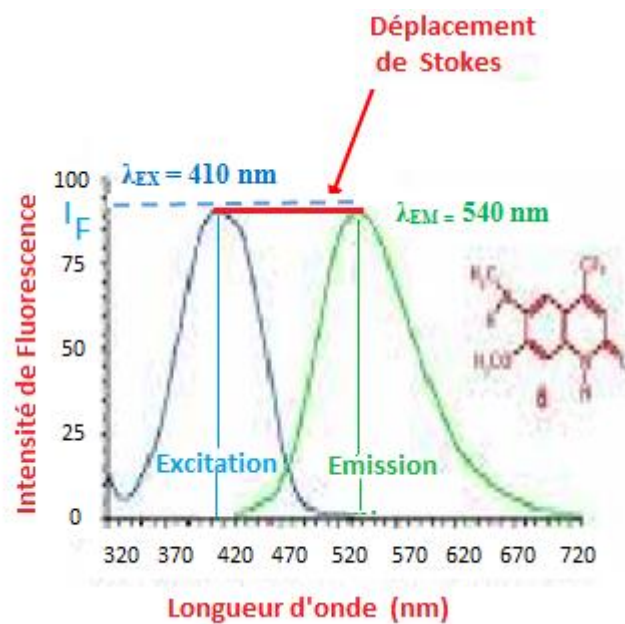
Analyse fluorimétrique d'un carbostiryl dans l'eau :

- Concentration = $1.10^{-6}M$
- Chemin optique = 10 mm
- Intensité de la radiation excitatrice = 2476
- Absorbance de la solution = 0,15



Solution :

1. Identification du spectre d'émission et d'excitation



2. Détermination de la longueur d'excitation (λ_{EX}) et d'émission (λ_{EM}) et le déplacement de Stokes ($\Delta\lambda$)

$$\lambda_{EX} = 410 \text{ nm}, \quad \lambda_{EM} = 540 \text{ nm et}$$

$$\Delta\lambda = \lambda_{EM} - \lambda_{EX} = 540 - 410 \text{ donc : } \Delta\lambda = 130 \text{ nm}$$

3. Calcul du rendement quantique de Fluorescence (Φ) :

$$\Phi_f = \frac{\text{nombre de photons émis}}{\text{nombre de photons absorbés}} = \frac{I_f}{I_a}$$

$$\Phi_f = \frac{I_f}{I_0 - I_t} \quad \text{avec } (I_a = I_0 - I_t)$$

$$A = -\log T = -\log\left(\frac{I_t}{I_0}\right) \Rightarrow \frac{I_t}{I_0} = T = 10^{-A} = 10^{-0.15} = 0.71$$

$$T = \frac{I_t}{I_0} = \mathbf{0.71}$$

Donc $I_t = T \cdot I_0 \Rightarrow I_t = 0,71 * 2476 \quad I_t = \mathbf{1757.96}$ avec ($I_0 = 2476$)

L'intensité de Fluorescence $I_f = \mathbf{92}$ (elle est déterminée à partir du graphe)

$$\Phi_f = \frac{92}{2476 - 1757.96} = 0.128 \quad \Phi_f = \mathbf{0.128}$$

4. Calcul de la transmittance (T) et l'absorptivité molaire (ϵ) :

$T = \mathbf{0.71}$ (déjà calculée dans la question précédente)

D'après la loi de Beer Lambert :

$$A = \epsilon \cdot \ell \cdot C \Rightarrow \epsilon = \frac{A}{\ell \cdot C} = \frac{0.15}{10 \cdot 10^{-1} \cdot 1 \cdot 10^{-6}}$$

$$\epsilon = \mathbf{1.5 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}}$$

La relation qui lie la transmittance et ϵ :

$$A = \epsilon \cdot \ell \cdot C = -\log T \Rightarrow T = \mathbf{10^{-\epsilon \cdot \ell \cdot C}}$$

5. Proposition de deux méthodes différentes pour augmenter le rendement quantique de la fluorescence :

Pour **augmenter le rendement quantique de la fluorescence**, il suffit de **diminuer la fréquence des désactivations non-radiatives**. Ceci est possible **en minimisant les collisions** soit par :

- Un **abaissement** de la **température**
- Une **augmentation** de la **viscosité** du solvant de l'analyse.

Chapitre IV : La spectroscopie Infrarouge (IR)

IV.1. Définition

La **spectroscopie infrarouge** (ou **spectroscopie IR**) est une **technique analytique** permettant d'**étudier les vibrations moléculaires** afin d'**identifier les groupes fonctionnels** présents dans une molécule. Elle repose sur le principe selon lequel les **liaisons chimiques** absorbent **l'énergie de la lumière infrarouge** à des **fréquences spécifiques**, provoquant ainsi des **transitions vibratoires** (étirements, déformations...) au sein de la molécule. Chaque liaison chimique dans une molécule a une fréquence de vibration caractéristique, qui dépend de la masse des atomes et de la force de la liaison.

IV.2. Le rayonnement Infrarouge

Le rayonnement infrarouge (IR), invisible à l'œil nu, est situé dans un domaine de longueur d'onde supérieur à 800 nm.

La partie infrarouge du rayonnement électromagnétique est partagée en trois domaines (**Figure IV.1**) :

- Le proche infrarouge (le plus énergétique) qui s'étend de 14 000 à 4000 cm^{-1} (0,7-2,5 m) ;
- L'infrarouge moyen qui va de 4000 à 400 cm^{-1} (2,5-25 m)
- L'infrarouge lointain, qui couvre le domaine spectral de 400 à 10 cm^{-1} (25-1000 m).

Lorsqu'un échantillon est traversé par un faisceau lumineux IR, une partie de la lumière est absorbée. C'est grâce à cette absorption que nous allons pouvoir déceler la présence de groupements d'atomes caractéristiques. Cette méthode très sélective permet également d'obtenir des informations très importantes sur les interactions inter- et/ou intra-moléculaires, sur la conformation des molécules et sur l'organisation de la matière

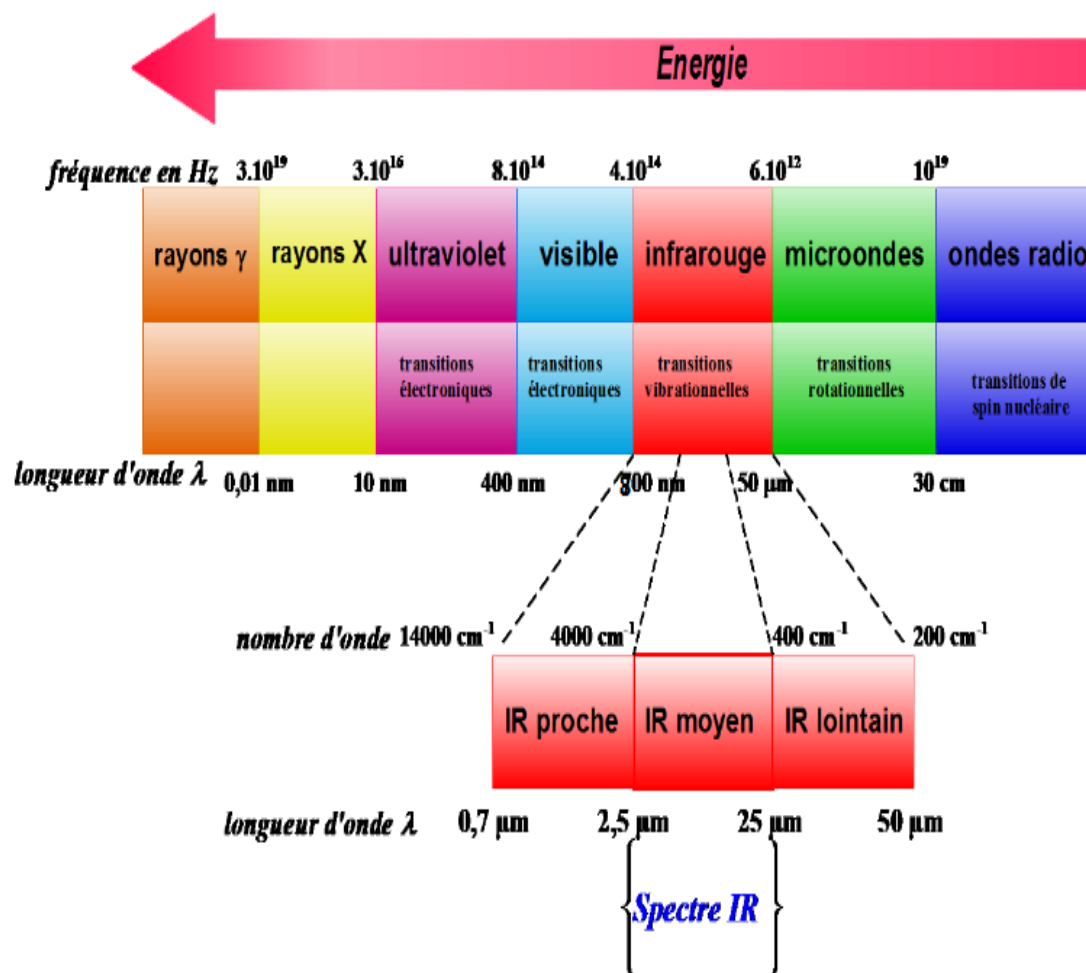


Figure IV.1: Spectre électromagnétique et le domaine de l'infrarouge

IV.3. Principe de la spectroscopie IR

Le principe de la spectroscopie infrarouge est tout à fait semblable à celui de la spectroscopie UV- visible que nous avons déjà étudiée.

Si la **spectroscopie visible** met en jeu **des transitions** entre les **niveaux d'énergie électroniques**, la **spectroscopie infrarouge** concerne l'absorption de radiations qui provoquent des **transitions entre les niveaux d'énergie de vibration** et de rotation de la molécule. Les **niveaux d'énergies sollicités** par la **spectroscopie infrarouge** sont ceux des **énergies de vibration** des liaisons moléculaires

Le principe d'une **spectroscopie IR** est d'envoyer des radiations IR (de nombre d'onde compris entre 4000 et 400 cm^{-1}) sur un échantillon à tester. **Certaines longueurs d'onde sont alors absorbées par les liaisons chimiques des molécules** se trouvant dans l'échantillon en tant

qu'énergie de vibration moléculaire. On génère alors un **spectre IR**, qui permet de **déterminer ces liaisons chimiques**.

Une spectroscopie infrarouge peut ainsi avoir différents buts :

- **Identifier et caractériser une molécule inconnue**, en référençant ses liaisons.
- **Tester la présence ou l'absence d'une molécule** dans un échantillon.
- Dans certains cas, procéder à un **dosage** d'une espèce chimique.

IV.4. Etude des vibrations d'une molécule

Une vibration moléculaire ou un mode de vibration correspond à un mouvement périodique, de fréquence, de chacun des atomes constitutifs de la molécule. Les liaisons des molécules vibrent de plusieurs manières : elles possèdent divers modes de vibration.

- **Deux atomes** reliés par une liaison covalente peuvent effectuer une vibration **d'élongation/contraction**.
- Quand il y a plus **de deux atomes** dans la molécule, **les atomes peuvent vibrer ensemble** selon une **variété d'élongation et de déformations**.

Par exemple, dans le cas de l'environnement tétraédrique de l'atome de carbone, on distingue deux types de vibration :

IV.4.1. Des vibrations d'élongation (ou stretching)

Elles ont lieu lorsque deux atomes s'éloignent ou se rapprochent périodiquement le long de leur axe commun.

Pour un système à **trois atomes non alignés** on a 2 modes de vibrations d'allongement (**Figure IV.12**): une vibration **symétrique** et une **antisymétrique**. Il existera une fréquence pour chacun de ces deux modes. Vibrations d'allongements symétrique et antisymétrique



Figure IV.2 : Vibrations d'élongations.

IV.4.2. Vibrations de déformation

On distingue des déformations dans le plan et les déformations hors du plan.

Déformation dans le plan : il s'agit de la modification de l'angle de liaison (**Figure IV.3**).

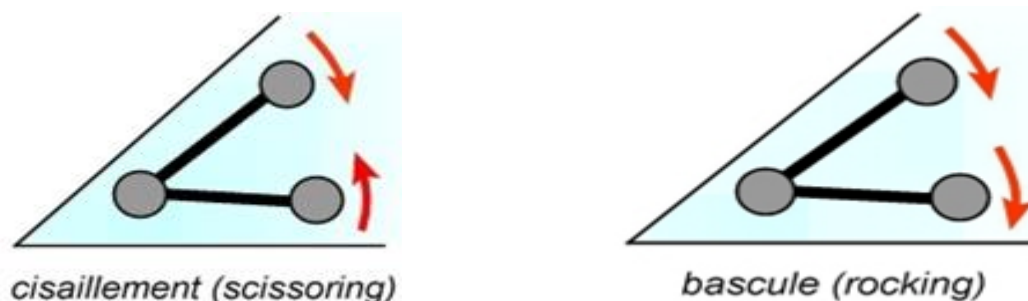


Figure IV.3 : Vibrations de déformation dans le plan.

Déformation hors du plan. Vibrations de déformation hors plan (**Figure IV.4**).

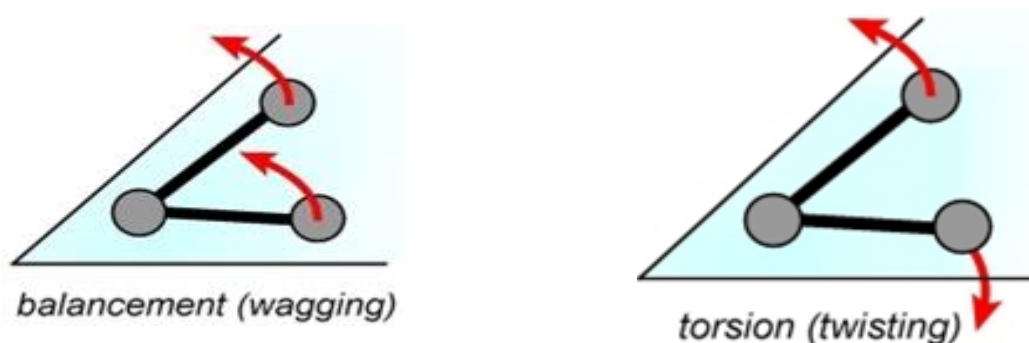


Figure IV.4 : Vibrations de déformation hors du plan.

Remarque

- En réalité au sein d'une molécule, toutes les liaisons ne donnent pas lieu à une absorption dans l'infrarouge : il existe **une règle de sélection** : pour qu'il y ait absorption il faut que le **moment dipolaire de la molécule varie lors de la vibration**.
 - Cela justifie les faibles absorptions dues aux doubles liaisons C=C.
 - Cela justifie l'absence de certains modes de vibration de certaines molécules.
- Les vibrations **d'élongation** se produisent à des nombres **d'onde élevés**. Les vibrations de **déformation** sont observées vers les **faibles nombres d'onde**.

IV.5. Calcul du nombre de modes de vibration attendus pour une molécule isolée formée de N atomes

Une molécule composée de **N atomes** possède **3N degrés** de liberté, car chaque atome peut se déplacer selon les trois directions de l'espace (x, y, z). Toutefois, l'ensemble de ces mouvements ne correspond pas uniquement à des vibrations. En effet, en se limitant aux vibrations, il est nécessaire de **retrancher les mouvements de translation** de la molécule (trois degrés de liberté) ainsi que ses **mouvements de rotation** (trois degrés de liberté).

Donc, pour une **molécule non linéaire**, le nombre de modes de vibration est :

$$\text{Nombre de vibrations} = 3N - 6 \quad (\text{IV.1})$$

Tandis que pour une **molécule linéaire**, il n'y a que **2 mouvements de rotation indépendants** (puisque la rotation autour de l'axe moléculaire ne change rien), donc :

$$\text{Nombre de vibrations} = 3N - 5 \quad (\text{IV.2})$$

On constate donc que, plus une molécule contient d'atomes, plus le nombre de modes vibratoires augmente, rendant l'interprétation des spectres IR de plus en plus difficile.

Exemple :

- **Modèle linéaire :** Pour une molécule linéaire comme CO₂ (N=3) (**Figure IV.5**) : 2 angles suffisent à décrire sa rotation (la rotation autour de l'axe de la molécule n'a pas de signification physique). Il y a donc 3N - 5 modes de vibrations normaux soit ici 4 mouvements de vibration indépendants.

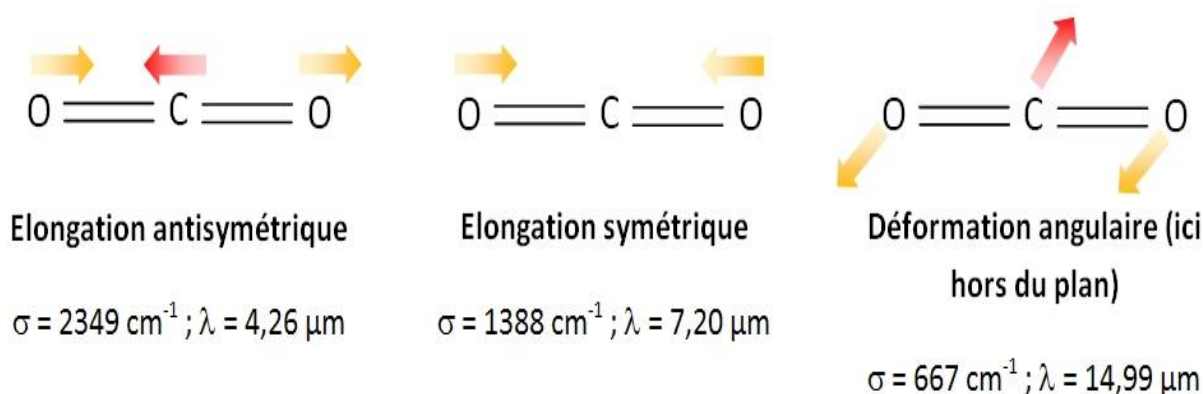


Figure IV.5. : représentation des différentes vibrations de la molécule CO₂.

- **Les vibrations d'élongation symétriques** : l'atome de carbone est entraîné vers l'un ou l'autre atome d'oxygène ;
 - **Les vibrations d'élongation antisymétriques** : les deux atomes d'oxygène ont des mouvements dans le même sens, contrairement au mouvement de l'atome de carbone ;
 - **Les vibrations de déformation d'angle dans le plan** : les deux atomes d'oxygène ont des mouvements dans le même sens contrairement à l'atome de carbone ; les liaisons ne sont plus alors parallèles ;
 - **Les vibrations de déformation d'angle hors du plan** (même description que ci-dessus mais hors du plan)
- **Modèle non linéaire** : Pour une molécule coudée comme H₂O (N = 3) (**Figure IV.6**) : il y aura 3 modes de vibrations normaux soit 3 fréquences de vibration possibles.

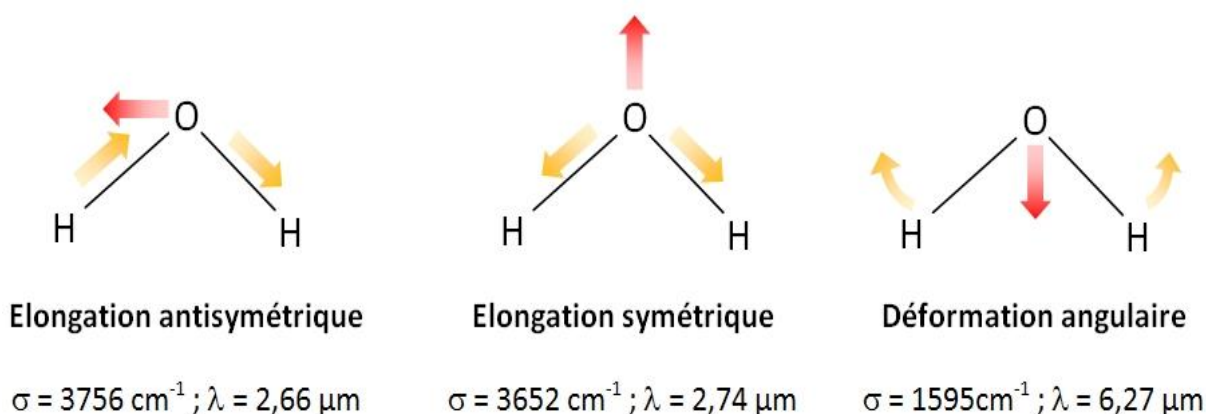


Figure IV.6. : Représentation des différentes vibrations de la molécule H₂O.

- **Les vibrations d'élongation symétriques** : les atomes liés s'approchent ou s'éloignent de façon symétrique ;
- **Les vibrations d'élongation antisymétriques** : de même mais cette fois-ci lorsqu'une liaison est comprimée, l'autre est étirée.
- **Les vibrations de déformation d'angle.**

Remarques

- Les vibrations **de déformation** ont des **fréquences plus faibles** que les vibrations **d'élongation** et correspondent donc à des **énergies inférieures**.
- Les vibrations **asymétriques** correspondent à **une énergie plus importante** que la **symétrique** donc à une fréquence supérieure).

IV.6. Détermination du nombre d'onde

Une **liaison** chimique entre deux atomes peut être vue comme **un ressort** de constante de raideur k , où les atomes sont assimilés à des masses (m_A et m_B) accrochées à ses extrémités (Figure IV.7). Ce système présente une **fréquence d'oscillation (fréquence de résonance)** qui lui est propre et qui est donnée par la loi de Hooke :

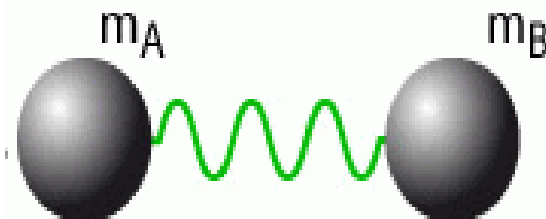


Figure IV.7 : Liaison chimique assimilée à un ressort.

$$\nu_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \text{ avec } \mu = \frac{m_A m_B}{m_A + m_B} \text{ (masse réduite du système)} \quad (IV.3)$$

Avec :

ν_0 : fréquence des oscillations du ressort par seconde (s^{-1} , Hz).

On a aussi le nombre d'onde $\sigma_0 = \frac{\nu_0}{c}$

c : la vitesse de la lumière dans le vide ($c = 3 \cdot 10^8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$)

$$\sigma_0 = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (IV.4)$$

Avec :

σ_0 : le nombre d'onde (cm^{-1})

k : la constante de raideur ($\text{dyne}\cdot\text{cm}^{-1}$)

μ : la masse réduite (en $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

On peut également diviser la masse réduite sur le nombre d'Avogadro N_A et on obtient une masse en (g/mol) et la formule obtenue est la suivante :

$$\sigma_0 = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} = \frac{1}{2 * 3,14 * 3 * 10^{10}} \sqrt{\frac{k}{\frac{\mu}{6.023 \cdot 10^{23}}}}$$

$$\sigma_0 = 4,12 * \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (IV.5)$$

Chaque type de liaison (C-C, C-H, C-O, ...) possède une **fréquence de résonance qui lui est spécifique**

Exemple :

La liaison C-C :

$$\nu_0 = 4,12 * \sqrt{\frac{k}{\mu}} \text{ avec } \mu = \frac{12*12}{12+12} = 6g/mol \text{ (masse réduite du système).}$$

Le **tableau IV.1** regroupe les valeurs approximatives des nombres d'onde associés à différentes liaisons covalentes. Ces données permettent de relier chaque type de liaison à une zone caractéristique en spectroscopie infrarouge.

Tableau IV.1 : Ordres de grandeur des nombres d'onde associés à certaines liaisons covalentes.

Liaison	C-H	C-C	C=C	C-O	C=O
K (N. m ⁻¹)	145 à 900	145 à 900	≈ 970	400 à 700	≈ 1200
μ (g.mol ⁻¹)	0,923	6	6	6,85	6,85
σ ₀ (cm ⁻¹)	3032	640 à 1600	≈ 1650	1000 à 1300	≈ 1720

$$1N/m = 10^7 \text{ dyne/cm}$$

- Dans le domaine 2800<σ<3000, c'est la liaison **-C-H (sp³)**, **=C-H (sp²)**, **≡C-H (sp)**. La liaison impliquer dans ≡C-H est plus forte que =C-H et celle-ci est plus forte que -C-H. Une **liaison forte** veut dire une **constante de raideur élevée** et un **nombre d'onde élevée**. **σ (≡C-H) > σ (≡C-H) > σ (-C-H)**.
- Si ν_{C-H}> 3000 cm⁻¹, la liaison C-H est portée sur une doubles liaison ou sur un cycle aromatique (pour si ν_{C-H}= 3300 cm⁻¹, il s'agit d'un H liée à une triple liaison).
- 3200<σ<4000 cm⁻¹ : élongation X-H (-N-H, O-H).
- 2500<σ<1900 cm⁻¹ : élongation des triples liaisons C≡C et N≡C et des doubles liaisons cumulées X=Y=Z (allènes, isocyanate).
- 1900<σ<1500 cm⁻¹ : élongation des doubles liaisons C=O, C=N, C=C et N=O.
- 1500<σ<400 cm⁻¹ : région d'empreinte digitales, élongation de simples liaisons C-N, C-O.

Un carbone tétragonal (tétraédrique) (sp^3)

Carbone trigonal sp^2 ($=C-$)

Remarque :

Les **constantes de raideur** des liaisons, qui déterminent la **fréquence de vibration** d'une liaison chimique, ne sont **pas strictement fixes** :

Elles dépendent **légèrement de l'environnement chimique** au sein de la molécule (effets inductifs, mésomères, interactions intermoléculaires, etc.).

Par conséquent, les **valeurs expérimentales** obtenues dans un spectre infrarouge doivent être considérées comme des **ordres de grandeur**. On pourra alors **comparer les fréquences mesurées** aux **valeurs de référence** présentes dans les **tables d'identification** des bandes IR.

Le spectre infrarouge ainsi que les positions de quelques liaisons chimiques sont présentés dans la **Figure IV.8** et le **Tableau IV.3**.

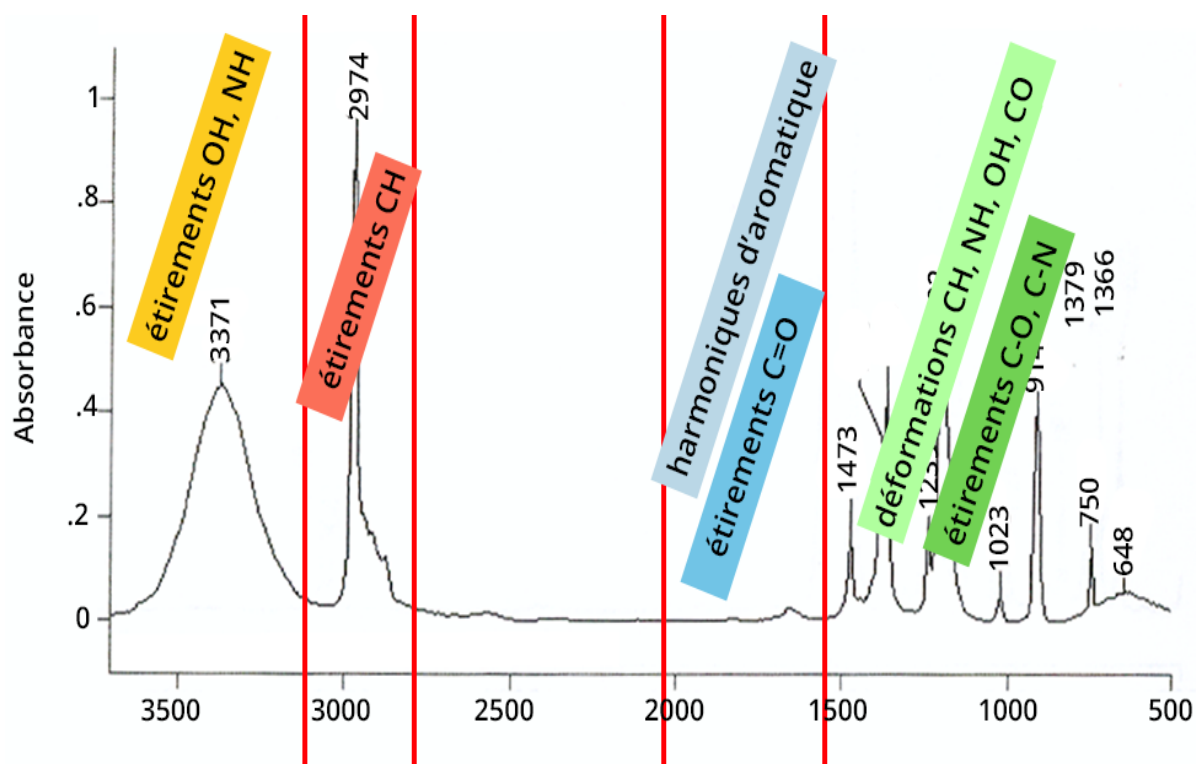


Figure IV.8 : Spectre infrarouge et positions de quelques liaisons chimiques

Tableau IV.2 : Tables d'identification des bandes IR.

Liaison	Domaine	attribution
$\nu_{\text{C=O}}$ (1650 et 1800 cm^{-1})	1725-1705 cm^{-1}	C=O d'une cétone
	1740 – 1720 cm^{-1}	C=O aldéhyde
	1750 – 1730 cm^{-1}	C=O d'un ester
	1800- 1740 cm^{-1}	C=O d'un acide
$\nu_{\text{O-H}}$ (1650 et 1800 cm^{-1})	3550-3650 cm^{-1} (pic fin)	-OH libre
	3200-3400 cm^{-1} (pic large)	-OH lié intermoléculaire
	3450 – 3580 cm^{-1}	OH lié intramoléculaire
	2500-3000 cm^{-1} (bande large)	OH chélation

→ Cas de la liaison hydrogène

La liaison X-H ou X est un hétéroatome (O, N, S) peut intervenir dans des associations moléculaires de type liaison hydrogène (**Figure IV.9**).

La liaison hydrogène a pour effet :

- D'affaiblir la liaison X-H (diminution du nombre d'onde de vibration).
- De provoquer un élargissement de la bande due à la vibration X-H.

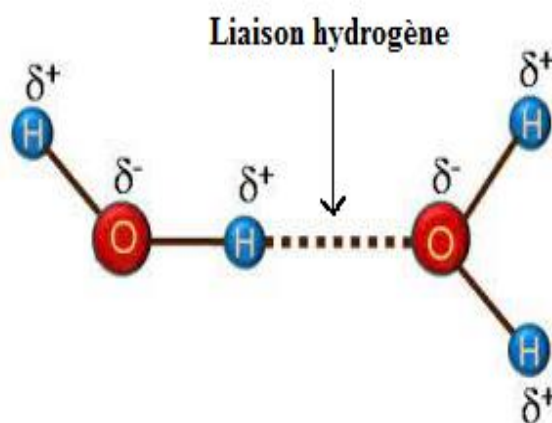


Figure IV.9 : Liaison hydrogène.

IV.7. Allure du spectre infrarouge

Le spectre IR que l'on obtiendra pour une molécule donnée sera un spectre en transmission T (en ordonnée) en fonction du nombre d'onde σ ; On rappelle que le spectre obtenu correspond à la combinaison de toutes les vibrations et déformations possibles.

La zone de balayage se fera pour σ compris entre 400 et 4000 cm^{-1} (infrarouge moyen) environ.

On distingue 2 zones : La zone $4000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ (**zone de diagnostique**) : nous y trouvons les bandes correspondant aux vibrations d'élongation de la plupart **des groupes fonctionnels (R-C-H, R-OH, R-N-H, R-CH+O, R-CO-R, R-COOH,....)**.

La zone $1500 - 1000 \text{ cm}^{-1}$: c'est une région comportant de nombreux petits pics relatifs aux vibrations de déformation angulaire. Cette partie du spectre est très difficile à analyser, elle est appelée « **empreinte digital** »

La zone $1000 - 400 \text{ cm}^{-1}$: c'est une région de **faible énergie**, on observe dans ce domaine surtout les vibrations **de déformation hors du plan** des liaison C-H des **alcènes** et des composés **aromatiques**. Il s'agit d'un domaine moins important que ceux cités précédemment.

IV.8. Appareillage

Un spectrophotomètre IR fonctionne selon un principe similaire à celui de la spectroscopie UV-visible : il mesure **l'absorption d'un rayonnement électromagnétique** par un échantillon en fonction de la **longueur d'onde**. En IR, le rayonnement se situe dans le **domaine du proche infrarouge (IR)**. Un spectrophotomètre IR (**Figure IV.10**) est composé de :

- **Une source de rayonnement** : Dans les sources thermiques, la radiation lumineuse est le résultat de l'échauffement d'un filament métallique parcouru par un champ électrique. On utilise alors une source GLOBAR à base de carbure de silicium. Cette source thermique présente de nombreux avantages. Elles émettent des radiations lumineuses couvrant une grande plage de longueurs d'onde elle reste stable pendant de longue période.
- **Echantillon** : Le rayonnement IR traverse l'échantillon. Celui-ci absorbe certaines longueurs d'onde spécifiques, en fonction des vibrations moléculaires.
- **Système dispersif** : le spectrophotomètre IR peut fonctionner selon **deux principes différents** :

Mode à balayage (ancien) : Utilise un **réseau optique rotatif** pour séparer le rayonnement incident en différentes longueurs d'onde. Les longueurs d'onde sont analysées **une à une**, ce qui **prend du temps**.

Mode à transformée de Fourier (FTIR, moderne) : Utilise un **interféromètre de Michelson** : Composé de **deux miroirs** et d'un **miroir semi-réfléchissant**. Il produit un **interférogramme**

contenant toutes les longueurs d'onde à la fois. L'interférogramme est ensuite **traité mathématiquement** par **transformée de Fourier** pour obtenir le spectre IR.

- **Interféromètre de Michelson** : dispositif optique qui produit des interférences par division d'amplitude. Il est composé de deux miroirs et d'une lame semi-réfléchissante).

La spectroscopie IR à balayage, relativement ancienne, nécessite un temps important.

Les avantages de FTIR sont un gain de temps important et une grande précision sur la fréquence

- **Détecteur** : le plus utilisé est un détecteur pyroélectrique. Il s'agit d'un cristal de deutérium try glycine sulfate (DTGS). Il détecte les variations de température et les transforme en variation d'intensité.
- L'intensité du faisceau qui arrive au détecteur est traduite sous forme d'interférogramme qui est ensuite traité par transformé de Fourier (un processus mathématique)

Le **Figure IV.10** décrit le principe de fonctionnement d'un **spectrophotomètre IR à double faisceaux**.

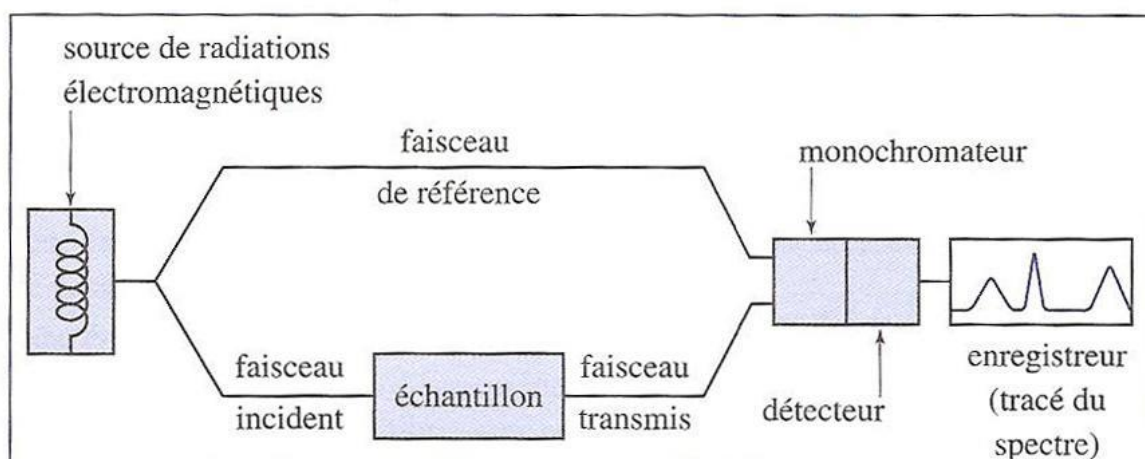


Figure IV.10 : spectrophotomètre IR à double faisceau.

Le faisceau du bas passe à travers l'échantillon testé. Le faisceau du haut correspond à un **verre**, car celui-ci est opaque pour les radiations IR utilisées. Dans la pratique, on emploie par exemple des pastilles de chlorure de sodium monocristal, ou du bromure de potassium. Les signaux de chaque faisceau sont alors combinés de manière à faire disparaître l'influence de la référence puis un système dispersif monochromateur (prisme ou réseau) sépare les différentes longueurs d'onde présentes dont l'intensité est ensuite mesurée par le détecteur

Pour chaque longueur d'onde, l'**intensité I_t transmise** par l'échantillon est comparée à l'**intensité incidente I_0** , afin d'en déduire la **transmittance T** .

On obtient des spectres qui mesurent la transmittance en fonction du nombre d'onde :

$$T = \frac{I_t}{I_0} \quad (IV.6)$$

I_t : intensité du faisceau transmis (après passage dans l'échantillon)

I_0 : intensité du faisceau incident (faisceau de référence)

La loi de Beer -Lambert est aussi valable en spectroscopie IR :

$$A = -\log T = -\log\left(\frac{I_t}{I_0}\right) = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot C \quad (IV.7)$$

1. Préparation de l'échantillon

La préparation dépend de l'appareil utilisé : on peut soit **analyser directement le composé pur** soit **le solubiliser dans un solvant** (pour un liquide) ou **le disperser dans un solide** (pour un solide) avant l'analyse.

- **Analyse du composé pur** : On place quelques gouttes (pour un liquide) ou une pointe de spatule (pour un solide) entre des plaques faites d'un sel qui n'absorbe pas dans le domaine de l'infrarouge (NaCl, KBr, AgCl).

- **Analyse du composé dilué ou dispersé** :

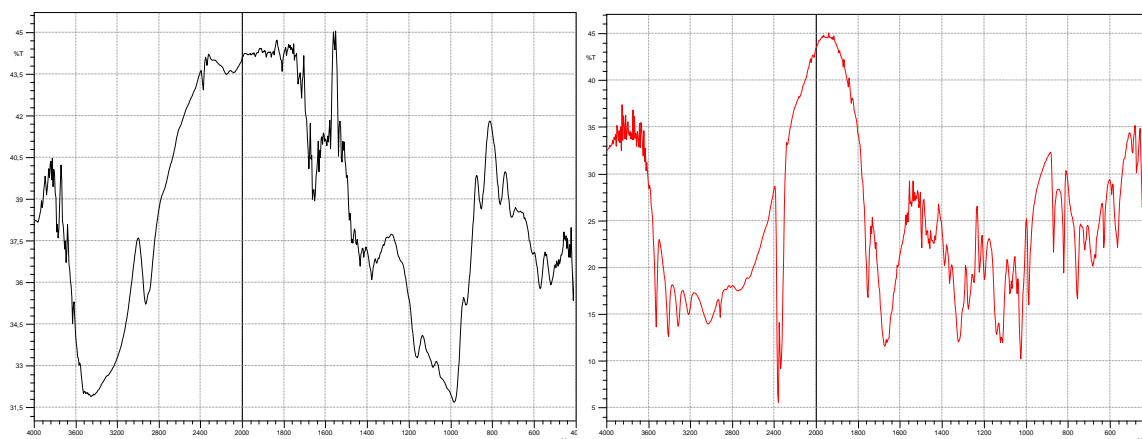
Pour les solides, on prépare une pastille de bromure de potassium (KBr) à l'aide d'une presse dans laquelle on a dispersé le composé à analyser.

Pour les liquides, on mélange le composé à un solvant inerte (le plus souvent le tétrachlorure de carbone). Ce solvant absorbe dans l'infrarouge, mais on peut s'affranchir de ce problème en plaçant une cellule de compensation contenant le solvant pur sur le trajet du faisceau de référence.

IV.9. Exercice d'application

Exercice N° 1 :

Attribuer ces spectres aux molécules d'amidon et d'acide ascorbique



Spectre (A)

Spectre (B)

Solution :**Le spectre (A) :**

Le spectre (A) révèle la présence des bandes suivantes :

- **3600-3000 cm⁻¹** : élongation d'**OH** des alcools.
- **2930 cm⁻¹** : élongation de **CH₂** de l'alcool primaire.
- **1650 cm⁻¹** : déformation des **OH** d'alcool tertiaire cyclique.
- **1500-1300 cm⁻¹** : déformation de **CH₂** de cycle.
- **1164 cm⁻¹** : élongation de liaisons **C-O-C** de cycle glucoside (alcool tertiaires).
- **1050-990 cm⁻¹** : élongation des **C-O** des alcools primaires.

On remarque la présence de la plupart des bandes d'absorption IR caractéristiques des liaisons chimiques de l'amidon.

Le spectre (B) :

Les bandes observées sur le spectre (B) sont les suivantes :

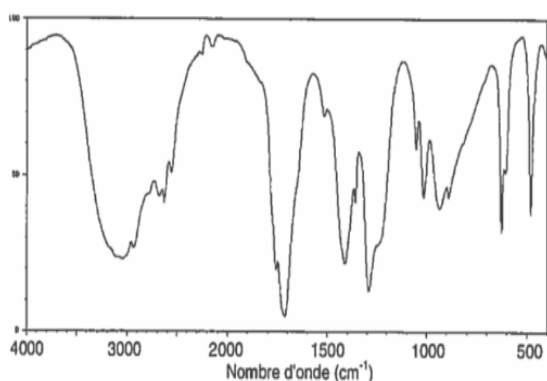
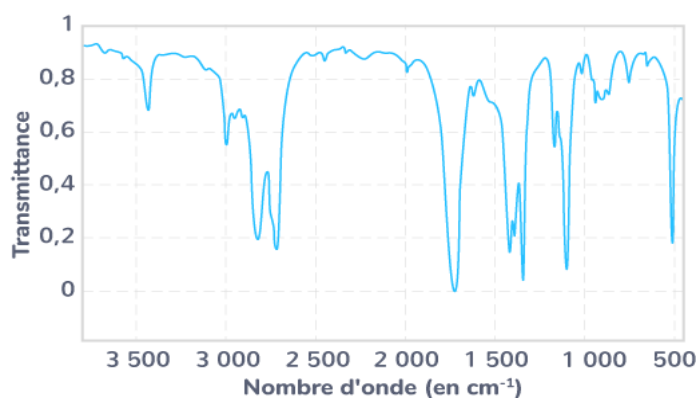
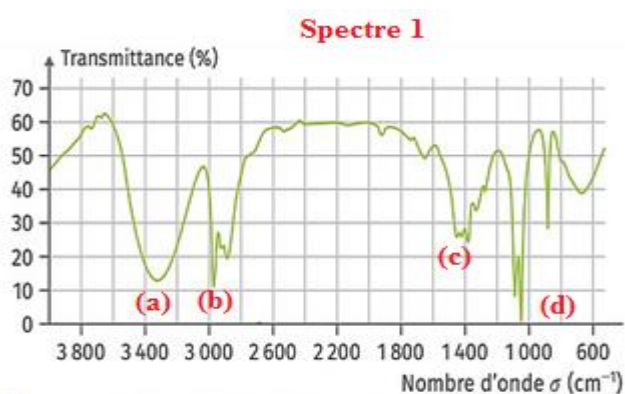
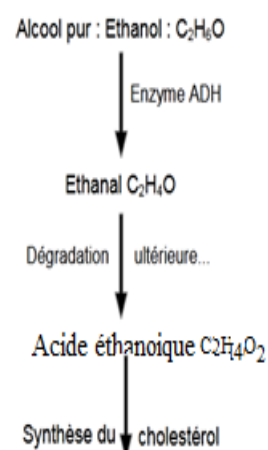
- **3000-3600 cm⁻¹** : élongation OH de l'alcool.
- **1753 cm⁻¹** : élongation C=O de l'ester cyclique.
- **1650 cm⁻¹** : élongation C=C.
- **1325 cm⁻¹ et 1276 cm⁻¹** : déformation du OH de l'alcool tertiaire et secondaire.
- **1143 cm⁻¹** : élongation de C-O de la fonction ester.
- **1029 cm⁻¹** : élongation de C-O d'alcool primaire.

On remarque la présence de la plupart des pics caractéristiques de l'acide ascorbique. De ce fait on peut dire que ce spectre est attribué à la molécule d'acide ascorbique.

Exercice N° 2

Selon l'Institut suisse de prévention de l'alcoolisme (ISPA), quand une personne consomme de l'alcool, celui-ci commence immédiatement à passer dans le sang et que ce dernier est éliminé en majeure partie par le foie.

Dans le foie, l'alcool est éliminé en deux étapes grâce à des enzymes. Dans un premier temps, l'alcool est transformé en éthanal par l'enzyme alcool déshydrogénase (ADH). L'éthanal est une substance très toxique, qui provoque des dégâts dans l'ensemble de l'organisme. Dans un deuxième temps, l'éthanal est transformé en acide éthanoïque par l'enzyme acétaldéhyde déshydrogénase (ALDH) qui est introduit dans la synthèse des acides gras et du cholestérol.



Famille	Liaison	Nombre d'onde (cm ⁻¹)
Alcane	C _{tétra} -H	1415 - 1470
Aldéhyde	C _{tri} -H	2700 - 2900
	C=O	1720- 1740
Acide carboxylique	O-H	2500 - 3200
	C=O	1740 - 1800
Alcane	C-H	2800 - 3000
Alcool	O-H _{lié}	3200 - 3450
	O-H _{libre}	3600 - 3700
Alcool, Acide	C-O	1000 - 1300

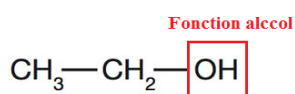
1. Représenter la formule semi-développée de ces trois molécules et encadrer leurs fonctions caractéristiques.
2. En utilisant le spectre 1 et la table ci-dessus, identifier les bandes (a), (b), (c) et (d).
3. En utilisant les spectres et la table ci-dessus, associer chaque spectre infrarouge (IR) à la molécule correspondante en justifiant.

4. Dans les acides carboxyliques, l'absorption du rayonnement IR par la liaison simple C – O du groupe d'atomes C – OH est observée vers 1300 cm^{-1} alors que celle de la liaison double C = O est observée aux alentours de 1700 cm^{-1} . Calculer et comparer la constante de raideur des deux liaisons.

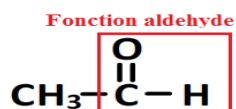
Solution

- a. Représenter la formule semi-développée de ces trois molécules et encadrer leurs fonctions caractéristiques.

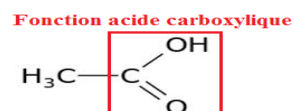
Ethanol :



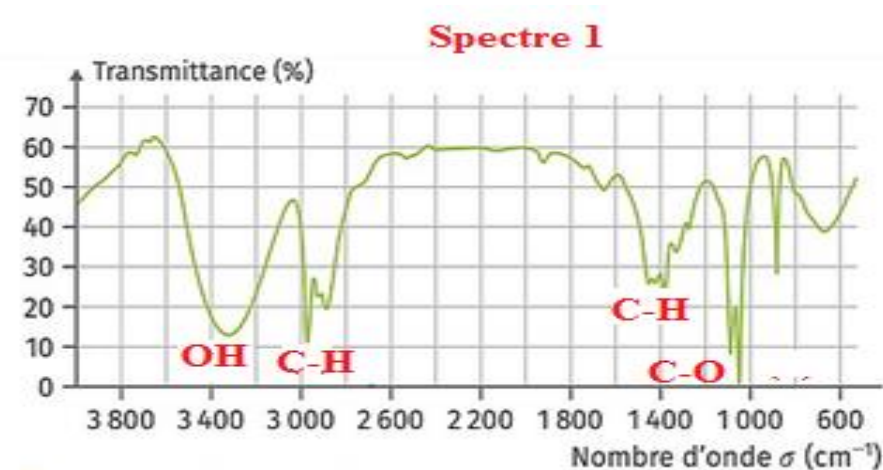
Ethanal :



acide éthanoïque :

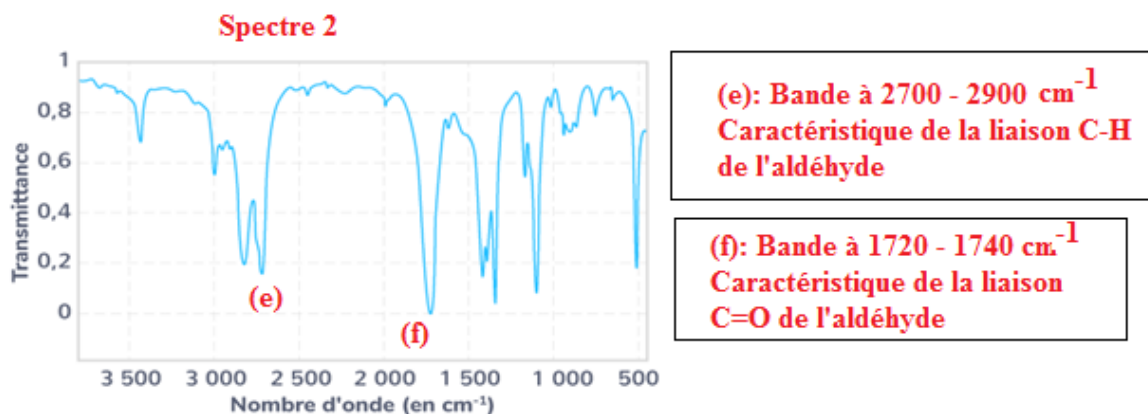


- b. En utilisant le spectre 1 et la table ci- dessus, identifier les bandes (a), (b), (c) et (d).

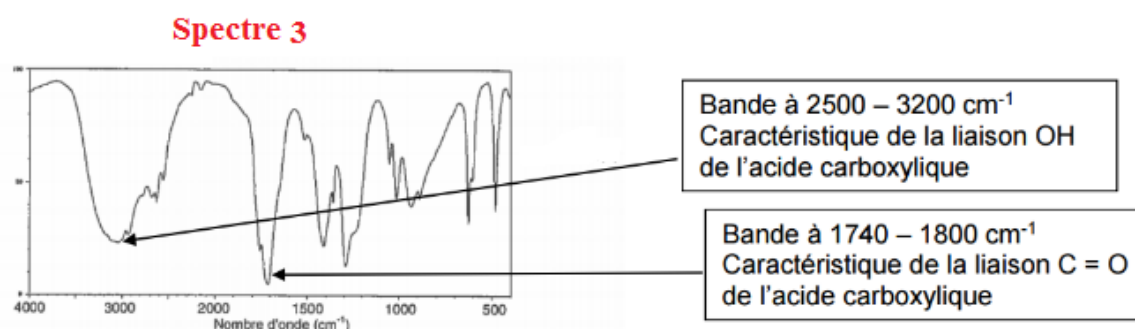


- c. En utilisant les spectres et la table ci- dessus, associer chaque spectre infrarouge (IR) à la molécule correspondante en justifiant.

Le spectre IRN°1 correspond à l'**éthanol** (la fonction alcool)



Le spectre IRN°2 correspond à l'éthanal (la fonction aldéhyde)



Le spectre 3 correspond à l'acide éthanoïque

- d. Dans les acides carboxyliques, l'absorption du rayonnement IR par la liaison simple C – O du groupe d'atomes C – OH est observée vers 1300 cm^{-1} alors que celle de la liaison double C = O est observée aux alentours de 1700 cm^{-1} . Calculer et comparer la constante de raideur des deux liaisons.

$$\sigma_0 = 4,12 * \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

$$K = \mu * \left(\frac{\sigma_0}{4,12}\right)^2 \text{ avec } \mu = \frac{m_C m_O}{m_C + m_O} = \frac{12 * 16}{12 + 16} = 6.857 \text{ g.mol}^{-1}$$

$$K_{C-O} = 6.857 * \left(\frac{1300}{4,12}\right)^2 = 682708.75 = 6.827.10^5 \text{ dyne.cm}^{-1}$$

$$K_{C=O} = 6.857 * \left(\frac{1700}{4,12}\right)^2 = 11.674 * 10^5 \text{ dyne.cm}^{-1}$$

On remarque que $K_{C=O} > K_{C-O}$, on conclut que la constante de raideur est inversement proportionnelle avec le nombre d'onde.

Chapitre V : la turbidité

V.1. Photométrie des milieux troubles

Les solutions hétérogènes comme les solutions macromoléculaires dispersées (solutions colloïdale) ou les suspensions de fines particules ou de cellules développent avec la lumière des interactions complexes, que l'œil interprète par la vision d'un trouble.

Dans un milieu trouble, chaque particule se comporte comme une source secondaire de lumière. Lorsque la lumière entre en interaction avec la matière, elle peut être **réfléchi**e, **transmise**, **absorbée** ou **diffusée** (Figure V.1).

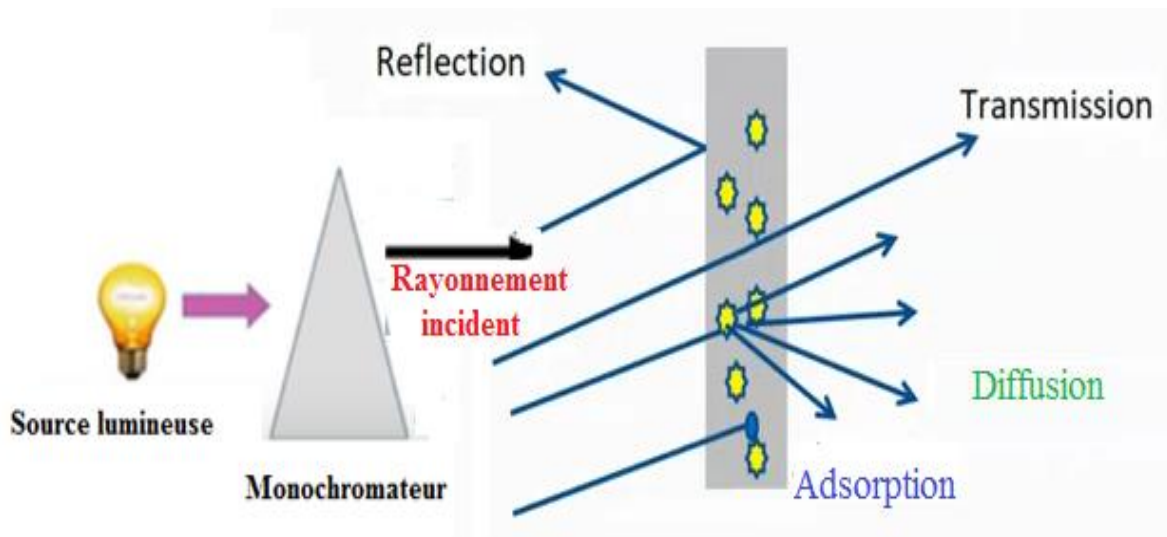


Figure V. 1 : Interactions entre la lumière incidente et la matière.

Cette figure montre que lorsque le rayonnement incident provenant d'une source lumineuse éclaire le mélange, ils se produit plusieurs types de rayonnement :

- Le rayonnement **transmis** : c'est la part du rayonnement lumineux passant à travers la cuve. Dans le cas d'un mélange totalement opaque, il n'y a pas de transmission ;
- Le rayonnement **absorbé** : c'est la part d'énergie absorbée par les particules et généralement transformée en chaleur ;
- Le rayonnement **diffusé** : le phénomène de diffusion de la lumière (light scattering) est caractérisé par le fait qu'une fraction de la lumière reçue à une longueur d'onde donnée

va être renvoyée à la même longueur d'onde dans toutes les directions. Les théories physiques de la diffusion de la lumière distinguent deux phénomènes de diffusion :

- Les phénomènes de diffusion par les particules de dimension de l'ordre de quelques nanomètres (en pratique les molécules). (Diffusion de Rayleigh de faible intensité, dépendant de la longueur d'onde d'éclairement).
- Les phénomènes de diffusion de la lumière par des particules de dimension 1/20 à 10 fois la longueur d'onde d'éclairement. (Diffusion de forte intensité et est peu influencée par la longueur d'onde d'éclairement).

V.2. Principe de la diffusion de la lumière en milieu trouble

Lorsque les particules en suspension sont traversées par un rayon lumineux de lumière blanche (**Figure V.2**), ces particules diffusent la lumière. Ce qui nous permet de voir le faisceau dans la solution contrairement à celle qui ne contient pas des particules. Cet effet a été décrit par Tyndall en 1854 et fut quantifié par Lord Rayleigh en 1871.

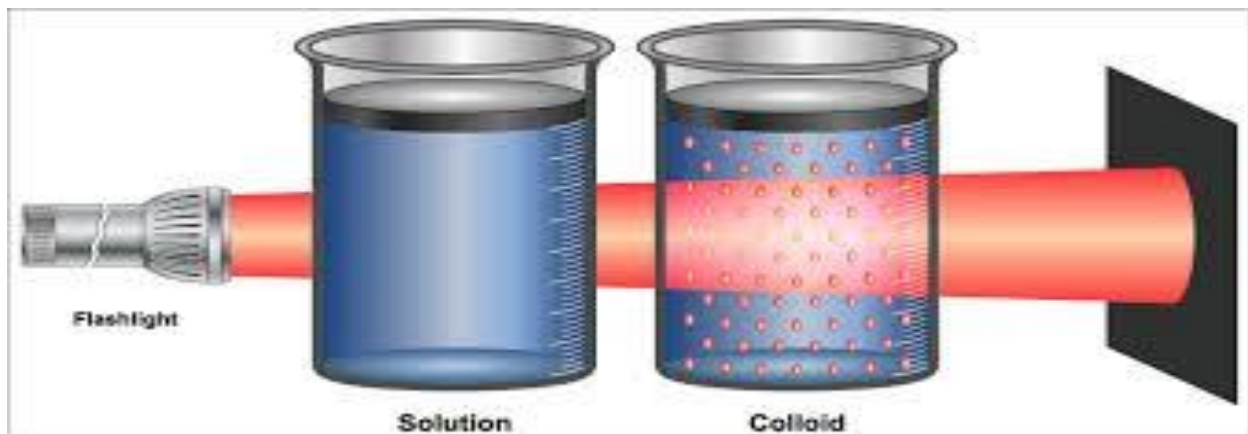


Figure V. 2 : Effet de Tyndall

V.2.1. Loi de diffusion de Rayleigh

Le modèle de Rayleigh s'intéresse aux petites particules sphériques de taille inférieure au 1/20e de la longueur d'onde de la lumière incidente. La lumière incidente d'intensité I_0 et de longueur d'onde λ induit sur de telles particules une lumière réémise dans toutes les directions avec une longueur d'onde identique à celle de la lumière incidente. La formule de Rayleigh permet de connaître l'intensité de la lumière diffusée à un angle de la lumière incidente

$$I_d = I_0 \cdot \frac{8 \cdot \pi^4}{r^2 \cdot \lambda^4} \cdot \alpha^2 \cdot (1 + \cos^2 \theta) \quad (V.1)$$

I_d : intensité de lumière diffusée (candela).

I_0 : intensité de lumière incidente

r : distance entre la particule et le point d'observation (le détecteur)

a : polarisation de la molécule ($C^2 \cdot m^2 \cdot j^{-1}$)

λ : longueur d'onde de la lumière incidente

V.2.2. Facteurs influençant la diffusion

Plusieurs facteurs influencent le phénomène de diffusion :

- La taille des particules :
- **La longueur d'onde de la lumière incidente** : l'augmentation de celle-ci conduit à la diminution de l'intensité de la lumière incidente.
- **La distance d'observation (r)** (distance d'emplacement du détecteur) : l'intensité de la lumière diffusée diminue lorsque la distance r augmente.
- **La concentration des particules** : L'intensité de lumière dispersée est proportionnelle au nombre de particules présentes.
- La masse molaire des particules.
- Polarisation de la lumière incidente.

V.3. Définition de la turbidité

La turbidité est une caractéristique optique de l'eau, à savoir sa capacité à diffuser ou absorber la lumière incidente. Elle est causée par la présence de particules en suspension dans le liquide - telles que des argiles, des matières organiques, des microorganismes ou d'autres solide fins qui empêche la lumière de passer de manière rectiligne (**Figure V.3**).

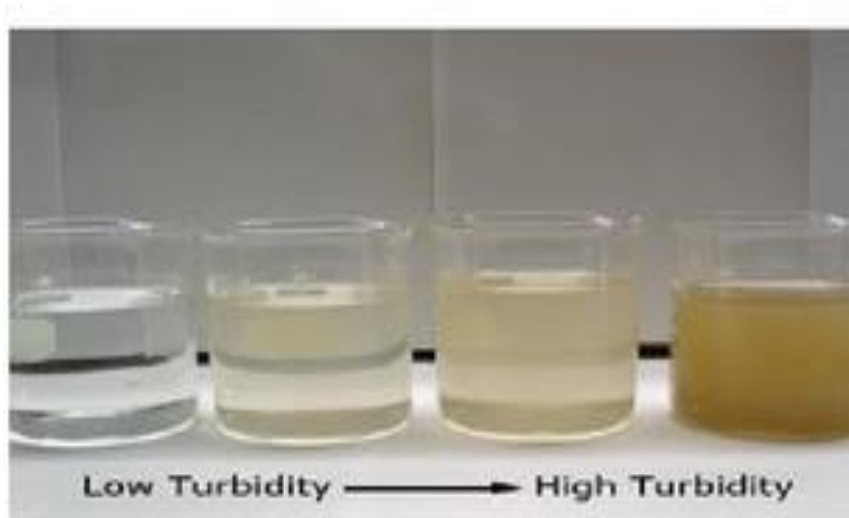


Figure V.3 : Turbidité.

V.4. Méthodes de mesure de la turbidité

Il existe plusieurs méthodes pour mesurer la turbidité de l'eau à savoir :

V.4.1. Méthode de disque de Secchi

C'est la première méthode de mesure de la turbidité qui a été inventé par l'astronome italien Angelo Secchi. Cette méthode consiste à utiliser un disque de 20 cm de diamètre avec des quadrants noirs et blancs alternés (**Figure V.4**). Il est attaché à une ligne calibrée et muni d'un lest pour qu'il coule rapidement.

La visibilité du disque de Secchi est généralement indiquée en centimètres, et dans les eaux naturelles, la valeur peut varier de quelques centimètres à plusieurs mètres. Ce disque est immergé au bout d'un filin étalonné jusqu'à sa disparition et permet d'indiquer la profondeur moyenne à partir de laquelle on ne voit plus le disque à l'œil nu. La profondeur est ensuite corrélée aux unités de mesure de turbidité

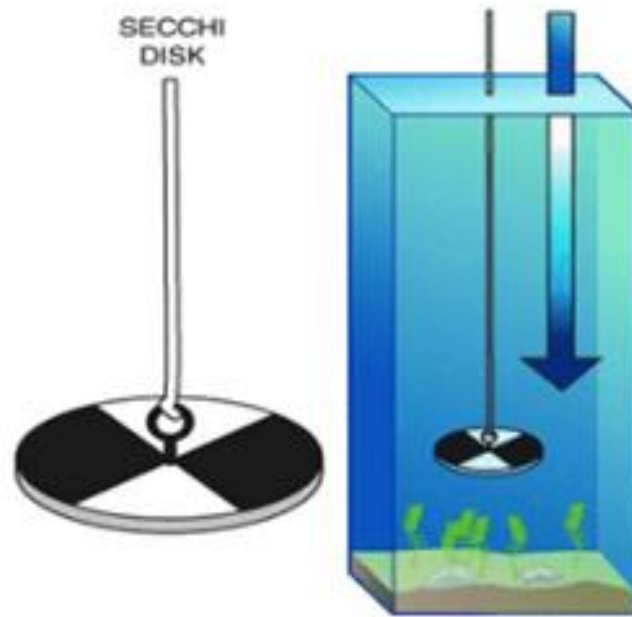


Figure V.4 : Disque de Secchi

Exemple :

Mesure de la croissance des cultures de phytoplancton (Figure V.5). Dans cet exemple ils ont remplacé la corde par une baguette en bois ou plastique (pour faciliter les relevés). Sur cette baguette ils ont noté une graduation tous les 1 cm. Une graduation de 2cm à partir du disque correspondra à une culture bien concentrée (0.5g/l à 0.8g/l). Ils ont plongé par la suite le disque de Secchi bien perpendiculairement dans le milieu de culture (récipient préparé à l'avance).

Ils ont enfoncé le disque de Secchi jusqu'à ce qu'il ne soit plus visible dans le liquide. A ce moment-là, ils ont noté bien sur la baguette graduée le niveau atteint. Ensuite ils ont ressorti la baguette et ils ont regardé le nombre de centimètre immergé.



Figure V.5 : mesure de la turbidité d'un milieu de culture

V.4.2. La méthode de bougie de Jackson

L'unité de turbidité Jackson (UTJ) est une unité historique utilisée lorsque les mesures ont été effectuées visuellement à l'aide d'un turbidimètre à bougie de Jackson. Cette méthode utilise un long tube de verre placé au-dessus d'une bougie à luminosité normalisée et gradué en unités de turbidité Jackson (**Figure V.6**).

On ajoute de l'eau dans le tube jusqu'à ce que la flamme ne soit plus perçue de manière nette. Une hauteur d'échantillon de 21,5 cm correspond à 100 JTU. La plus faible turbidité que l'on puisse mesurer avec cette méthode est d'environ 25 NTU (Nephelometric Turbidity Unit). L'unité JTU se base sur la comparaison d'un liquide (tel que l'eau) avec un volume défini d'acide silicique dissous provenant de terre à diatomée dans l'eau.

Le turbidimètre à bougie de Jackson ne s'applique qu'aux turbidités supérieures à 25 UJT, ce qui par conséquent limite son utilité pour la surveillance de l'eau potable.

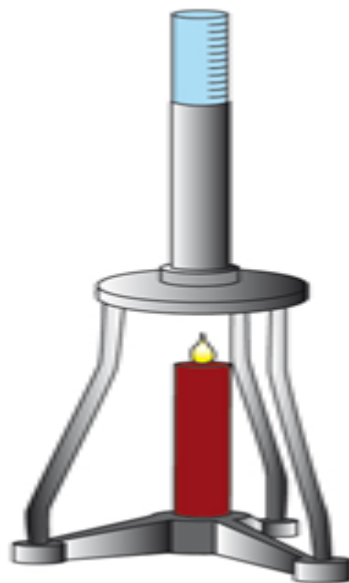


Figure V.6 : Turbidimètre à bougie de Jackson

Remarque :

Ces deux premières méthodes font face à plusieurs limites, à savoir l'inaptitude de détecter des niveaux très bas de turbidité et la subjectivité des mesures du fait qu'elles sont basées sur l'observation humaine, ce qui introduit des erreurs de perception et de jugement personnel.

Des instruments perfectionnés utilisant des sources de lumière électriques et des miroirs, comme le turbidimètre de Patterson,⁴ peuvent mesurer des valeurs plus faibles.

V.4.3. Turbidimétrie

La turbidimétrie est la mesure de l'intensité de la **lumière transmise** par le milieu. Elle est mesurée dans **l'axe du rayon incident** (180°). La lumière a été perdue par absorption, réflexion et diffusion. Elle est adaptée aux **milieux de haute turbidité** dans lesquels les particules solides sont de **grande taille**.

L'intensité de la lumière transmise est **inversement proportionnelle** à la concentration des particules en suspension.

V.5. Turbidimètre

Un turbidimètre comprend (**Figure V.7**):

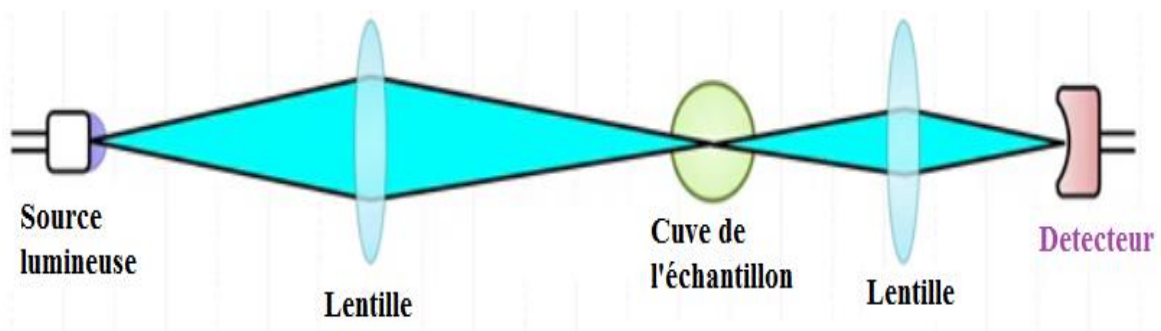


Figure V.7. Un turbidimètre

a) **Source lumineuse :** Usuellement, (dans les deux techniques), les sources lumineuses fournissent des faisceaux à des longueurs d'onde allant de **340 à 650 nm**. Ainsi, on utilise :

- Arc de mercure
- Arc au xénon
- Lampe tungstène avec monochromateur de 400-550 nm
- Lampe laser hélium-néon qui émet à $\lambda = 632,8 \text{ nm}$
- Lampe laser hélium-cadmium qui émet à $\lambda = 441,6 \text{ nm}$

b) **Sélecteur de longueur d'onde :** Pour obtenir un rayonnement monochromatique, il est nécessaire de décomposer la lumière polychromatique fournie par la lampe en ses différents constituants et de sélectionner une longueur d'onde donnée en utilisant soit (**Figure V.8**):

- Filtres : colorés ou interférentiels

- Monochromateur : constitué d'une fente d'entrée de la lumière avec un système de dispersion de la lumière qui peut être un prisme ou un réseau.

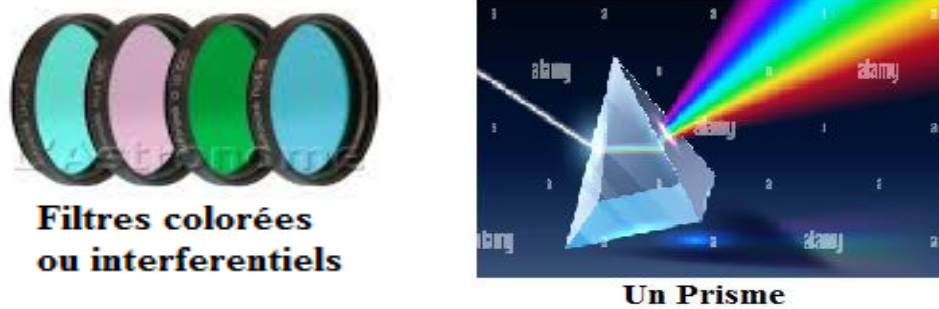


Figure V.8 : Sélecteurs de longueur d'onde

- c) **Cuve** : Faces parallèles Transparente pour les longueurs d'ondes utilisées.
- d) **Dispositif d'élimination de la lumière diffusée** : La lumière diffusée peut être éliminé :
- Soit en interposant un système de fentes ou cylindre métallique creusé de canaux, entre la cuve et le récepteur.
 - Soit en interposant une lentille convergente entre la cuve et le détecteur (**Figure V.9**).

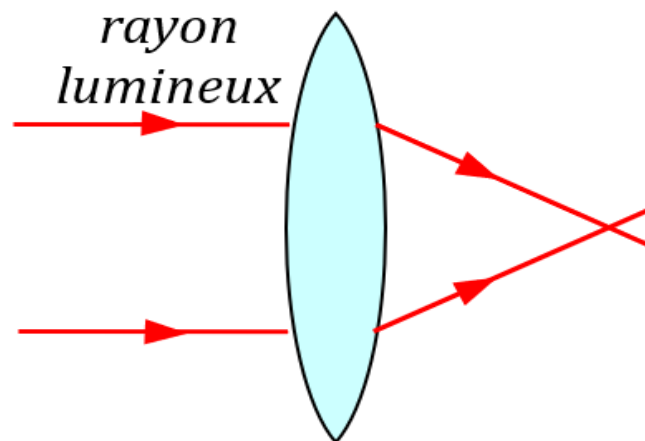


Figure V.9 : Lentille convergente.

- e) **Détecteur** : Le détecteur convertit en un signal électrique l'intensité de la radiation lumineuse qui l'atteint. On utilise soit
- Un tube photomultiplicateur,
 - Soit une photodiode : Système de mesure du courant amplifié :
 - Un galvanomètre : un système informatique de traitement des données

V.6. Néphélométrie

La néphélométrie est une des techniques de mesure de la teneur de particules en suspension ou de la turbidité d'un milieu (respectivement gazeux ou liquide). Elle fait partie de la photométrie des milieux troubles. Elle consiste à mesurer **la lumière diffusée à 90°** d'angle par rapport à la lumière incidente.

➤ Appareillage

Le néphélomètre (**Figure V.10**) comprend les mêmes éléments que le turbidimètre. La seule différence est que la lumière diffusée dans toutes les directions est réfléchi à 90° par un miroir sphérique qui envoie quasiment la totalité de la lumière diffusée vers le détecteur qui est relié à un système de traitement de signal obtenu.

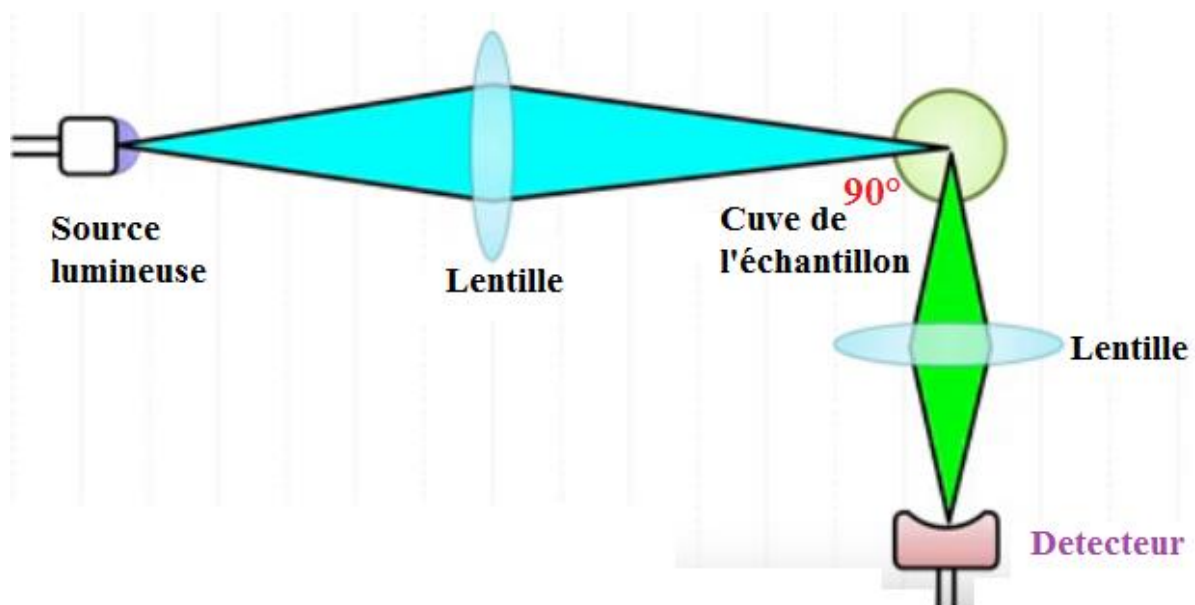


Figure V.10 : Un néphélomètre

V.6. Unités de mesure de la turbidité

Pour que les mesures de turbidité puissent être comparables, il est nécessaire de faire référence à un étalon ou matériau de référence international. Plusieurs étalons ont été utilisés comme **la silice**, **la terre de foulon**, **le kaolin** et **la terre diatomées**. Cependant les résultats obtenus en utilisant ces étalons n'étaient pas très satisfaisants. De plus, ces étalons n'étaient pas internationaux. Un autre étalon a été proposé, c'est la **formazine** qui présente l'avantage de

pouvoir être produite à partir de produits chimiques purs servant de matériau de référence et permettant d'obtenir une incertitude certifiée.

Dans le domaine de l'eau, la norme (NF EN ISO 7027) décrit deux unités de mesure de la turbidité :

- **FNU** (*Formazine Nephelometric Unit*) ou **NFU** (unité néphélométrique formazine). Cette unité mesure la turbidité sous un angle de **90°** à une longueur d'onde de **860 nm** ;
- **FAU** (*Formazine Attenuation Unit*, unité d'atténuation formazine) mesure la lumière transmise à **180°**.
- **NTU** (Nephelometric turbidity unit) (**UTN** en Français). La mesure s'effectue sur la lumière diffusée à **90°**, mais à une longueur d'onde **différente de 860 nm**. (C'est une unité prescrite par l'agence de protection de l'Environnement EPA – USA).

Les unités citées précédemment (NTU, FNU, FTU et FAU) sont toutes basées sur des étalonnages utilisant les mêmes étalons primaires de formazine. Par conséquent, lorsqu'un étalon de formazine est mesuré, la valeur sera identique pour chacune de ces unités, alors que la valeur des échantillons peut différer considérablement

Pour des turbidités inférieures à 10 à 20 NFU : **1 NFU = 1 NTU**. Au-delà **1 NFU = 0,6 NTU**.

V.7. Domaine d'application de la néphélométrie et de la turbidimétrie

a) *Domaine pharmaceutique*

Les turbidimètres sont principalement utilisés dans les laboratoires pharmaceutiques pour tester la solubilité des médicaments, ainsi que dans les criblages automatisés.

b) *Domaine biochimique*

- ❖ Dans les laboratoires de biochimie, les principales applications d'un turbidimètre comprennent l'interaction protéine-protéine, l'agrégation des protéines et les études de polymérisation.
- ❖ En immunologie, la détection néphélométrique est appliquée dans le développement de nouveaux anticorps et l'analyse de leur capacité de liaison aux antigènes.
- ❖ Dosages des protéines spécifiques du sérum et du plasma : Marqueurs de l'état immunitaire (IgG, IgA, IgM, chaînes légères liées kappa et lambda, fractions du complément C₃ et C₄, β₂-microglobuline, complexes immuns. La précipitation des protéines globulaires fait

référence à la formation d'agrégats de protéines par l'ajout, par exemple, de sel ou de solvant organique. En revanche, l'immunoprécipitation permet de précipiter sélectivement une protéine donnée par une réaction anticorps-antigène.

c) Domaine microbiologique

La néphélométrie peut être utilisée pour étudier l'effet des **médicaments antimicrobiens** sur la cinétique de **croissance microbienne**.

d) Domaine de Chimie organique

En chimie organique, la néphélométrie est utilisée pour quantifier les macromolécules, par exemple en suivant une réaction de polymérisation.

Les autres applications

Les applications des turbidimètres sont très diverses et nous les rencontrons dans :

- Le traitement des eaux potables pour contrôler le bon fonctionnement des équipements de sédimentation, floculation, décantation, filtration ;
- Le traitement des eaux résiduaires ;
- L'industrie alimentaire : boissons, soupes, laiterie, fromagerie, etc. ;
- L'analyse des sulfates ;
- Les traitements de surface ;
- Les installations thermiques pour le contrôle de la qualité des eaux :
Contrôle de la silice colloïd.

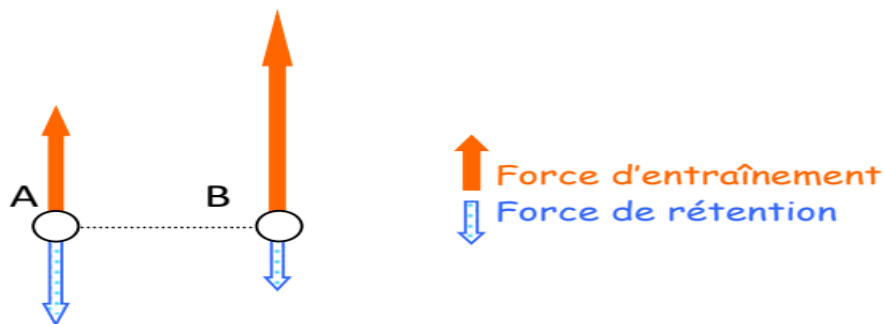
Chapitre VI : la chromatographie

VI.1. Généralités

Les méthodes chromatographiques sont des méthodes de **séparation** mettant en jeu différents **processus physico-chimiques**. Contrairement à la centrifugation qui est une technique séparative et ne donne aucune information analytique sur les molécules ou leurs constituants. Les différentes techniques de chromatographie permettent une séparation fine des molécules, ainsi que leur **analyse** et leur **dosage**, à condition de posséder le matériel approprié (notamment les détecteurs).

VI.2. Principe de la chromatographie

La chromatographie est une méthode de **fractionnement** qui permet la séparation des constituants par **entraînement** à l'aide d'une **phase mobile** le long d'une **phase stationnaire** (qui peut être solide ou liquide fixé) et qui va exercer une **force de rétention** tel schématisé ci-dessous. Donc chaque soluté est soumis à deux forces qui vont le faire migrer plus ou moins vite.



Force de rétention : due aux interactions avec la phase stationnaire, elle ralentit la migration.

Force d'entraînement : due à la dissolution du soluté dans la phase mobile continuellement renouvelée et elle accélère la migration.

La résultante de ces forces est caractéristique pour chaque constituant, ce qui permettra une migration différentielle des solutés d'un mélange obtenue par **la partition différentielle** des solutés entre la phase stationnaire et la phase mobile.

Le principe de base repose sur les équilibres de concentration qui apparaissent lorsqu'un composé est mis en présence de deux phases non miscibles.

- L'une **stationnaire**, appelée phase **fixe**, est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support.
- L'autre, dite **mobile**, se **déplace** au contact de la première.

Si plusieurs composés sont présents, il se trouve entraînés à des vitesses différentes provoquant leur séparation. A l'équilibre :

$$A_{\text{Phase mobile}} \xrightleftharpoons{K} A_{\text{Phase stationnaire}}$$

$$K = \frac{C_{(A)S}}{C_{(A)M}} = \frac{n_{(A)S}}{n_{(A)M}} \cdot \frac{V_M}{V_S} \quad (\text{VI.1})$$

Donc K est égal au rapport des concentrations du soluté A dans les deux phases

Avec :

K : Coefficient de distribution (partition ou de partage)

C_S : Concentration de l'analyte dans la phase stationnaire

C_M : Concentration de l'analyte dans la phase mobile.

V_S : volume de la phase stationnaire (fixe) ;

V_M : volume de la phase mobile (égal aussi au volume mort) ;

Remarque :

- K = 0 : le soluté est uniquement présent dans la phase mobile (exclu de la phase fixe)
- 0 < K < 1 : Soluté facilement dissous dans la phase mobile, mais aussi partiellement inclus dans la phase stationnaire (l'inclusion augmente avec K)
- K > 1 : inclusion et adsorption dans la phase fixe (interactions particulières).

IV.3. Les différents types de chromatographies

Les méthodes chromatographiques sont classées en fonction :

➤ *Des mécanismes de séparation*

Plusieurs facteurs intervenant dans le partage des molécules à séparer entre les phases fixe et mobile :

- **Solubilité** dans un solvant liquide (les solutés solubles dans le solvant migreront plus ou moins vite selon le type de chromatographie), (exp : chromatographie de partage).
- **Polarité**, (chromatographie d'adsorption).
- **Taille** (la forme), (chromatographie d'exclusion).
- **Charge électrique**, (exp : chromatographie d'échange d'ions).

- **Groupements** formant des sites de **reconnaissance** (exp : chromatographie par affinité).
 - **De la nature des phases mobile** : On distingue la chromatographie en phase liquide **CPL** (phase mobile **liquide**) ou chromatographie en phase gazeuse **CPG** (la phase mobile est un **gaz**).
 - **De la technique**

Selon le conditionnement de la phase stationnaire, on distinguera :

➤ **Chromatographie de surface (CCM)**

Elle peut se faire sur **papier** (phase stationnaire peut être elle-même le papier ou un fluide imbibé sur le papier) ou sur **couche mince (CCM)** (la phase stationnaire est une fine couche de gel de silice ou de cellulose déposée sur un support inerte).

➤ **Chromatographie sur colonne** :

On distingue :

Chromatographie à pression ambiante : la phase stationnaire est dans une colonne et la phase mobile liquide est distribuée par gravité (**colonne ouverte**), Cette méthode est la plus utilisée en chromatographie **d'échange d'ions**, **d'exclusion moléculaire** et **d'affinité**.

Chromatographie à haute pression : dans ce cas la phase stationnaire est tassée dans une colonne **fermée** et la phase mobile liquide circule sous l'effet d'une **haute pression**.

Selon la nature de la phase **mobile** on distingue : chromatographie liquide à haute pression (**HPLC**) et la chromatographie en phase gazeuse placées dans un four (**CPG**).

Le **Tableau VI.1** présente les principaux types de chromatographie en phase liquide et en phase gazeuse, ainsi que la nature de leurs phases stationnaires et les mécanismes de séparation associés. Il permet de comparer les différentes techniques selon le type d'interactions mises en jeu entre la phase stationnaire et les analytes.

Tableau VI.1: différents types de chromatographie

Chromatographie en phase Liquide		
	Type	Phase stationnaire
Liquide / Liquide	Partage phase normale	Solide poreux inerte enrobé de liquide polaire (moins utilisée)
	Partage phase inversée	Solide poreux portant des groupements non- polaires
Liquide / Solide	Adsorption phase normale	Solide poreux polaire
	Adsorption phase inversée	Solide poreux portant des groupements non- polaires
	Echange d'ions	Solide portant des groupements ioniques
	Exclusion moléculaire	Solide dont les pores permettent la séparation des macromolécules selon leur taille
	Affinité	Solide portant un groupement qui présente une bio-affinité pour la molécule cible.
Chromatographie en phase gazeuse		
Gaz/ Liquide	Partage phase normale	Solide poreux inerte enrobé de liquide polaire (moins utilisée)
	Partage phase inversée	Solide poreux portant des groupements non-polaire
Gaz/ Solide	Adsorption phase normale	Solide poreux polaire
	Adsorption phase inversée	Solide poreux portant des groupements non-polaires

VI.3.1. Chromatographie en phase liquide (CPL)

La phase mobile est un liquide. Selon la nature de la phase stationnaire, on distingue:

VI.3.1.1. La chromatographie d'adsorption

C'est une chromatographie liquide-solide. La phase stationnaire est un adsorbant solide (peut-être du papier, silice, alumine, cellulose...) polaire ou apolaire. La phase mobile (un solvant ou

un mélange de solvants ; éther de pétrole, alcool, acétone.) est de polarité inverse par rapport à la phase stationnaire (**Figure VI.1**).

- Si la **phase stationnaire** est **polaire** → la phase **mobile** doit être **apolaire** → Chromatographie d'adsorption **en phase normale**.
- Si la **phase stationnaire** est **apolaire** → la phase **mobile** doit être **polaire** → Chromatographie d'adsorption **en phase inversée**.

La phase stationnaire doit être **insoluble** dans la **phase mobile** et **inerte chimiquement** vis-à-vis des solutés et de la phase mobile (ie, elle ne modifie pas la nature de soluté et de la phase mobile) et elle doit **avoir un pouvoir adsorbant** important

La chromatographie d'adsorption peut se faire sur **couche mince** (la plus utilisée) ou sur **colonne**.

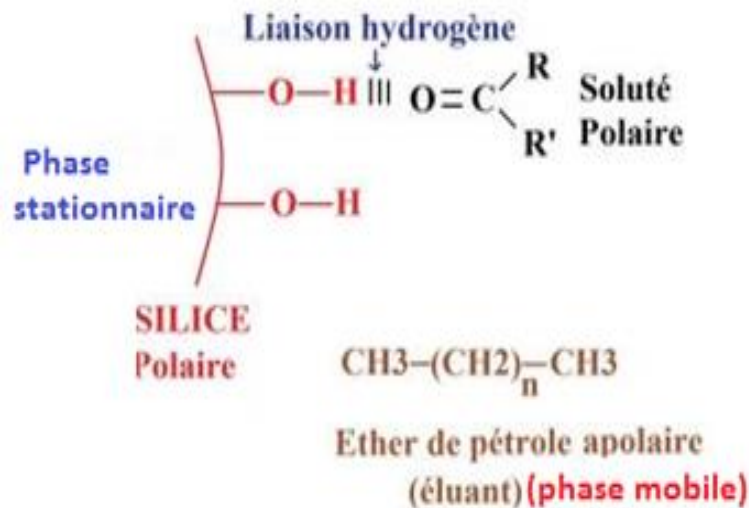


Figure VI.1 : Principe d'adsorption

Trois types de liaisons sont possibles :

- Des liaisons hydrogène (entre deux phases polaires)
- Liaisons hydrophobes (entre deux phases apolaires)
- Liaisons de Van der Waals (elle se forme aussi-bien avec des composés polaires et aussi non polaires)

Exemple :

Si on suppose qu'on a un mélange de deux solutés à séparer (une cétone O=CH-R et un alcane R-CH₃). Les séparations sont fondées sur des interactions entre les molécules à séparer et la phase stationnaire.

A) Si la phase stationnaire est polaire (Figure VI.2)

- L'**acétone** (molécule **polaire**) est **retenue** par la phase **stationnaire polaire** avec une **liaison hydrogène** donc elle migre lentement.
- L'**alcane** (molécule **apolaire**) et **entraîné** par la phase **mobile apolaire** donc il migre plus vite que l'acétone.

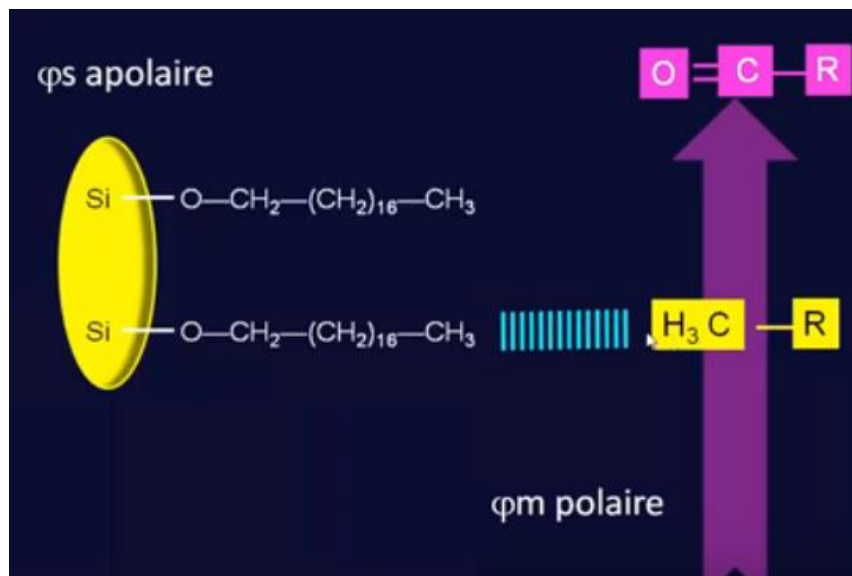


Figure VI.2 : principe de la chromatographie d'adsorption normale.

B) Si la phase stationnaire est apolaire (cas inverse) (Figure VI.3)

L'**alcane** (molécule **apolaire**) est **retenu** par la phase **stationnaire apolaire** avec des **liaisons hydrophobes** donc elle migre lentement.

L'**acétone** (molécule **polaire**) et **entraîné** par la phase **mobile polaire** donc il migre plus vite que l'alcane.

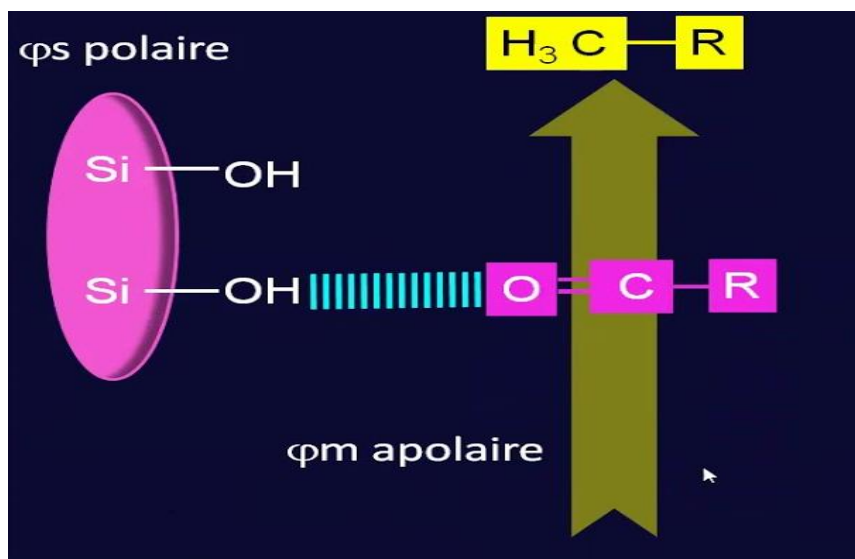


Figure IV.3 : principe de la chromatographie d'adsorption inverse.

La chromatographie d'adsorption peut se faire soit sur colonne, soit sur couche mince.

La méthode la plus utilisée est celle en surface, c'est –à-dire la chromatographie d'adsorption sur couche mince (**Figure VI.4**). Cette méthode consiste à :

1. Fixer une fine couche d'adsorbant (phase stationnaire) (Gel de silice, alumine,...) sur un support inerte (plaque de verre, feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium).
2. Après activation de la plaque par chauffage (à 100 °C pendant 30 min) pour éliminer l'humidité, on trace une ligne de dépôt sur la plaque (légèrement sans creuser le gel de silice), qui doit être au-dessus de la phase mobile, puis on procède au dépôt de quelques gouttes d'échantillons sans abimer le gel de silice.
3. Cette plaque est ensuite introduite dans la cuve pour procéder au développement de la chromatographie. La phase mobile monte par capillarité et permet la séparation des différents constituants. En outre, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant. Cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile.
4. Après avoir séché la plaque on passe à l'étape de **révélation** appropriée, qui peut se faire soit par **coloration**, soit par mesure d'**absorbance** ou d'**indice de réfraction**.

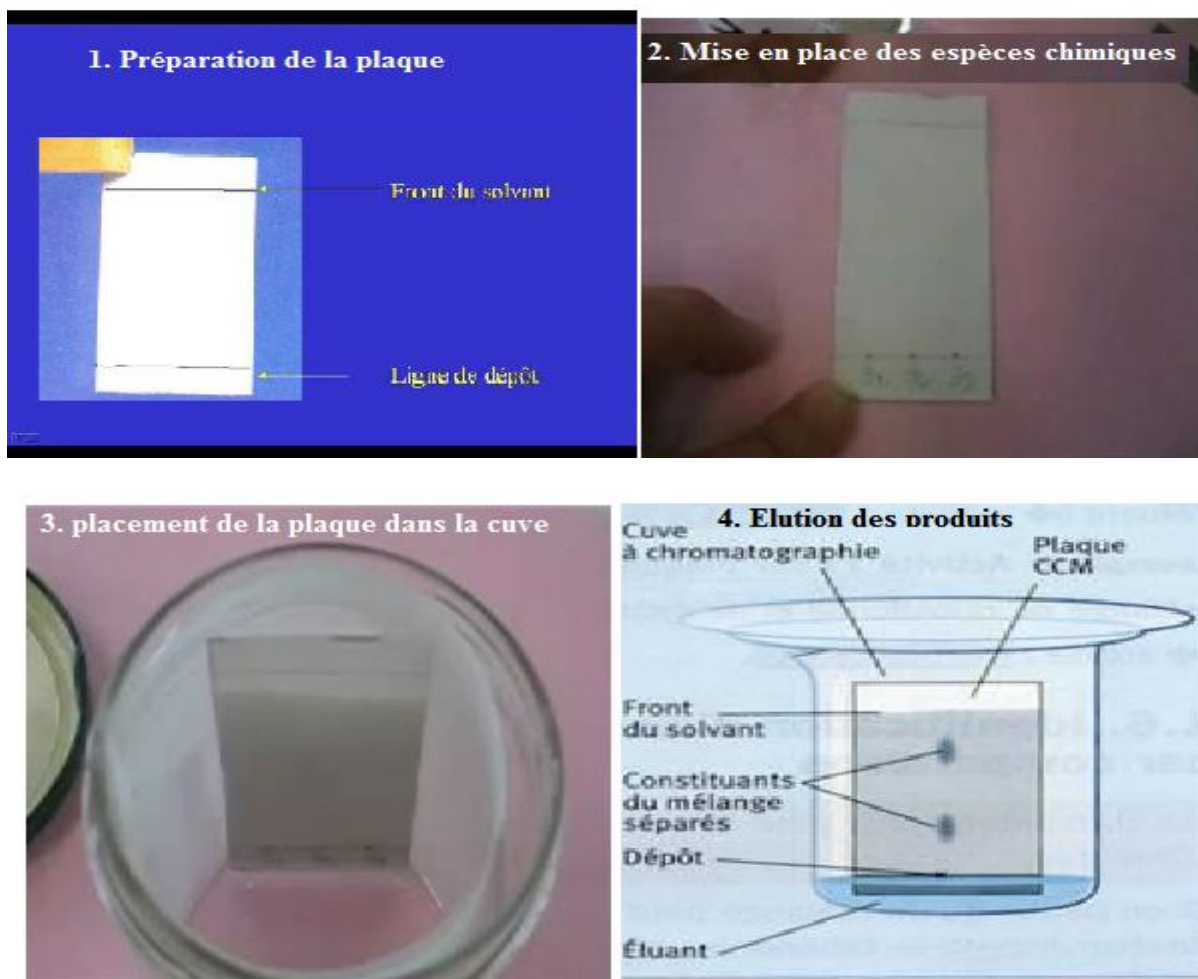


Figure VI.4 : Etapes de la chromatographie sur couche mince.

c) Révélation

- **A l'œil nu** : si le produit est coloré.
- **A la lampe UV** : les molécules qui absorbent les UV à 254 nm seront visibles (noyaux aromatiques par exemple (**Figure VI.5**)).
- **Avec un révélateur chimique** : l'iode est le premier révélateur à tester car il est non destructif. Il permet de révéler des doubles liaisons et les halogénures. L'iode est évaporé à chaud ou sous la hotte (**Figure VI.5**). De nombreux autres révélateurs existent : KMnO_4 , acide phosphomolybdique, vanilline, ninhydrine....

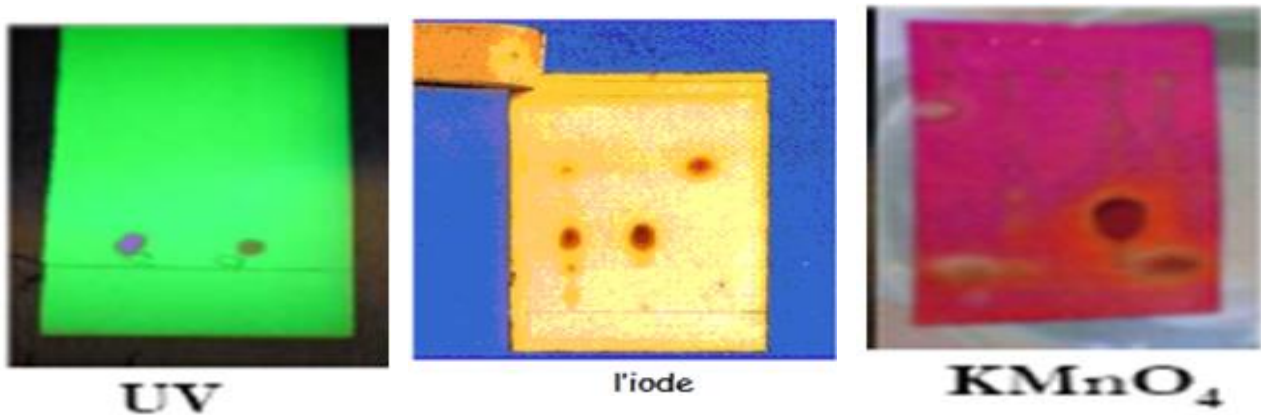


Figure VI.5 : Plaque CCM révélée par UV, l'iode et KMnO_4

d) Analyse des résultats

Pour chaque spot de l'essai analysé, on compare la couleur, la forme et le rapport frontal (R_F) avec ceux de témoins déposés sur la même plaque (**Figure VI.6**).

$$R_F = \frac{\text{distance de migration du soluté}}{\text{distance de migration du solvant}} \quad (\text{VI.1})$$

$$R_F = \frac{d}{D} \quad (\text{VI.2})$$

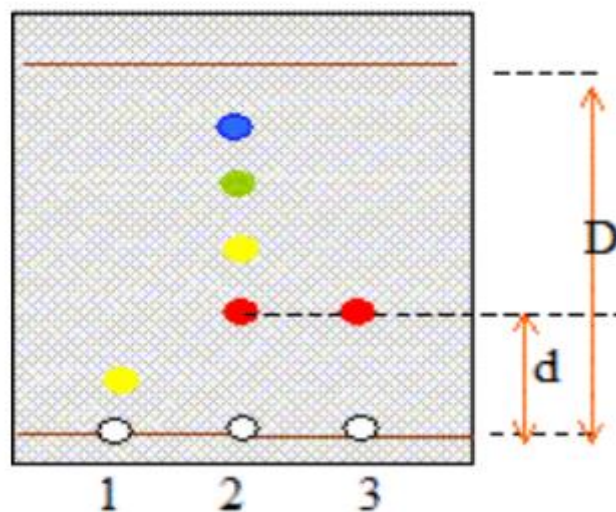


Figure VI.6 : plaque CCM et analyse des résultats

VI.3.1.2. La chromatographie de Partage (qualitative)

C'est une chromatographie liquide-liquide (CPL). La phase **stationnaire** est un liquide (**non miscible** avec la phase mobile, c'est-à-dire la ϕ_s ne se mélange pas avec la ϕ_m) fixé sur un support inerte (exp : silice ayant perdu ses capacités adsorbante par saturation des sites). La phase **mobile** est un **liquide** (ou un mélange de liquide) qui exerce une force **d'entraînement**. Cette technique est basée sur **le partage des solutés** dans les deux phases liquides. En fonction **de leur solubilité** dans l'un ou l'autre :

- Les **solutés solubles** dans la phase **stationnaire** migreront **lentement**,
- Les **solutés solubles** dans la phase **mobile** migreront **rapidement**.

Cette distribution du soluté dans les **deux phases non miscibles** (l'une **organique** (ϕ_{org}) et l'autre **aqueuse** (ϕ_{aq})) peut être décrites par un coefficient de partage K.

$$A_{\phi_{aq}} \Leftrightarrow A_{\phi_{org}}$$

A l'équilibre on aura le coefficient de partage :

$$K = \frac{[A_{\phi_{org}}]}{[A_{\phi_{aq}}]} \quad (VI.3)$$

La chromatographie de partage peut se faire en surface ou en colonne (**Figure VI.7 et VI.8**).

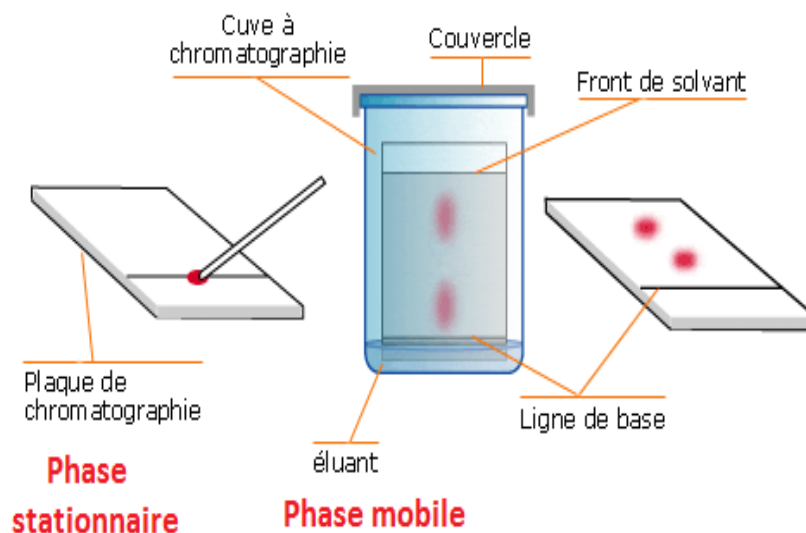


Figure VI.7 : schéma d'une chromatographie de surface

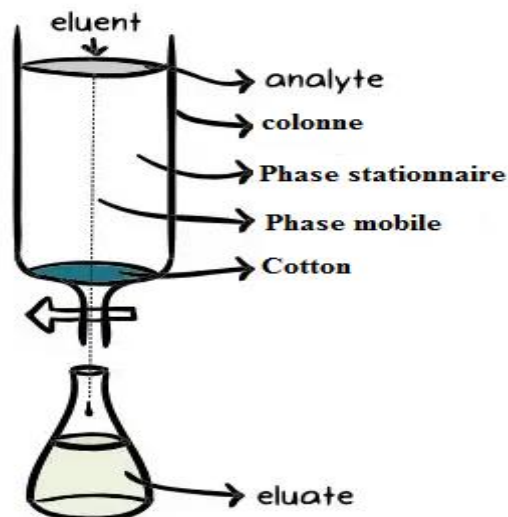


Figure VI.8: schéma d'une chromatographie sur colonne

a) Application de la chromatographie de partage

C'est une chromatographie liquide-liquide qualitative utilisée pour :

- Déterminer la phase mobile optimale en HPLC
- Analyse de composés très **polaires** (acides aminés et sucres) : dans ce cas ; la phase **stationnaire** est constituée d'eau adsorbée (**phase polaire**) sur la cellulose du papier et la phase **mobile** est un mélange de solvants organiques (**apolaire**) → chromatographie de partage en **phase normale**.

Si les composés à séparer sont très **hydrophobes** (acides gras), dans ce cas on utilise une phase **stationnaire apolaire** et une phase **mobile polaire** → chromatographie de partage en **phase inversée**.

b) Analyse des fractions

L'analyse des fractions peut se faire soit :

- Par analyse qualitative des fractions après révélation par une coloration spécifique.
- Par utilisation des témoins : c'est-à-dire comparaison de la migration des témoins à celle des spots de l'échantillon analysé.

VI.3.1.3. La chromatographie d'exclusion

Elle est encore appelée chromatographie d'exclusion moléculaire, **tamissage moléculaire**, **gel-filtration**, **perméabilité sur gel**. C'est une méthode qui permet la séparation des différentes macromolécules d'un mélange en se basant sur la **taille et la forme des macromolécules** et **non pas sur une interaction avec le support**.

- La phase mobile est un tampon d'élution.
- La phase stationnaire est un solide poreux (gel, le diamètre des pores est une caractéristique de chaque gel) qui comporte des pores dont le diamètre est comparable à celui des espèces à séparer, ce qui a pour effet de retarder plus ou moins la progression dans la colonne des différents analytes, suivant le volume hydrodynamique.

Les **grosses particules** sont **excluses** de **la phase fixe**, en revanche les **petites particules diffusent dans les pores** du gel.

Cette chromatographie se réalise en général **sur colonne**, mais aussi peut se faire sur **couche mince**. Dans le cas d'une colonne, **les résines utilisées** sont caractérisées par un **domaine de fractionnement spécifiques**, compris entre **deux limites** de masse moléculaires exprimées en Da.

- Limite supérieure d'exclusion : les molécules plus grosses sortent dans le volume mort ;
 - Limite inférieure : détermine la plus petite masse moléculaire séparable par la résine
- Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et sont donc éluées les premières, au niveau du volume mort (V_m ou V_0) (**Figure VI.9**).
- Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses dans le gel, leur migration est freinée.
- Une molécule totalement incluse sera éluée avec un volume d'élution $V_e = V_m + V_i$, où V_i est le volume d'eau interne aux granules de gel (voir figure en bas).
- Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires.

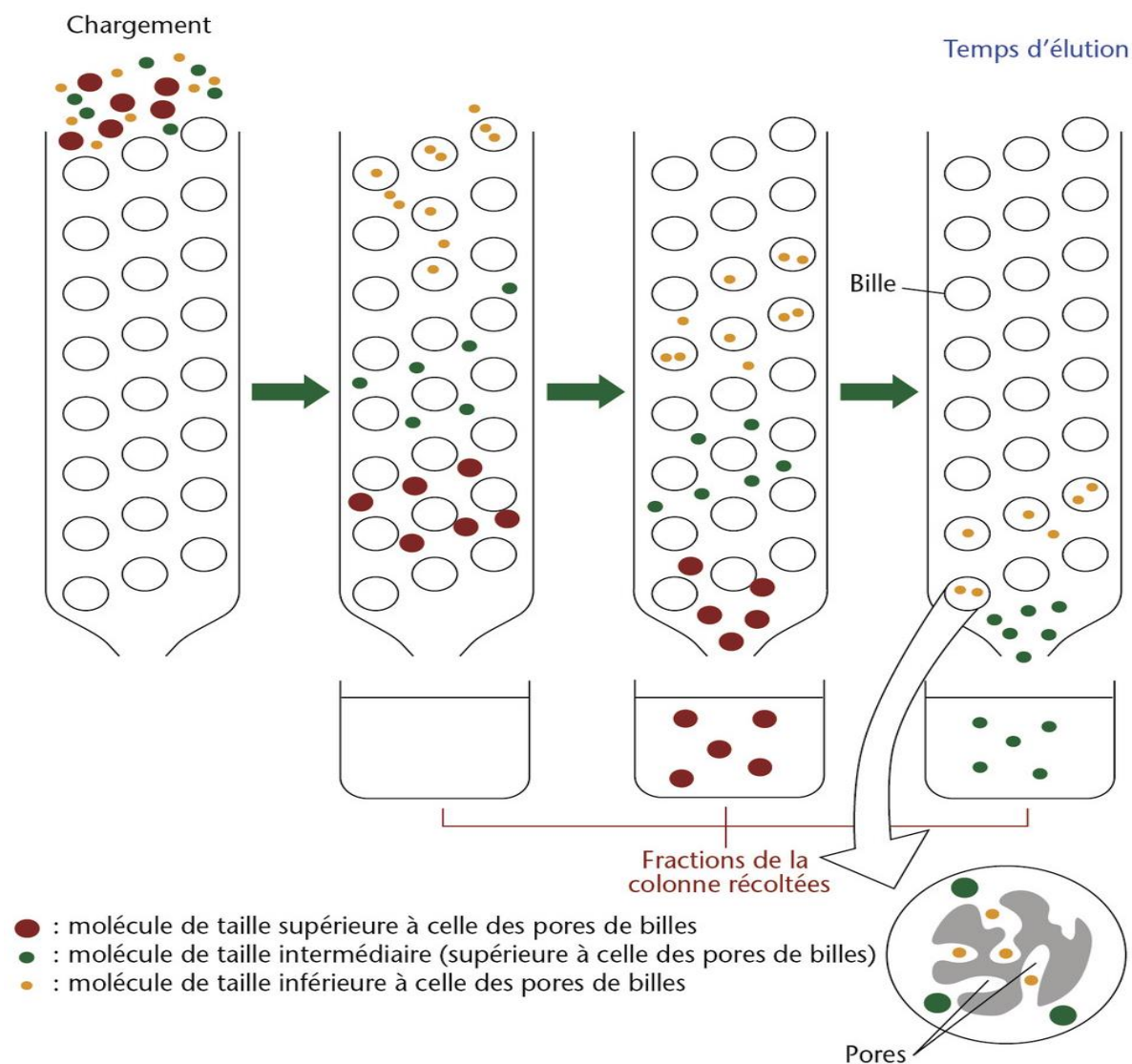


Figure VI.9: schéma simplifié du principe de chromatographie d'exclusion.

a) Exploitations

Cette chromatographie est une méthode à la fois **qualitative** et **quantitative**, car elle permet la **séparation**, la **purification** (fractionnement moléculaire) et le **dosage** des constituants du mélange : elle permet **d'évaluer la masse moléculaire** des constituants après les avoir détectés en sortie de colonne.

A cet effet il faut **étalonner la colonne**, avec un mélange de **constituants de masse moléculaires connues** (standards).

La relation entre le volume d'élué (V_e) et $\log(M)$ est linéaire.

Le volume total de la phase mobile dans la colonne est donné par la relation suivante :

$$V_T = V_0 + V_s \quad (\text{VI.4})$$

Avec :

$V_0 = V_m$: volume liquide extérieur aux granules (volume mort) (**Figure VI.10**)

V_s : volume de la phase stationnaire ;

V_i : volume du liquide dans les pores

V_G : volume du gel.

$$V_S = V_i + V_G \quad (VI.5)$$

Les volumes d'élution V_e sont donc compris entre V_i et V_0 . En écrivant :

$$K = \frac{V_e - V_0}{V_T - V_0} = \frac{V_e - V_0}{V_S} = \frac{V_e - V_0}{V_i} \quad (VI.6)$$

$$V_S = V_i + V_G = V_i \text{ car } V_G \ll V_i$$

Ainsi l'équation devient : $V_e = V_0 + K \cdot V_i$

Avec K : le coefficient de diffusion. Il représente le degré de pénétration d'une espèce dissoute dans le volume poreux.

Sa valeur est comprise entre 0 et 1 ($0 < K < 1$) et il est indépendant de la température.

- **$K=0$** pour les molécules dont le diamètre est supérieur à celui des plus larges pores ($V_e = V_0$). Elles sont exclues de la phase stationnaire et conduisent à un seul pic sur le chromatogramme à la position V_i appelé volume d'exclusion totale.
- **Si $0 < K < 1$** , le soluté est partiellement inclus.
- **$K=1$** pour les très petites molécules qui accèdent au volume de pénétration totale V_0 .

Donc $V_e = V_0 + V_i$, $K > 1$, le soluté est inclus et adsorbé

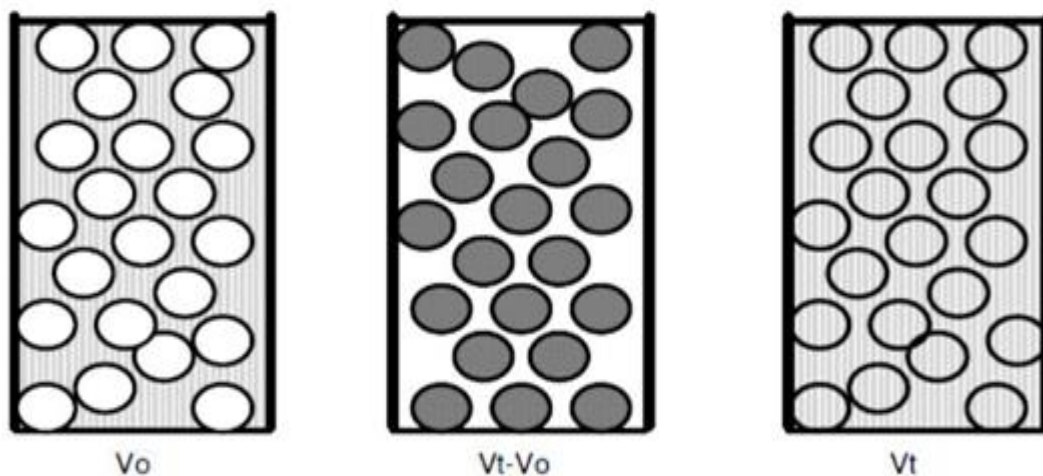


Figure VI.10 : présentation de V_0 et V_T .

Remarque : pour assurer une bonne résolution de séparation des différents constituants, il faut une colonne de filtration su gel longue est étroite, et un échantillon concentré.

VI.3.1.4. La chromatographie sur échangeurs d'ions

C'est une méthode de séparation des molécules selon **leur charge** et pour **les protéines** et les acides aminés c'est selon **leur pHi** (Figure VI.11).

- **La phase mobile** : est un tampon d'éluion de composition variable (**gradient de pH ou de NaCl**).
- **La phase stationnaire** est un support macromoléculaire **insoluble portant des charges positives ou négatives** ou des groupements ionisés fixé par des liaisons covalentes sur le support.

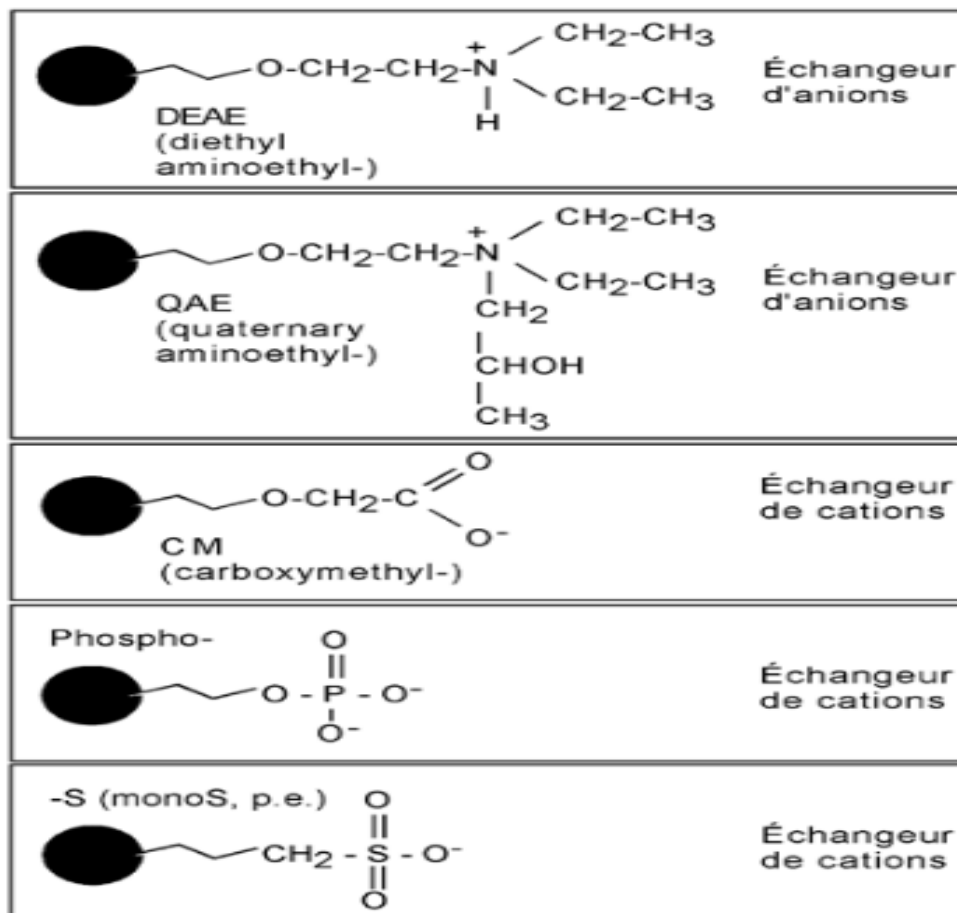
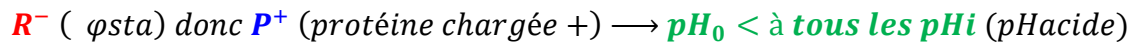


Figure VI.11 : Exemple d'échangeur de cations et d'anions

Cette chromatographie se fait en deux étapes (**Figure VI.12**) :

1^{ère} étape : la fixation du soluté

Fixation de toutes les protéines à séparer sur la phase stationnaire.



Cette étape permet de déterminer le pH du travail.

→ Après pénétration des protéines dans le gel, on verse goutte à goutte la phase **mobile (pH acide)**. Cette dernière va entraîner avec elle les protéines, mais comme c'elles-ci sont chargées positivement, **ces protéines seront retenues par la phase stationnaire** chargée négativement.

2^{ème} étape : élution progressive par solution de pH croissant

Le passage du tampon de **pH croissant** provoque le changement du pH.

Quand **pH=pH_i** (point isoélectrique) d'une protéine (le plus faible), il se forme alors une forme **dipolaire (P+/-) (neutre)**. ces protéines **ne sont plus retenues par les groupements chargés (-)** de la résine car elle sont neutres → elles **sont entraînées par la phase mobile** et éluer dans le tube collecteur. Les autres protéines sont éluées de la même façon dans l'ordre croissant de pH_i.

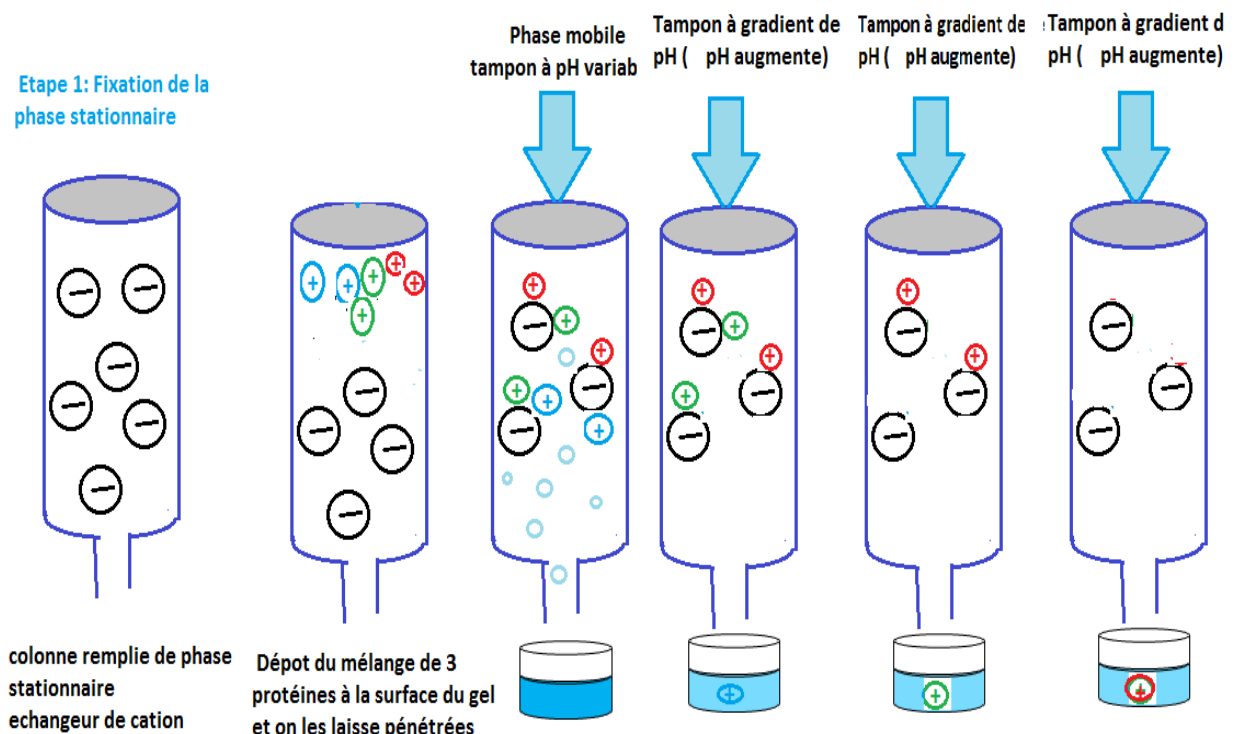


Figure VI.12: Schéma simplifié du principe de la chromatographie échangeuse d'ion.

Remarque :

Dans le cas des **acides nucléide**, la charge ne change pas avec le pH. Dans ce cas l'élution est obtenue par **addition de sels** tel que NaCl qui provoque la rupture de la liaison électrostatique entre la résine et l'acide nucléide par compétition des charges.

IV.3.1.5. La chromatographie d'affinité

La phase stationnaire est un **support macromoléculaire chimiquement inerte** (généralement de la **silice** ou du **gel agarose**), sur lequel est **greffé un effecteur** qui présente une **affinité biologique** (bio-affinité) **pour un soluté** (la cible) **de l'échantillon** à analyser (affinité enzyme-substrat, ligand-récepteur, antigène-anticorps) (**Figure VI.13**).

L'interaction spécifique (fixation) : Lorsque le mélange contenant la molécule cible est passé à travers la colonne de chromatographie, la **molécule cible** se lie **spécifiquement au ligand** en fonction de **l'affinité** de cette interaction.

Élution : Après que la cible ait été capturée par le ligand, les autres molécules (non spécifiques) sont éliminées par **lavage**. Ensuite, la molécule **cible** est **éludée** de la colonne en **modifiant** les conditions (**pH**, **salinité**, **concentration en ligand libre** ou compétitif) pour **affaiblir** ou **interrompre** l'interaction d'affinité et libérer la cible.



Figure VI.13: Schéma simplifié du principe de la chromatographie d'affinité.

Dans le **Tableau VI.2** sont résumés les différents types de chromatographies, leurs critères de séparation et également leurs applications.

Tableau VI.2 : Différents types de chromatographies et leurs applications.

Type de chromatographie	Critère de séparation	application
Adsorption	Polarité	Purification des protéines et d'enzymes, Lipides : stérols et stéroïdes, phospholipides,, pigments, médicaments, acides aminés. Analyse des mélanges complexes de composés organiques (par exemple, les hydrocarbures dans les produits pétroliers).
Partage	Solubilité	Séparation des protéines et des peptides. Caractérisation des biomolécules complexes, comme les glycoprotéines ou les protéines recombinantes. Séparation et quantification des composés lipophiles dans les huiles alimentaires. Analyse des sucres et des acides aminés. Purification des principes actifs dans les médicaments.
Exclusion	Taille des molécules	Purification et analyse des macromolécules (protéines, acide nucléide,...) Caractérisation des biopolymères : Elle est aussi utilisée pour analyser la distribution du poids moléculaire de polymères naturels ou synthétiques, ce qui est important dans le contrôle qualité de la production de polymères. Contrôle de la qualité (vérifier la pureté des produits finis, en éliminant les petites impuretés et autres contaminants.
Echangeuses d'ions	Charge ionique	Séparation des molécules ionisables quelques soit leur taille et forme (exp : protéine, acide aminé, glucides ionisés, lipides ionisés, ions minéraux, acide nucléide). Séparation et quantification des ions métalliques dans des solutions complexe

Affinité	Structure des protéines	Purification des protéines spécifiques, comme les enzymes, les anticorps, ou les récepteurs. Études des interactions moléculaires. Isoler des protéines spécifiques dans les produits alimentaires, comme les enzymes digestives ou les protéines d'intérêt nutritionnel.
-----------------	-------------------------	---

VI.3.2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie gazeuse (**Figure VI.14**) est une technique de séparation, de quantification et d'identification des composés d'un mélange d'identification. Cette méthode est appliquée essentiellement pour le contrôle des fractions légères des raffineries de pétrole ; et aussi pour les grandes molécules organiques telles que les acides gras contenus dans les huiles.

La phase mobile est un gaz vecteur doit être :

- **Pur**, ne contient ni oxygène (O_2 , ni eau (H_2O),
- **Inerte** vis-à-vis de la phase **stationnaire** et des **produits à analyser**.

Exemple : L'hélium (He), l'azote (N_2), l'argon (Ar) ou encore l'hydrogène (H_2).

La phase stationnaire peut être **solide** ou **liquide** (exemple : liquide à base de silicone, polyesters, des hydrocarbures ramifiés) (exemple : solide agissant par adsorption : gel de silice, l'alumine et le charbon actif, agissant comme des tamis moléculaires (les zéolites).

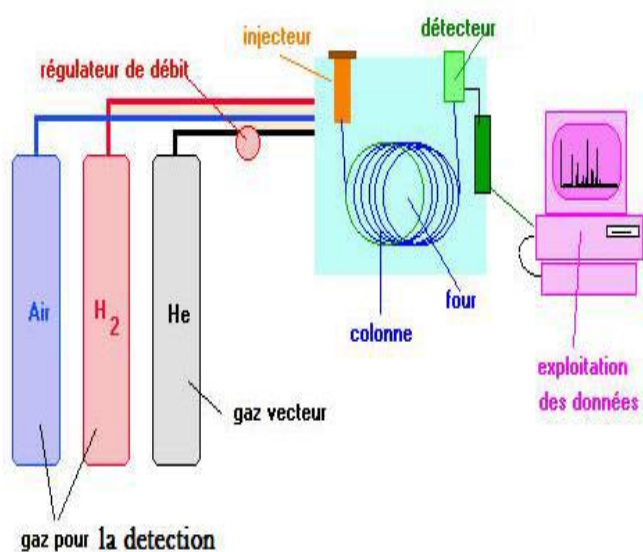


Figure VI.14 : chromatographie en phase gazeuse CPG.

VI.3.3. Chromatographie liquide à haute performance CPLH

HPLC signifie chromatographie liquide **haute pression** (généralement entre **50** et **400 bars**) (**Figure VI.15**). Cette haute pression permet de **faire circuler des solvants** à travers des colonnes très fines et d'assurer une séparation plus rapide et plus efficace. La haute pression permet aussi de **pousser les solvants** à travers des particules de phase stationnaire très petites (par exemple, de l'ordre de 3 à 5 microns), ce qui améliore la résolution des séparations.

Phase stationnaire : la phase stationnaire utilisée en HPLC est généralement constituée de **particules fines** (de 3 à 5 microns) de matériaux comme la **silice**, des **résines polymères** ou des **matériaux organiques**. La nature de la phase stationnaire détermine le type de séparation qui peut être réalisée (par exemple, phase inverse, échange ionique, etc.).

Phase mobile : La phase mobile est **un solvant** ou un **mélange de solvants**. En fonction de la technique de séparation (par exemple, phase inverse, échange d'ions, etc.), le solvant sera choisi en fonction de ses propriétés (**polarité**, **viscosité**, compatibilité avec la phase stationnaire). Les solvants courants incluent des mélanges d'eau et d'acétonitrile, de méthanol, ou d'autres solvants organiques.

L'HPLC est l'une des méthodes les plus employées dans les laboratoires d'analyse chimiques. Elle permet l'**identification**, la **séparation** et le **dosage** de composés chimiques dans un mélange. Sa grande **précision permet la recherche de traces** et il est possible de la coupler à un spectromètre de masse.

Le choix du solvant en HPLC doit être effectué en tenant compte de la **polarité des analytes** à séparer, de la **nature de la colonne chromatographique** (phase normale ou inverse), ainsi que des **conditions expérimentales** (viscosité, compatibilité avec les détecteurs, etc.)

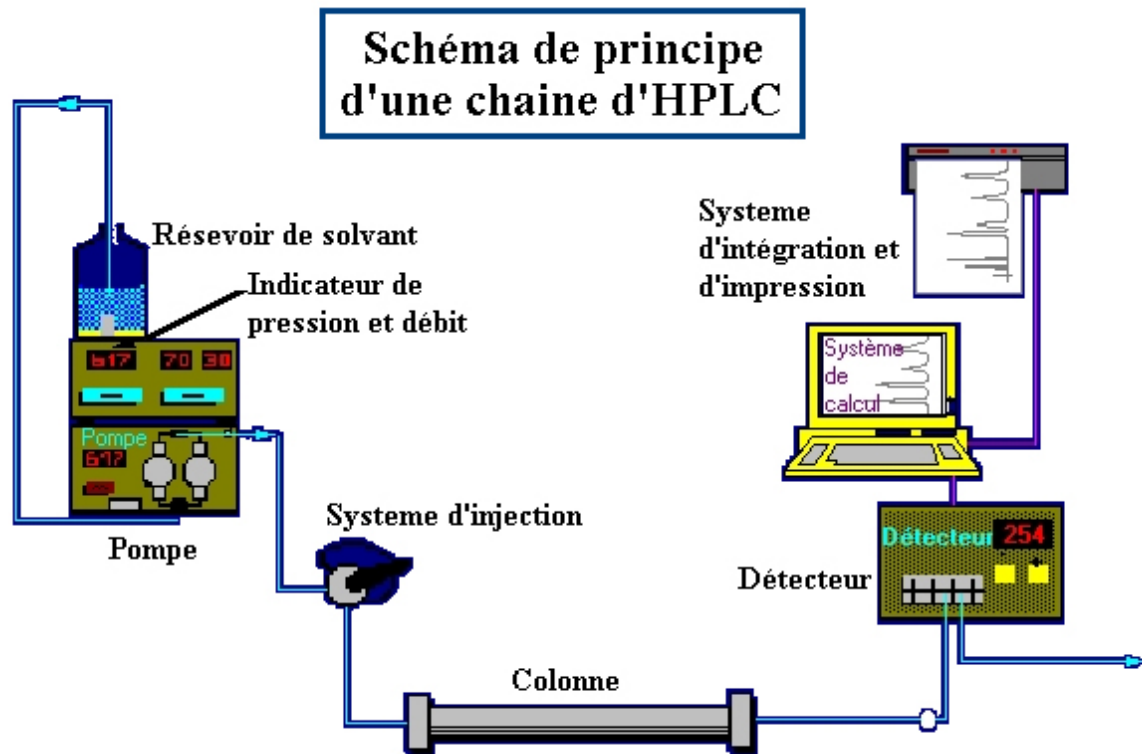


Figure VI.15: Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

II.3.4. Chromatographie en phase liquide à base pression

Contrairement à la chromatographie à haute pression (HPLC), la chromatographie à **basse pression** n'exige pas de **pompes haute pression**, ce qui **simplifie les équipements et réduit les coûts** (Figure VI.16). Elle est adaptée pour des **mélanges simples** ou des applications où une séparation de haute précision n'est pas absolument nécessaire. Elle est souvent utilisée pour purifier des échantillons chimiques ou biologiques dans des conditions douces.

Cette méthode est généralement limitée par **des résolutions moins élevées** comparées aux techniques à haute pression

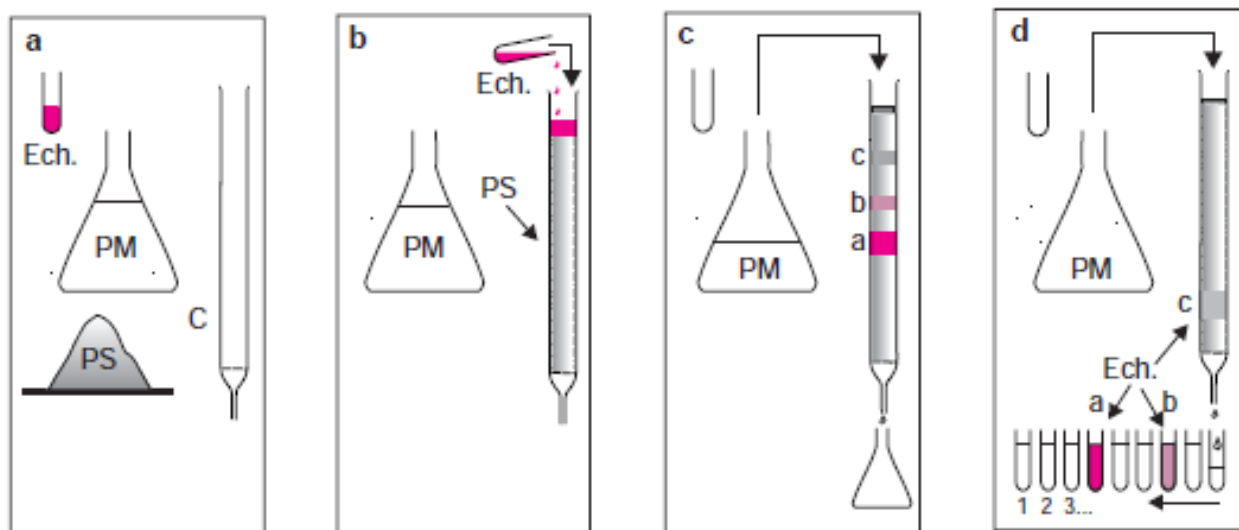


Figure VI.16: l'expérience de base en chromatographie. **a)** les produits nécessaires, **b)** le dépôt de l'échantillon, **c)** le début de l'élution, **d)** la récupération des produits après séparations.

Dans le tableau suivant sont résumés les avantages et les inconvénients des chromatographies liquide à basse et à haute pression.

Tableau VI.3: Avantages et inconvénients de HPLC et LPLC.

Chromatographie	Chromatographie L à basse pression	Chromatographie HPLC
Avantages	<p>Moins coûteuse et plus simple à mettre en œuvre par rapport à l'HPLC.</p> <p>Convient pour des volumes d'échantillons plus importants ou pour des applications de purification à grande échelle.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Système plus accessible dans les laboratoires ayant des ressources limitées ou pour des applications moins exigeantes en termes de précision et de rapidité 	<p>Haute résolution : Permet des séparations très fines et détaillées, même pour des composés ayant des structures très similaires.</p> <p>Rapidité : Les analyses peuvent être réalisées en quelques minutes à quelques heures, en fonction de la complexité de la séparation.</p> <p>Flexibilité : Peut être utilisée avec une variété de colonnes et de solvants pour différents types de séparation</p>

		(molécules polaires, apolaires, etc.). Quantification précise : En plus de la séparation, elle permet de quantifier les composants séparés.
Inconvénients	Moins efficace que l'HPLC pour des séparations très fines ou très rapides. Pression de séparation plus faible , ce qui peut limiter la capacité de séparation pour des mélanges complexes ou de petites tailles de particules. Peut nécessiter des colonnes plus grandes et des temps de séparation plus longs par rapport à l'HPLC.	Coût élevé : L'équipement nécessaire à l'HPLC peut être coûteux, tout comme les réactifs et les solvants de haute qualité. Maintenance complexe : Les instruments HPLC requièrent une maintenance régulière et une expertise pour leur optimisation. Consommation de solvants : L'HPLC utilise une quantité significative de solvants, ce qui peut poser des problèmes environnementaux ou économiques.

VI.4. Matériel

Un chromatographe se compose de plusieurs parties.

VI.4.1. Une colonne

C'est l'élément principale, dans laquelle s'effectue la séparation des différents composés. Une colonne est un tube en acier inoxydable, en verre ou en silice fondue, d'une longueur et d'un diamètre variables (**Figure VI.17**).



Figure VI.17 : colonne à chromatographie

VI.4.2. Un détecteur

Il est installé à la sortie de la colonne. Le choix du détecteur (ou des détecteurs) dépend des molécules à repérer, des contraintes de la séparation, et de la technique utilisée (CPL, CPG, HPLC). Dans tous les cas, il doit :

- Présenter une bonne sensibilité et une bonne reproductibilité ;
- Donner une réponse linéaire sur une gamme assez large de concentrations
- Permettre de détecter correctement les différents solutés (réponse sélective) ;
- Conserver l'intégrité de l'échantillon ;
- Fonctionner dans différentes conditions d'utilisation (la température notamment).

Dans le but d'analyser les fractions séparées, d'autres techniques ou appareillage particulier sont utilisés. On distingue :

- **Méthodes directes** : spectrophotomètre UV/visible, réfractométrie, Fluorométrie, spectrométrie de masse, conductimétrie, mesures électrochimiques...
- **Méthodes indirectes** : colorations spécifiques, ionisation, oxydation.

VI.5. Exploitation et analyse

VI.5.1. Chromatogramme et grandeurs caractéristiques

Le **chromatogramme** (Figure VI.18) est une courbe qui traduit la variation au cours du temps (ou du volume d'élution) d'un paramètre relié à la concentration ou de la quantité du soluté en sortie de colonne. Pour le choix d'une colonne, il faut connaître les paramètres qui vont influencer la séparation chromatographique.

- **L'origine du temps** (en abscisse) coïncide avec *l'introduction de l'échantillon* dans le système d'injection.

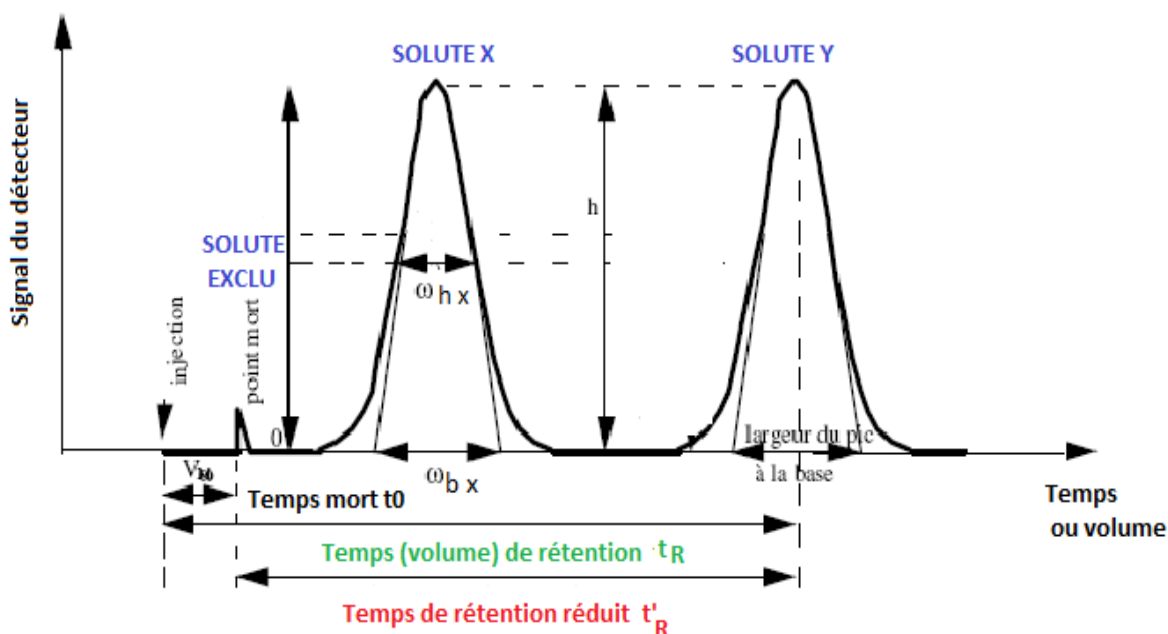


Figure VI.18 : Chromatogramme et grandeurs caractéristiques.

- La réponse (l'intensité du signal) du détecteur est représentée en ordonnée.
- La *ligne de base* correspond à la réponse du détecteur *en dehors de tout passage* de soluté.

Les pics obtenus représentent les molécules détectées en fonctions du **temps de rétention t_r** , ou du **volume d'éluion V_R** . Les valeurs de ces deux paramètres sont déterminées au sommet du pic.

VI.5.2. Paramètres de séparation

- Pour le choix d'une colonne, il faut connaître les paramètres qui influencent la séparation chromatographique
- Ces paramètres sont réunis entre eux par des relations qui permettent de sélectionner les conditions idéales pour une séparation performante
- Une bonne séparation se traduira par une séparation distincte des pics correspondant à chacun des produits.

a) **Temps mort t_0 (t_m)**: le temps mort t_m est le **temps mis** par un **composé non retenu** par la phase stationnaire de la colonne, pour parcourir le **trajet** entre l'entrée et la sortie de la **colonne** (ou temps mis par la phase mobile pour traverser la colonne). Ce temps peut correspondre au temps de sortie de :

- **CEM** : des grosses molécules exclues par le gel (bleu dextran)
- **CEI** : des composés non chargés ou de même charge que ϕ_s .
- **Adsorption** : composé de nature totalement opposé à la ϕ_s
- **CPG** : temps de sortie du gaz vecteur (pic de l'air)

$$t_0(s) = \frac{L(cm)}{u(cm.s^{-1})} \quad (VI.7)$$

Avec :

u : la vitesse linéaire de progression de la phase mobile ($cm.s^{-1}$)

L : longueur de la colonne.

b) **Temps brut de rétention t_R** : temps écoulé entre l'instant de l'introduction du composé dans la colonne et le moment où la substance sort à sa concentration instantanée maximale. Le temps de rétention est **caractéristique d'une espèce** pour des conditions d'analyse donnée et peuvent servir à l'analyse qualitative. La surface et la hauteur d'un pic est fonction de la quantité du constituant. Le temps de rétention est indépendant de la quantité d'échantillon injectée. Il est **fonction de la nature et la vitesse de la phase mobile**. Sur le chromatogramme, il correspond au **maximum du pic qui lui est lié**.

Temps de rétention réduit : le temps réellement mis par un composé pour parcourir une colonne (c'est le **temps passé par le soluté dans la phase stationnaire**). Il tient compte du temps mort et du temps de rétention.

$$t'_R = t_R - t_0 \quad (VI.8)$$

d) **Volume mort (V_0)** : volume de la phase mobile dans la colonne. Il est déterminé à partir du chromatogramme à condition que le soluté ne soit pas retenu par la phase stationnaire.

$$V_0 = t_0 \cdot D \quad (VI.9)$$

(D : débit de la phase mobile $mL.s^{-1}$)

V_T : volume total de la colonne qui est donnée par :

$$V_T = V_S + V_0 \quad (VI.10)$$

(Avec V_S volume de la phase stationnaire) ;

e) **Volume de rétention** : c'est le volume de la phase mobile nécessaire pour une séparation d'une concentration maximale de soluté.

$$V_R = t_R \cdot D :$$

$$D = u \cdot s \quad (VI.11)$$

U : vitesse linéaire de progression de la phase mobile

D : débit de la phase mobile

s : section de la colonne ($s = \frac{\pi \cdot d_c^2}{4}$)

$$f) \text{ **Volume d'éluion réduit (V'_R)** : } V'_R = V_R - V_0 \quad (VI.12)$$

A partir de ces valeurs, on peut déterminer différents paramètres caractérisant la séparation du soluté et la performance de la colonne.

g) **Facteur de capacité ou facteur de rétention** :

K ou K' : est un facteur sans dimension s'assimile au coefficient de partage. Ce coefficient est **indépendant du débit et de la longueur de la colonne**. Ce facteur de capacité K' est donné en fonction du temps de rétention suivant cette relation

$$K' = \frac{t_r - t_m}{t_m} = \frac{t'_r}{t_m} \quad (VI.13)$$

VI.6. Paramètres de performance des colonnes

VI.6.1. La sélectivité

Le facteur de sélectivité **mesure l'aptitude de la colonne utilisée à séparer les composés injectés** (deux composés dont les pics sont adjacents). Ce facteur permet de caractériser **la distance séparant les sommets** (représente ΔZ sur le chromatogramme) de deux pic consécutif (**Figure VI.19**)(X et Y ; Y sortant après X) en générale **$1,05 < \alpha < 2$** .

$$\alpha = \frac{t_{RY} - t_0}{t_{RX} - t_0} = \frac{t'_{RY}}{t'_{RX}} = \frac{K'_Y}{K'_X} \quad (VI.14)$$

Avec :

K'_Y et K'_X sont les facteurs de capacité des solutés Y et X.

La séparation est bonne pour **$\alpha > 1,5$** (α toujours > 1).

Si $\alpha = 1$, cela signifie que les pics sont trop proches.

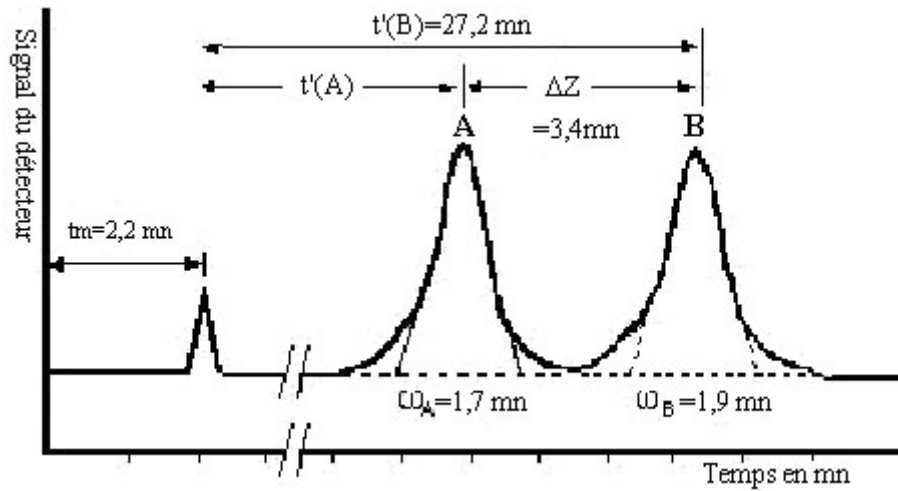


Figure VI.19 : le facteur de sélectivité

VI.6.2. Efficacité d'une colonne

a) Notion de plateaux théoriques

Une colonne est constituée de **N plateaux théoriques** empilés (divisée en N disques cylindriques successifs) (Figure VI.20): plus petit volume de colonne dans lequel le soluté est en équilibre de répartition entre phase mobile et phase fixe. La phase mobile progresse par sauts successifs d'un plateau à un autre.

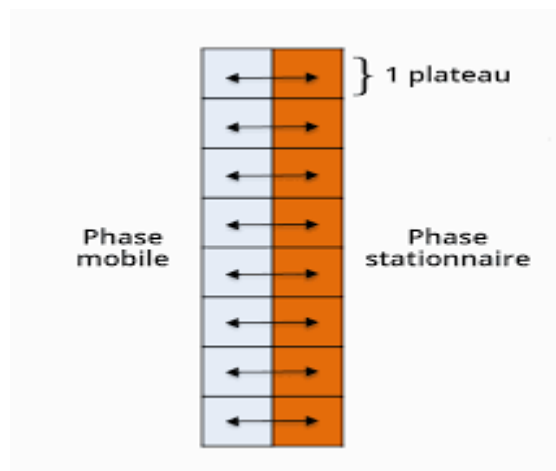


Figure VI.20 : Plateaux théoriques

Pour évaluer le nombre de plateau théorique on utilise les relations ci-dessous :

- Si ω_b est donné; la largeur du pic à la base en unité de temps.

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_r}{\omega_b} \right)^2 \quad (\text{VI.15})$$

- Si ω_H ou δ , sont donnés la largeur du pic à mi-hauteur en unité de temps.

$$N = 5,545 \cdot \left(\frac{t_r}{\omega_H} \right)^2 \quad (\text{VI.16})$$

Plus le nombre de plateaux théoriques est élevé, plus la colonne est efficace. Cette notion est vérifiée lorsque les deux colonnes sont de mêmes longueur.

b) Hauteur équivalente d'un plateau théorique

Pour pouvoir comparer entre des colonnes de différentes longueurs, on définit la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT), de la manière suivante :

$$H = \frac{L}{N} \quad (\text{VI.17})$$

Avec: L est la longueur de la colonne. Une colonne efficace présente souvent une HEPT de quelques microns (colonnes capillaires en CPG).

Plus les plateaux théoriques sont étroits plus la colonne est efficace.

Remarque :

L'efficacité de la colonne N exprime la finesse des pics des composés sortant de la colonne. Plus il y a de plateaux, plus les solutés ont l'opportunité de s'arrêter sur la phase stationnaire et donc plus N est grand, meilleure est la séparation.

VI.6.3. Coefficient de résolution entre deux pics

Il mesure la qualité de séparation de deux pics sans recouvrement. Plus les pics sont fins plus la séparation est meilleure (Figure VI.21).

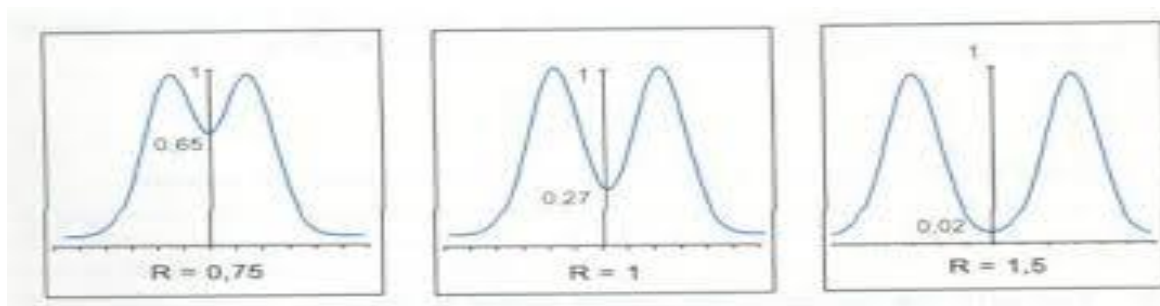


Figure VI.21 : Coefficient de résolution.

Le coefficient de résolution est donné par l'expression suivante :

$$R = \frac{2(t_{RY} - t_{RX})}{\omega_{bX} + \omega_{bY}} \quad (\text{VI.18})$$

Cette relation très utile pour mesurer le degré de séparation mais ne relie pas les paramètres fondamentaux de la chromatographie. Cette relation ne s'applique pas dans le cas de deux pics X et Y très proches ($t_{r(X)} \approx t_{r(Y)}$ et $\omega_X \approx \omega_Y$).

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left(\frac{K'_Y}{1 + K'_Y} \right) \cdot \left(1 - \frac{1}{\alpha} \right) \quad (\text{VI.19})$$

Si $R < 1$: mauvaise résolution (séparation incomplète) (**Figure VI.22**).

Si $1 < R < 1,4$: résolution acceptable

Si $1,4 < R < 1,6$ résolution optimale ($R = 1,5$, séparation parfaite)

Si $R > 1,6$: temps d'analyse trop allongé (donc n'est pas intéressant)

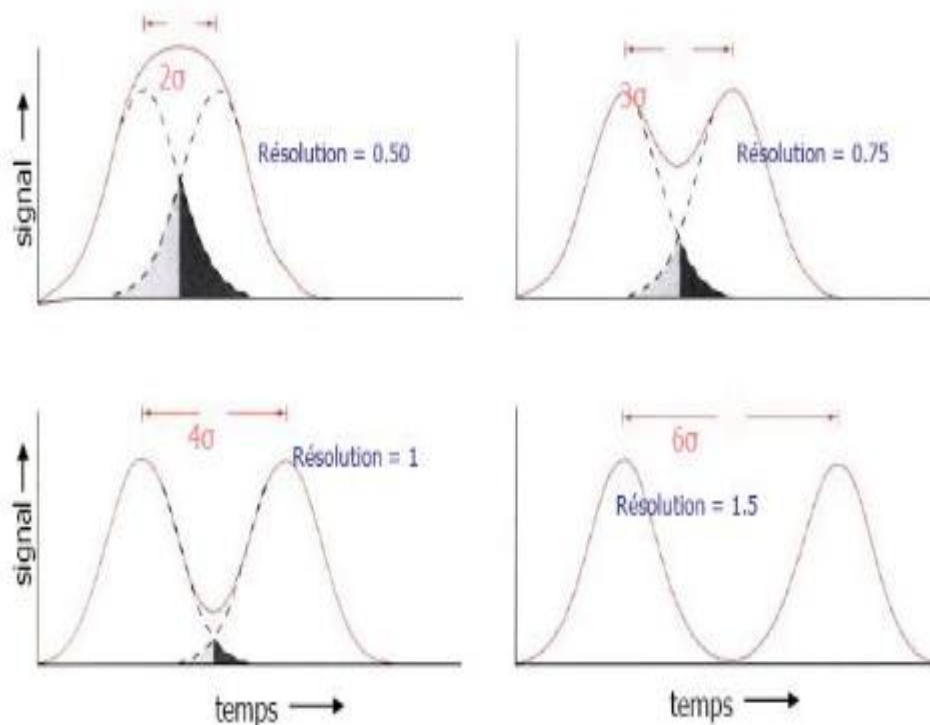


Figure VI.23: Coefficients de résolution entre deux pics.

Le **Tableau VI.4** récapitule de toutes les grandeurs caractéristiques d'une chromatographie.

Tableau VI.4 : les grandeurs caractéristiques d'une chromatographie

Temps mort t_0 ou t_m	Déterminé à partir du chromatographe	C'est le temps mis par un composé non retenu
Temps de rétention t_r	Déterminé à partir du chromatographe	Temps mis par un composé pour sortir de la colonne
Temps de rétention réduit t'_R	$t'_R = t_R - t_0$	C'est le temps réel mis par un produit X pour parcourir une colonne
Facteur de séparation K	$K' = \frac{t_r - t_m}{t_m} = \frac{t'_r}{t_m} \quad 2 < K < 6$	Il s'assimile au coefficient de partage
Le nombre de plateau N	$N = 16 \cdot \left(\frac{t_r}{\omega_b}\right)^2$ $N = 5,545 \cdot \left(\frac{t_r}{\omega_H}\right)^2$	Plus le nombre N augmente plus l'efficacité augmente
La hauteur équivalente d'un plateau théorique H	$H = \frac{L}{N}$	Plus H augmente, plus l'efficacité augmente
La sélectivité α	$\alpha = \frac{t_{RY} - t_0}{t_{RX} - t_0} = \frac{t'_{RY}}{t'_{RX}} = \frac{K'_Y}{K'_X}$	C'est la distance séparant les sommets de deux pics consécutifs ($\alpha = 1,5$; séparation parfaite)
La résolution R	$R = \frac{2(t_{RY} - t_{RX})}{\omega_{bX} + \omega_{bY}}$ $R = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left(\frac{K'_Y}{1 + K'_Y}\right) \cdot \left(1 - \frac{1}{\alpha}\right)$	Caractérise la distance séparant les bases de deux pics consécutifs $1,4 < R < 1,6$ (optimale)

VI.7. Exercices d'application

Exercice N°1 :

On détermine les temps de rétention au cours d'une chromatographie sur sephadex (résine), des protéines suivantes dont on connaît la masse moléculaire (PM), le débit de la colonne est de 5 ml/min :

Protéines	PM (Da)	t_r (min)
Aldolase	145000	10,4
Lactate déshydrogénase	135000	11,4
Phosphate alcaline	80000	18,4
Ovalbumine	45000	26,2
lactoglobuline	37100	28,6

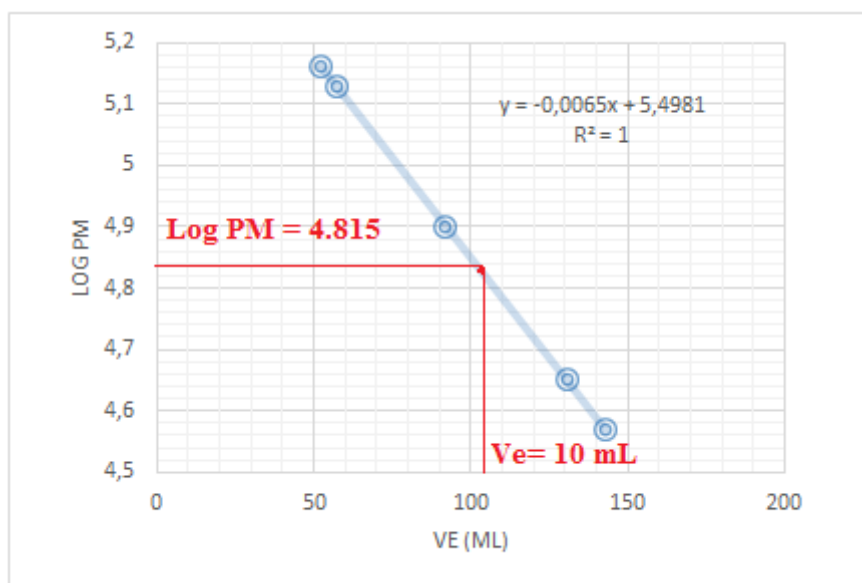
1. Calculer les volumes d'éluion (V_e) correspondant. Porter le log PM en fonction de V_e , que remarquez-vous ?? Pour la glucokinase, $t_r=21$ min. Déterminer sa masse moléculaire à l'aide du graphique précédent.

Solution :

1. Calcul du volume d'éluion V_e

On a : $t_r = V_e \cdot D$

Protéines	PM (Da)	t_r (min)	V_e	Log PM
Aldolase	145000	10,4	52	5,16
Lactate déshydrogénase	135000	11,4	57	5,13
Phosphate alcaline	80000	18,4	92	4,9
Ovalbumine	45000	26,2	131	4,65
lactoglobuline	37100	28,6	143	4,57



On remarque que le tracé de $\log PM$ en fonction V_e est une droite décroissance, cela signifie :

- Plus le poids de la molécule est grand, plus la molécule éluée rapidement, donc V_e est faible.
- Plus la molécule est petite, plus elle pénètre dans la résine et donc le volume d'éluion V_e est grand.

2. Calcul de la masse moléculaire de la glucokinase :

On a : $t_r = 21 \text{ min}$

$$V_e = 21 * 5 = 105 \text{ mL}$$

A partir du graphe, on détermine $\log PM$ correspondant à $V_e = 105 \text{ ML}$, on trouve

$\log PM = 0,815$ donc $PM = 65403,35 \text{ Da}$.

Exercice N°2 :

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 élué en amenant progressivement le pH à 7.

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

Solution :

La résine utilisée est un échangeur de cations (car elle porte des groupement sulfonate) donc elle retient les espèces chargées positivement.

Acides aminés	pH_i	$\text{pH} = 2$	$\text{pH} = 7$
l'acide L-glutamique	3,22	+	-
L-leucine	5,98	+	-
L-lysine	9,74	+	+

A $\text{pH} = 2$, tous les acides aminés sont chargés positivement, ils sont donc tous retenus par la résine.

Quand le pH augmente de 2 à 7, les acides aminés perdent progressivement leurs protons, ils deviennent neutres autour de leur pHi. Ils sont élués quand le pH atteint environ leur point isoélectrique (pHi)

L'acide aminé qui a le pHi le plus petit sera élué en premier. Donc l'ordre d'éluion est le suivant : L-glutamique → L-leucine → L-lysine.

Chapitre VII : La centrifugation

VII. 1. Définition

La centrifugation est un procédé de séparation des composés d'un mélange en fonction de leur différence de densité en les soumettant à une force centrifuge (**Figure VII.1**). Le mélange à séparer peut-être constituer soit de deux phases liquides (émulsion), soit de particules solides en suspension dans un fluide.

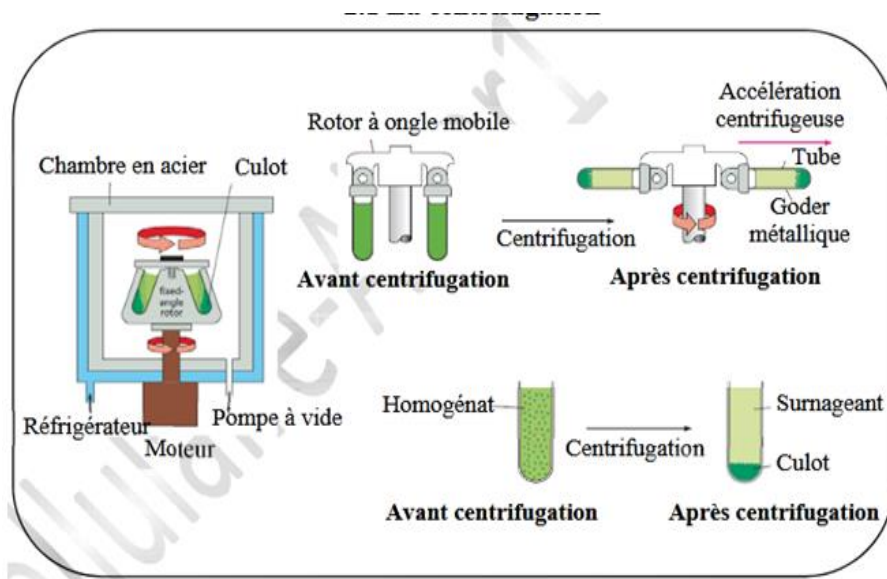


Figure VII.1 : La centrifugation

VII.2. Principe

➤ **Sédimentation** : une particule soumise à un champ gravitationnel (force gravitationnelle) tend à se déplacer dans ce champ jusqu'à ce qu'elle rencontre une résistance capable de l'arrêter complètement.

On considère une particule de masse m assimilée à une sphère de rayon r , dispersée dans un liquide de coefficient de viscosité η .

En négligeant un certain nombre de forces secondaires, trois forces s'appliquent à la particule (**Figure VII.2**) :

- **Le poids** : $P = m \cdot g$ (VII.1)

(m : masse de la particule)

- **La poussée d'Archimède** : $F_A = m \cdot g$ (VII.2)

(m : la masse du liquide déplacée).

$$m = \rho_{liq} \cdot V_p \quad (VII.3)$$

Avec :

ρ_{liq} : La masse volumique du liquide.

V_p : volume de la particule.

- **La force de frottement** f dont l'expression est donnée par la loi de Stokes :

$$f = 6\pi \cdot \eta \cdot r \cdot v_s \quad (VII.4)$$

Avec :

η : la viscosité du fluide (Pa.s ou le poiseuille (PI), avec 1Pa.s= 1PI. Il y a aussi la poise, 1poise = 0.1 Pa.s = 0.1PI)

v_s : vitesse de sédimentation de la particule (m/s)

r : rayon de la particule (cm).

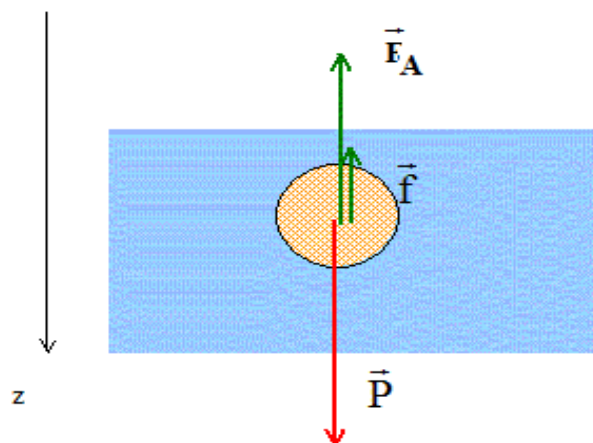


Figure VII.2 : les forces qui s'appliquent à la particule.

- **La centrifugation** est une **sédimentation accélérée** par la **force centrifuge** issue de la **rotation rapide** du tube. En remplaçant la **pesanteur** par la **force centrifuge**, on accélère les déplacements, ce qui aboutit à une séparation plus efficace des constituants d'un mélange en fonction de différents critères, essentiellement la masse (taille) et le volume, donc la masse volumique (et donc la densité) (**Figure VII.3**).

La particule soumise à trois forces, va se déplacer le long d'un rayon du rotor .

- **La force centrifuge:** $F_c = m \cdot a \quad (VII.5)$

m : masse de la particule

a : l'accélération ($m.s^{-2}$)

- **La poussée d'Archimède** (équation VII.3)
- **La force de frottement** f , dont l'expression est donnée par la loi de Stokes (équation VII.4).

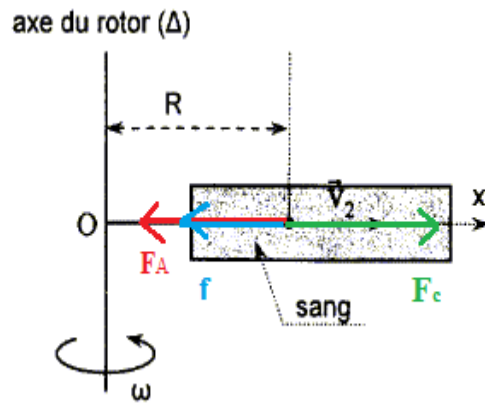


Figure VII.3 : Forces qui s'appliquent à la particule durant la centrifugation.

Remarque :

La centrifugeuse est constituée d'un rotor dont l'accélération a (en $m.s^{-2}$) est le plus souvent exprimée en nombre de g (g : accélération de pesanteur = $9.81 m.s^{-2}$), noté \dot{a} . Elle dépend de la vitesse angulaire ω (en $rad. s^{-1}$), ou plus souvent vitesse de rotation N (en rpm ou tours/min) et du rayon du rotor r (en m).

$$\dot{a} = \text{nombre de } g = \frac{a}{g} = \frac{\omega^2 \cdot r}{g} = N^2 \cdot r \cdot 1.118 \cdot 10^{-3} \quad (VII.6)$$

$$\left(\text{avec } \omega = 2\pi \cdot \frac{N}{60} \right) \text{ et } (r \text{ en } m)$$

VII.3. Vitesse de sédimentation

La vitesse de sédimentation V (en $m.s^{-1}$) d'une particule dépend des paramètres suivants :

- Accélération a (en $m.s^{-2}$) à laquelle elle est soumise et qui dépend du rotor donc force identique pour toutes les particules au cours d'une même centrifugation ;
- Propriétés de la particule dans le solvant utilisé, exprimées par le coefficient de sédimentation S (en S , svedberg, $1S=10^{-13}$ second), qui dépend de la masse et de la forme

de la particule, de la viscosité du solvant, et de la différence de densité entre la particule et le solvant. Cela assure donc que la vitesse résultante est différente pour chaque particule.

$$v_{\text{sédimentation}} = a \cdot s \quad (\text{avec } a = g \cdot \dot{\alpha}) \quad (\text{VII.7})$$

Donc , avec une meme vitesse de rotation ou une meme accélération, différentes particules se déplacent à des vitesses différentes puisqu'elles n'ont pas la meme masse et/ou forme et ou densité (pas le meme coefficient de sédimentation).

VII.4. Appareillage

L'appareil utilisé est une machine **tournante à grande vitesse** appelée **centrifugeuse** (Figure VII.4). Elle est composée de trois partie :

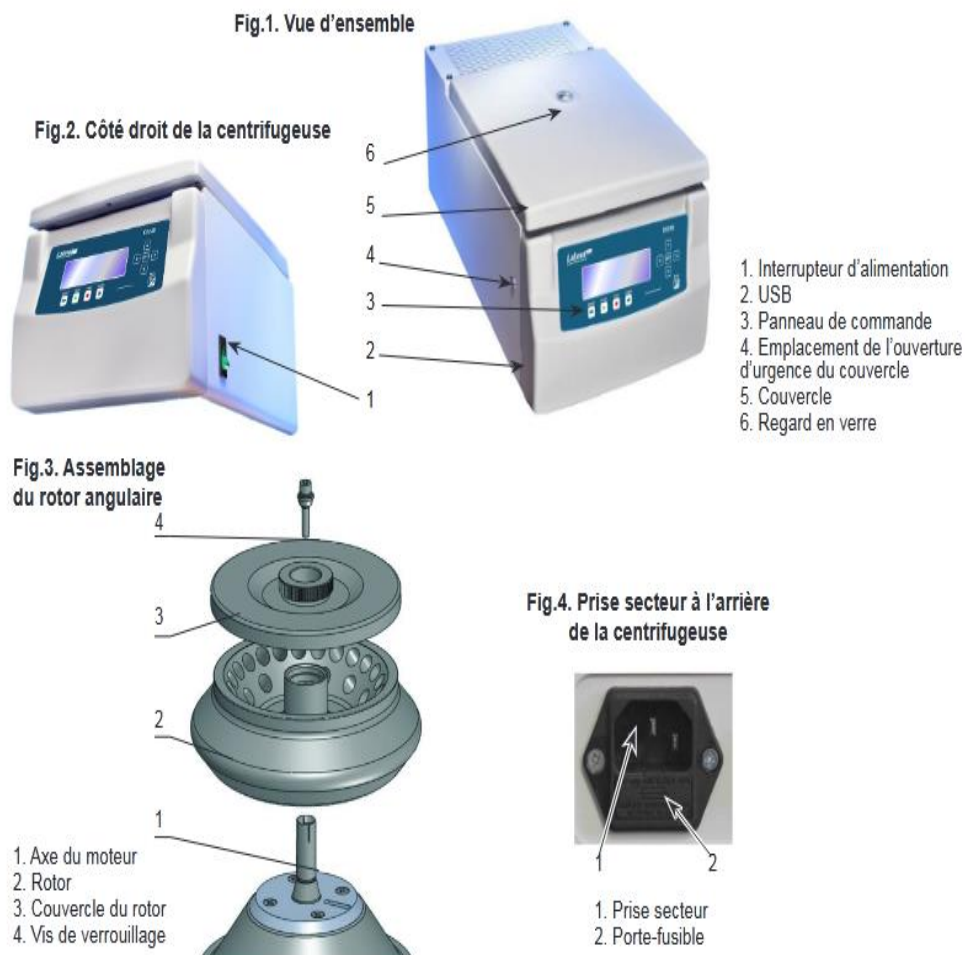


Figure VII.4: la centrifugeuse

VII.4.1. Un moteur

Capable de tourner à plusieurs dizaines de milliers de tours par minute.

VII.4.2. Une enceinte

Dans laquelle est disposé le rotor, qui est **réfrigéré** et elle est souvent soumise à **un vide** poussé pour éviter les frottements et l'échauffement des échantillons. En effet, pour les vitesses de rotation les plus rapides, le déplacement des extrémités du rotor (diamètre de l'ordre de 20- 40 cm) est supersonique. Ceci entraînerait un échauffement insupportable de l'air.

VII.4.3. Un rotor

Il doit être à la fois **solide pour supporter les forces** qui s'exercent sur lui et le plus **léger possible** (sa masse est soumise à l'accélération centrifuge) et également de taille réduite pour maximiser la vitesse de rotation. Les matériaux utilisés pour la fabrication des rotors sont le titane (excellent rapport poids/ résistance ; coût très élevé) et les alliages d'aluminium. Les rotors peuvent être classés en trois grandes catégories (**Figure VII.5**):

1. À godets oscillants
2. À angle fixe
3. Verticaux.

À noter que chaque type de rotor comporte ses forces et ses faiblesses selon le type de séparation désirée.

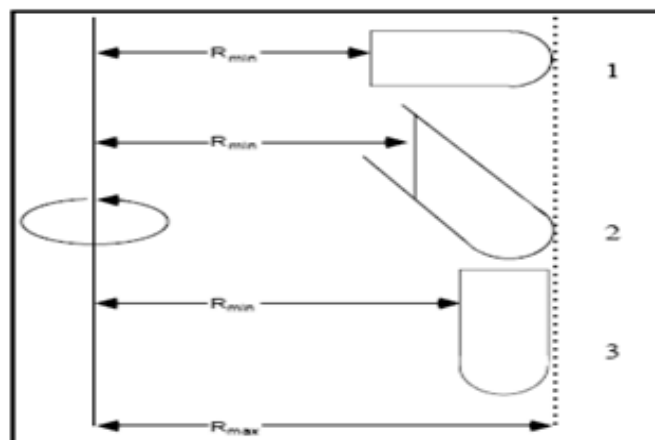


Figure VII.5 : type de rotor

1. **Rotors à angle fixe (centrifugeuse angulaire) (Figure VII.6) :** sont faits de bloc de métal (aluminium+ titane) appelé couronne contenant des puis creusés à l'intérieur (ou sont déposés les tubes à centrifuger) est inclinés avec un certain angle par rapport à l'horizontale (l'axe de rotation) (**de 45 °**). **Dans le cas de ce type de rotor, on parle de centrifugation oblique ou angulaire.** Les particules sédimentées s'accumulent sur les côtés du fond du tube à centrifuger. Lorsque le rotor se met à tourner, la solution dans les tubes change d'orientation. Ce type de rotor est principalement **utilisé dans les applications de sédimentation.** On y précipite des bactéries, des levures et autres cellules de mammifères. Il est également utile pour les séparations isopycniques de macromolécules comme les acides nucléiques.

A l'inverse de centrifugeuses horizontales, ce type de centrifugeuses présente un **bon aérodynamisme** permettant d'atteindre des **vitesse élevées**. De plus, les particules n'effectuent qu'un court parcours au sein d'un liquide, elles **migrent horizontalement**, atteignent **la paroi et glissent le long de celle-ci**. Ceci favorise la sédimentation

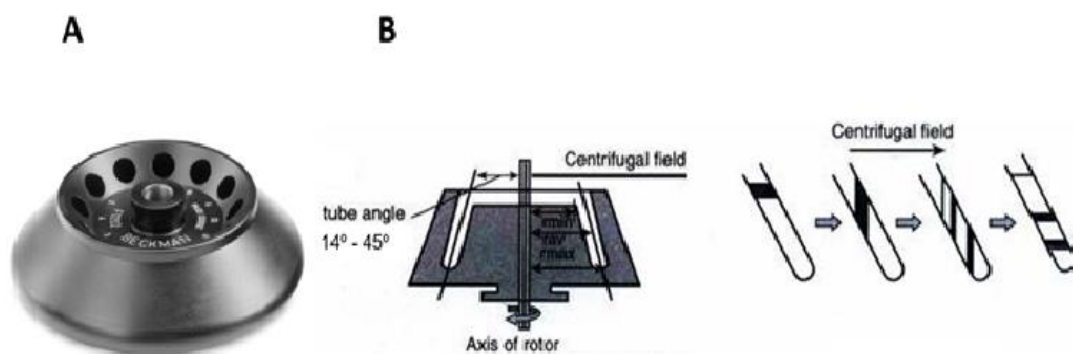


Figure VII.6 : Rotor à angle fixe

2. **Rotors à godets oscillants (mobiles) (centrifugeuse horizontale) (Figure VII.7) :** les tubes sont placés dans des godets qui sont **libres de prendre tous les angles possibles** entre la **verticale et l'horizontale**. Le rotor à godets pivotants permet au tube de changer d'angle pendant la course. Les godets sont **verticaux lorsqu'ils sont arrêtés** et **horizontaux lorsqu'ils fonctionnent** (d'où le nom de **centrifugeuse horizontale**). La géométrie parallèle des godets oscillants permet à l'échantillon de se **déplacer à travers les gradients de densité sans interruption**, contrairement à la géométrie à angle fixe où l'échantillon frappe et frotte le mur, ce qui peut compromettre la séparation. Ce rotor est particulièrement utile lorsque les échantillons **doivent être répartis en gradients de densité**. Le **trajet plus long**

permet une **séparation plus efficace** des particules dans un mélange. Cependant, ce type de rotor est **très peu efficace pour la sédimentation**.

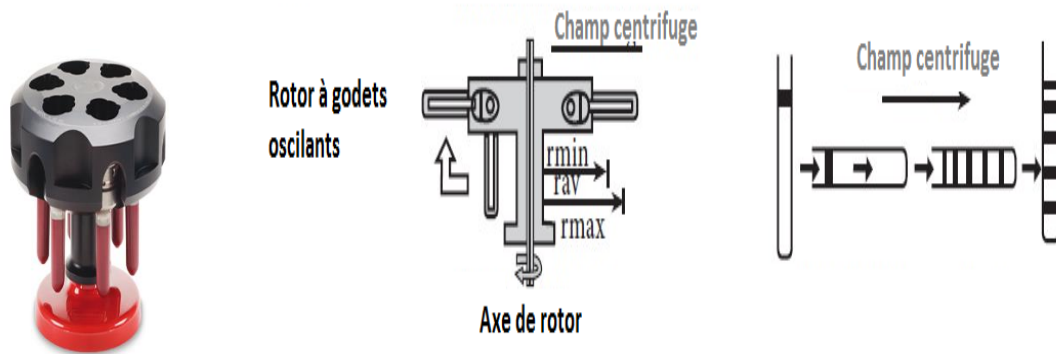


Figure VII.7: Rotors à godets oscillants.

3. **Les rotors verticaux (centrifugeuses verticales) (Figure VII.8) :** les tubes d'échantillons sont maintenus en position verticale pendant la rotation. Ce type de rotor **ne convient pas aux applications de sédimentation** mais s'avère **très efficace pour les séparations isopycniques (densité) en raison de son trajet court**. Les applications comprennent l'isolation d'ADN de plasmide, d'ARN et de lipoprotéines.

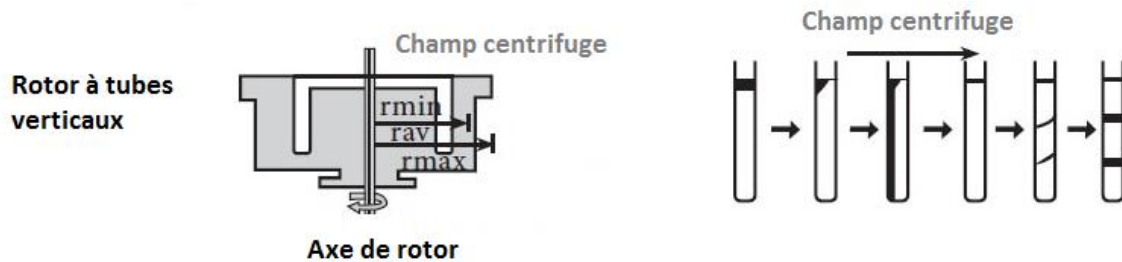


Figure VII.8 : Les rotors verticaux

VI.5. Types de centrifugation

VI.5.1. Centrifugation simple (unique)

Le mélange en solution est séparé (en **culot** et en **surageant**) en **une seule étape** à une vitesse de rotation et un temps donné (**Figure VII.9**). Elle est utilisée pour séparer :

- Les éléments figurés (cellules) et le liquide d'une suspension cellulaire (exp : sang, les éléments figurés du sang sont globules rouges, globules blancs et plaquettes)
- Des molécules solubles et insolubles.

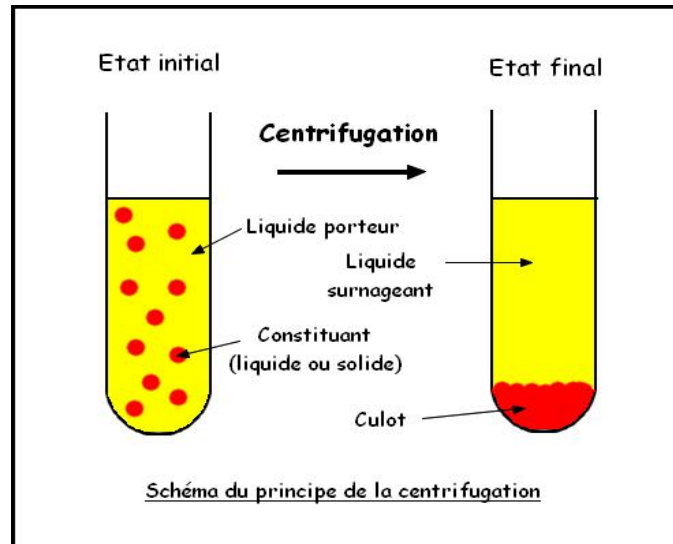


Figure VII.9 : Principe de la centrifugation.

VI.5.2. Centrifugation différentielle (en série)

Celle-ci est **une succession de centrifugations simples** (Figure VII.10), en augmentant la vitesse et le temps de rotation. A Chaque étape, on récupère le culot et on **centrifuge le surnageant** à **vitesse et temps plus élevée**. La centrifugation différentielle est une technique employée dans les **domaines de la biochimie et de la biologie cellulaire** et permettant de **séparer les organites et autres particules subcellulaires de la cellule** selon leurs vitesses de sédimentation. Le culot formé par chaque constituant donné peut ensuite être isolé et analysé au besoin.

La centrifugation différentielle ne donne que des préparations grossièrement purifiées : en effet, à chaque étape, le culot contient un ensemble de matériel de densités plus ou moins proches. Pour une purification plus poussée des macromolécules dont les densités sont proches, on utilise la centrifugation en gradient de densité.

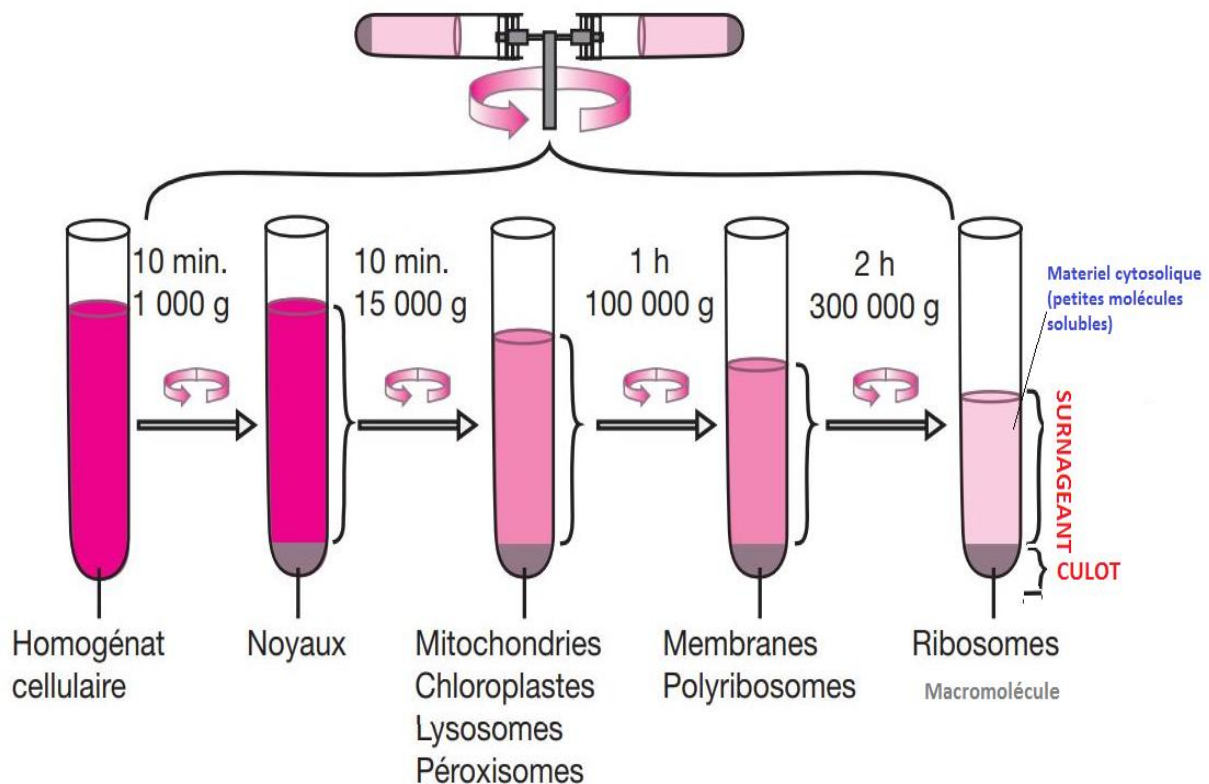


Figure VII.10 : Centrifugation différentielle.

VII.5.3. Centrifugation en gradient de densité

Ce type de centrifugation est basé sur l'utilisation d'un **solvant** dont **sa densité varie** en **fonction de sa position** dans le tube. Ceci va permettre aux différents constituants de l'échantillon de rejoindre la zone de densité équivalente à la sienne ; on parle alors de gradient. Dans ce cas, les espèces **ne seront plus séparées en deux fractions** (culot/surnageant), mais **étagées dans différentes zones de tube**. Dans ce type de centrifugation, il est préférable d'utiliser **des rotors à angle mobile** qui améliorent la séparation.

Remarque

Les solvants utilisés pour assurer ce gradient de densité sont des produits chimiques très solubles dans l'eau, et dont les variations de leur concentration conditionnent les variations de la densité de la solution qui les contient. Les plus utilisés sont : **le saccharose**, **chlorure de césium**, **Ficoll** (polymère hydrophile de glucose très soluble dans l'eau mais très visqueux), **percoll** (constitué de particules de silice colloïdale recouverts de polyvinyl pyrrolidone soluble et peu visqueux).

Le choix dépend **de la résolution attendue**, de ce que l'on **cherche à séparer**, de **la stabilité** et du **coût**. Il existe deux types de gradients :

A) Les gradients discontinus

Ils sont constitués **d'un empilement de solutions de moins en moins dense** (Figure VII.11). Les différents éléments s'accumulent aux interfaces entre les solutions de densité différentes. Au-dessus, leur densité étant plus élevée, ils migrent vers le bas, et au-dessous, leur densité étant plus faible, ils migrent vers le haut.

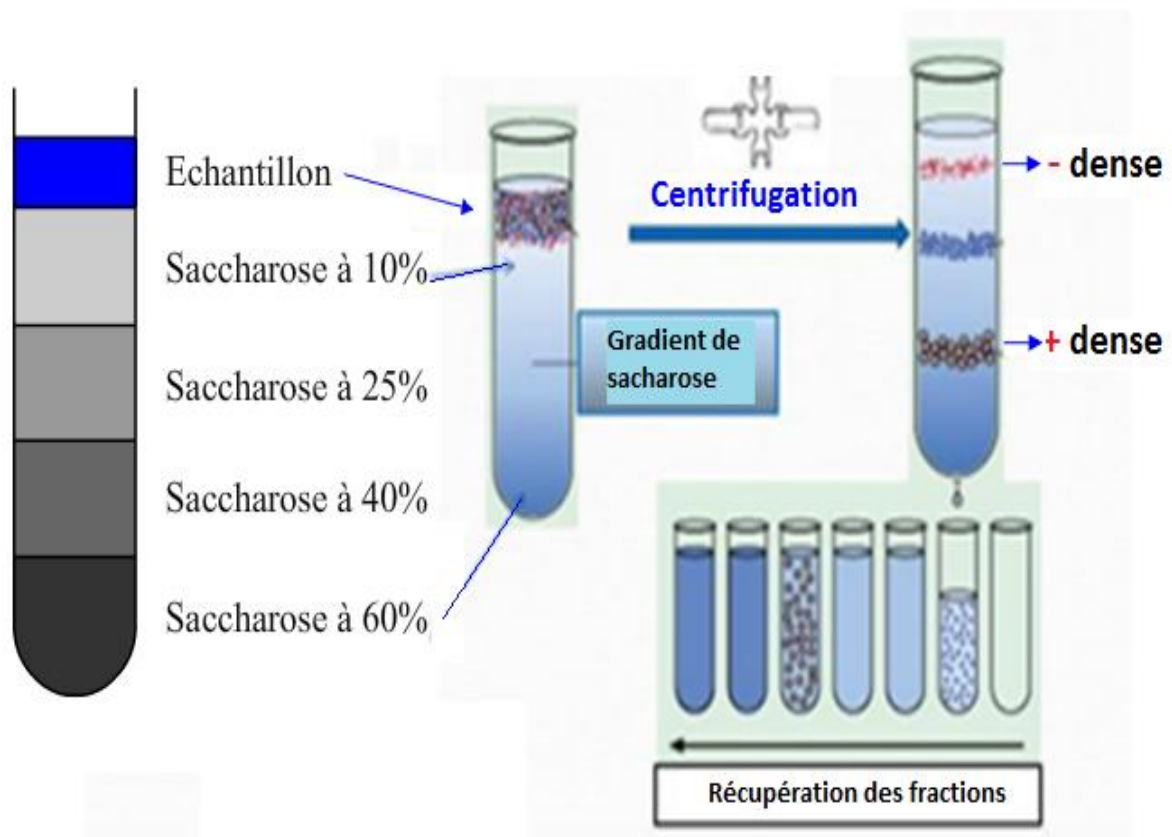


Figure VII.11 : Centrifugation à gradient discontinus

B) Les gradients continus

La variation des densités dans ce cas est continue. Les différents constituants vont alors migrer jusqu'à atteindre le point précis où leur densité est égale à celle du solvant formant des bandes (Figure VII.12).

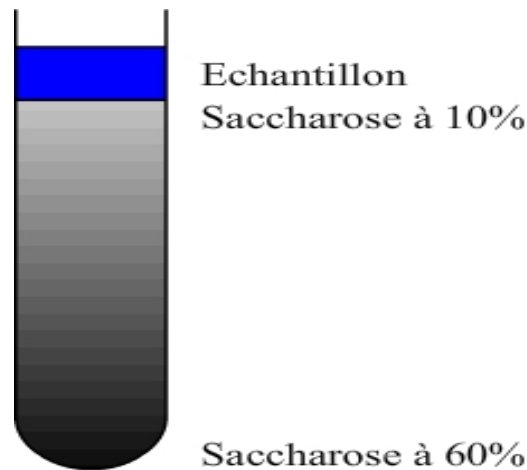


Figure VII.12 : Centrifugation à gradient continu

VII.6. Fractionnement

On perce le fond du tube et on récupère goutte à goutte son contenu dans différentes petites tubes : on obtient alors des fractions séparées contenant les différentes particules les plus lourdes ou les plus denses (celles qui étaient au fond du tube de centrifugation).

VII.7. Les précautions de base pour travailler avec une centrifugeuse

1. Fournir une surface de travail ferme et de niveau. Assurez-vous toujours que la centrifugeuse est posée sur une surface appropriée avant de commencer.
2. Stabilisez la centrifugeuse. L'utilisation d'une centrifugeuse déséquilibrée peut causer des dommages importants et peut blesser l'opérateur et les autres membres du personnel du laboratoire. La masse totale de chaque tube doit être aussi proche que possible. Cela devient de plus en plus important à des vitesses de rotor très élevées. Il est recommandé d'équilibrer les masses au 0,1 gramme près et il est important d'équilibrer les tubes par masse et non par volume. Par exemple, ne pas équilibrer un échantillon composé d'un volume égal d'eau et d'un liquide dont la densité est supérieure ou inférieure à celle de l'eau.
3. N'ouvrez pas le couvercle lorsque le rotor est en mouvement. De nombreuses centrifugeuses sont équipées d'un « arrêt de sécurité ». Cependant, cela ne fera qu'arrêter l'alimentation du rotor et celui-ci continuera à tourner en raison de sa propre inertie pendant un certain temps jusqu'à ce qu'il s'arrête en raison de la friction.

4. Si la centrifugeuse tremble, débranchez-la. Une petite vibration est normale, mais une quantité excessive peut être synonyme de danger. Tout d'abord, vérifiez que les tubes sont correctement équilibrés. Si cela ne résout pas le problème, ne faites pas fonctionner la centrifugeuse avant qu'elle n'ait été réparée par le fabricant ou le revendeur.

VII.8. Exercices d'application

Exercice N°1

Un rotor d'ultracentrifugeuse tourne à 40 000 tour/min.

- 1) Calculer l'accélération a (m/s^2) existant à 10 cm de l'axe de rotor.
- 2) A combien de fois la pesanteur ($g = 9,81 m/s^2$), cette accélération est-elle égale ??

Solution :

On a : $N = 40\,000$ tour/min, $r = 10$ cm.

$$a = \omega^2 \cdot r \quad \text{et} \quad \omega = \frac{2\pi N}{60} = \frac{2 * 3,14 * 40000}{60} = 4188,79 \text{ rad/s}$$

$$a = \omega^2 \cdot r = (4188,79)^2 * 0,1 = 1,754 * 10^6 \text{ m/s}^2$$

La valeur de l'accélération équivalent en g est : $1,754 * 10^5 g$. cette ultracentrifugation produit environ de 17540 fois la gravité terrestre, ce qui explique la séparation efficace.

Exercice N°2

Soumise à une accélération centrifuge de 10^7 cm/s^2 , une protéine en solution aqueuse sédimente à une vitesse constante de 0,36 mm/h.

1. Calculer la constante de sédimentation de cette protéine supposée sphérique par unité de Svedberg.

Solution :

1. Calcul de la constante de sédimentation :

$$\text{On a : } a = 10^7 \text{ cm/s}^2 = 10^5 \text{ m/s}^2$$

$$V = 0,36 \text{ mm/h} = 0,36 * 1V = 0,36 \frac{\text{mm}}{\text{h}} = \frac{0,36 * 10^{-3}}{3600} = 10^{-7} \text{ m/s}$$

On a aussi : $V = S * a \Rightarrow S = \frac{V}{a} = \frac{10^{-7}}{10^5} = 10^{-12} \text{ s (seconde)berg}$

On a $1\text{Sv} = 10^{-13} \text{ s}$ donc $S = \frac{10^{-12} * 1}{10^{-13}} = 10 \text{ s}$

Références Bibliographiques

- [1] Emile Biement, *Spectroscopie moléculaire*, Edition De Boeck Université, 2008.
- [2] Gwénolé Burgot, Jean-Louis Burgot, *Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications*, Editions Dunod.
- [3] Francis Rouessac, Annick Romessac avec la collaboration de Daniel Cruché, Claire Duverger- Arfuso et Arnaud Martel, *Analyse Chimique*, Editions Dunod 2016.
- [4] Simon Duckett, Bruce Gilbat, Martin Cockett, *Les fondements de la détermination des structures moléculaires*, Oxford University Press.
- [5] Gwenola Burgot, Jean-Louis Burgot, *Chimie analytique*, Editions Lavoisier 2017.
- [6] Aurélie Bourderieux, Mélanie Boujot, Sonia- Lordel-Madeleive, Ludivine Valois, *Chimie analytique*, Editions Dunod , 2020.
- [7] Smain Hocine, *Méthodes d'analyses spectroscopiques en chimie organique*, Office des publication Universitaire, 1^{re} Edition mars 2017.
- [8] Robert Rosset, Hanna Kolodziejczyk, *Chromatographie en phase liquide*, Masson, Paris 1995.
- [9] Erwan Beauvineau, Jeanne-Laure, Dormieux, Christophe Honnorat, Emilie Ramel, *Chimie : techniques expérimentales, travaux pratiques*, Vubert- avril 2019.
- [10] Georg chwedt, *Méthodes d'analyse*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1992.
- [11] F. Rouessac, A. Rouessac, *Analyse Chimique : méthodes et techniques instrumentale moderne*, Masson, Paris, 1995.
- [12] Alain Dodi, *Echanges d'ions, chromatographie ionique et mise en œuvre industrielle des résines*, Lavoisier, Paris, 2015.