



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement Supérieur et de
la Recherche scientifique

Université Echahid Hamma Lakhdar EL-Oued

Faculté de Technologie

Département de Génie des procédés et pétrochimie



Polycopie de cours

Module

Techniques d'analyse

Niveau

3ème Année Licence Génie des procédés

Présenté par

Dr. OUCIF KHALED Mohammed Tayeb

2022 - 2023

Table de contenu

PREFACE	4
I- Introduction aux techniques d'analyse	7
I.1. Méthodes de préparation et de prélèvement des échantillons	7
I.2. Principes généraux pour la préparation des échantillons	8
I.3. Principes généraux pour le prélèvement d'aliquotes	9
I.3.1. Prélèvement par pesée directe de l'aliquote.....	9
I.3.2. Prélèvement par pesée indirecte de l'aliquote :.....	9
I.3.3. Instruments de prélèvement:	10
I.4. Choix de la méthode d'analyse :	10
II. Méthodes chromatographique d'analyse	9
II.1. Introduction	9
II.1.1. Définition	9
II.1.2. Principe général de la chromatographie.....	9
II.1.3. Le Chromatogramme	10
II.1.4. Les diverses techniques chromatographiques	13
II.1.5. Phénomènes physiques exploités en chromatographie.....	14
II.1.6. Modes de chromatographie.....	15
II.2. La chromatographie sur couche mince (CCM).....	15
II.2.1. Définition et appareillage	15
II.2.2. Principe de la technique	16
II.2.3. Applications de la CCM	16
II.2.4. Adsorbants et plaques chromatographiques	16
II.2.5. Choix de l'éluant.....	17
II.2.6. Dépôt de l'échantillon	17
II.2.7. Développement de la plaque	17
II.2.8. Révélation	18
II.2.9. Calcul de R_f (retarding factor ou rapport frontal).....	18
II.2.10. Description d'une analyse par CCM selon l'ordre chronologique.....	18
II.3. Chromatographie liquide à haute performance CLHP (HPLC en anglais).....	19
II.3.1. Introduction	19
II.3.2. Principe	19
II.3.3. Appareillage et matériaux	19
II.4. La chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	22
II.4.1. 1. Introduction.....	22

II.4.2. Principe	23
II.4.3. Appareillage	24
Quel que soit le chromatographe à gaz, on retrouve toujours les principales composantes suivantes..	24
II. Introduction aux techniques spectrales d'analyse	30
II.1. Introduction	30
II.2. Rappels sur le domaine spectral :	30
II.3. Les différents processus d'interaction rayonnement-matière	32
II.3.1. L'absorption	32
II.3.2. L'émission	32
II.3.3. La diffusion.....	32
II.3.4. Les énergies d'une molécule	32
II.4. Principes de l'absorption	34
II.4.1. Classification :	34
II.5. Types des spectroscopies :	35
II.5.1. Spectroscopie UV-visible:.....	35
II.5.2. Spectroscopie infrarouge (IR):.....	35
II.5.3. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN):	35
II.6. Applications des techniques spectrales:.....	35
III. La Spectroscopie UV-Visible	38
III.1. Définition :	38
III.2. Principe :	38
III.3. Domaine spectral :	39
III.3.1. Propriétés des UV	39
III.3.2. Règle de sélection :	39
III.4. Les différents types de transition :	40
III.4.1. La transition $\sigma - \sigma^*$:	40
III.4.2. La transition $n - \sigma^*$:	40
III.4.3. La transition $\pi - \pi^*$:	40
III.4.4. La transition $n - \pi^*$:	40
III.5. Loi d'absorption de la lumière-Loi de Beer-Lambert :	41
III.5.1. Condition d'utilisation de la loi de Beer et Lambert:.....	42
III.5.2. Additivité de la loi de Beer-Lambert.....	42
III.6. Spectre d'absorption UV/Visible :	42
III.7. Appareillage :	43
III.7.1. Source :	44

III.7.2. Monochromateur :	44
III.7.3. Détecteur :	44
III.8. Intérêts de la spectroscopie UV-Visible :	46
III.9. Application de la spectroscopie UV/Visible	46
III.9.1. Analyse qualitative	46
III.9.2. Analyse quantitative	46
III.9.3. Analyse industrielle et pharmaceutique :	46
IV. La Spectroscopie Infra-Rouge (IR).....	51
IV.1. Introduction	51
IV.2. Principe de la spectroscopie infra-rouge.....	51
IV.2.1. Interaction rayonnement-matière	51
a. Description de la lumière.....	51
b. Niveaux d'énergie d'une molécule	52
c. Transition de niveaux énergétiques et absorption de rayonnement électromagnétique	53
IV.3. Etude des vibrations d'une molécule	54
IV.3.1. Molécule diatomique :	54
IV.3.2. Molécule poly atomique	54
Exemple : CO ₂	55
IV.4. Appareillage.....	56
IV.4. 1. Spectromètre dispersif.....	56
IV.4.2. Spectromètre infrarouge à transformée de Fourier.....	57
a. Mode de fonctionnement du spectromètre à transformée de Fourier	57
IV.5. Présentation de l'échantillon	58
IV.5.1. Cas des solides	58
IV.5.2. Cas des liquides	58
IV.5.3. Cas des gaz	58
IV.6. Analyse de spectres et bandes d'absorption classiques.....	58
IV.6.1. Allure d'un spectre d'absorption infrarouge.....	58
a. Axes	59
b. Zones d'absorption.....	59
IV.6.2. Bandes d'absorption classiques	60
a. La chaîne carbonée.....	60
Figure 10 : Spectre d'absorption IR du propan-1-ol.....	61
IV.6.3. Groupement caractéristique hydroxyle : fonction alcool	63
b. Groupement caractéristique carbonyle.....	64

c. Groupement caractéristique carboxyle	66
d. La double liaison C=C.....	67
Références bibliographiques.....	69

PREFACE

Cette polycopie couvre le module : « Techniques d'analyse », qui s'adresse principalement aux étudiants de troisième année licence Génie des procédés. Cette polycopie est le fruit de dix années d'enseignement de cette module. Cette polycopie a été présentée séquentiellement selon le programme approuvé, de manière claire et simplifiée et avec une méthodologie bien étudiée. Pour préparer cette polycopie, je me suis appuyé sur de nombreuses références reconnues et approuvées dans ce domaine.

Le domaine de la caractérisation des composés et des produits chimiques est très vaste et comprend de nombreuses méthodes et techniques d'analyse physiques, chimiques, électriques, thermiques... Cependant, dans cette polycopie, nous sommes limités aux méthodes chromatographiques et spectroscopiques d'analyse, conformément à ce qui était indiqué dans le programme approuvé pour ce module.

Dr. OUCIF KHALED Mohammed Tayeb

Chapitre I

Introduction aux techniques d'analyse

I- Introduction aux techniques d'analyse

L'analyse des produits et des composés dans les laboratoires est une activité essentielle à la caractérisation, la mesure de la pureté, la conformité de la qualité ou le suivi des réactions chimiques mises en œuvre en recherche et développement, en procédés ou en production. Le contrôle de qualité repose sur la mise en œuvre d'une combinaison de techniques analytiques qui permettront de vérifier la conformité d'un produit par rapport à des spécifications ou des exigences préétablies. C'est le cas pour tous les produits qui doivent être commercialisés (à titre d'exemple dans le domaine pharmaceutique, les matières actives destinées à devenir des médicaments devront atteindre un très haut niveau de pureté pour suivre leur chemin vers la formulation, cette pureté minimum étant définie dans le dossier d'homologation du produit).

I.1. Méthodes de préparation et de prélèvement des échantillons

La préparation de l'échantillon et le prélèvement de la portion servant à l'analyse sont les deux premières étapes d'une analyse physico-chimique. Ces étapes sont importantes pour la réussite d'une analyse, car l'exactitude du résultat en dépend. Les techniques qui seront utilisées lors de ces étapes devront permettre de respecter le principe suivant: L'aliquote prélevé pour l'analyse doit être le plus représentatif possible du lot

CHAÎNE DE PRÉLÈVEMENT

LOT ÉCHANTILLON

SOUS-ÉCHANTILLON

ALIQUOTE

(analyse physico-chimique)

Lot: ensemble d'une production alimentaire ou d'une matière première.

Échantillon: portion du lot prélevée au hasard ou selon des méthodes statistiques.

Sous-échantillon: portion de l'échantillon prélevée qui servira à la prise de l'aliquote.

Aliquote: appelé parfois la prise d'essai, c'est la portion de l'échantillon ou du sous-échantillon utilisée pour une analyse physico-chimique.

I.2. Principes généraux pour la préparation des échantillons

1) Enlèvement des matières étrangères et des parties non comestibles

- Lavage des fruits et légumes (sable, terre)
- Enlèvement des os (viandes)
- Enlèvement de la partie habituellement non consommée (fromage à pâte molle)

2) Homogénéisation Aliments liquides

- Brassage par inversion, rotation ou transfert d'un récipient à un autre - Brassage énergétique pour émulsification (vinaigrette)
- Enlèvement des gaz (les boissons gazeuses)
- Décongélation complète d'un échantillon avant le prélèvement de l'aliquote Aliments solides
- Découpage adéquat de l'échantillon (viande,)
- Broyage approprié (hache-viande, moulin à farine, malaxeur, appareil Stomaker, mortier, bêcher et spatule, râpe, etc ...)

3) Prévention des altérations de l'échantillon

- altération physique ou chimique due à l'action de la chaleur
- séparation de la matière grasse (lait cru)
- caramélisation (aliments sucrés)
- altération chimique au contact avec l'air ambiant - oxydation par l'action de O₂ (rancissement) - modification de la concentration des constituants

- absorption d'humidité par les aliments hygroscopiques
- évaporation d'eau ou des constituants volatils d'un aliment

4) Conservation des échantillons

- réfrigération ou congélation selon la nature de l'échantillon et le délai d'analyse
- utilisation de contenants hermétiquement fermés
- utilisation de préservatifs inhibant la croissance microbienne

I.3. Principes généraux pour le prélèvement d'aliqotes

- s'assurer que l'échantillon est le plus homogène possible juste avant le prélèvement.
- pour le prélèvement d'un volume exact d'échantillon (résultat en % P/V):
- tenir compte de la température, car la masse volumique d'un liquide varie en fonction de celle-ci. Le prélèvement s'effectue normalement à la température ambiante (20° C).
- utiliser les instruments les plus précis (pipettes)
- pour le prélèvement d'une masse d'échantillon (résultat en % P/P):
- procéder le plus rapidement possible pour la pesée d'un échantillon (solide ou liquide) qui perd facilement son humidité.

I.3.1. Prélèvement par pesée directe de l'aliqote : Le récipient dans lequel doit être déposé l'aliqote pour effectuer l'analyse est placé sur la balance et l'aliqote est pesé directement dans le récipient.

Exemple: Placer un plat d'aluminium sur la balance analytique et noter sa masse. Tarer le plat puis ajouter rapidement environ 2 ml de lait. Noter la masse de l'échantillon aussitôt que la balance affiche g.

I.3.2. Prélèvement par pesée indirecte de l'aliqote : Le récipient dans lequel doit être déposé l'aliqote pour effectuer l'analyse n'est pas placé sur la balance, pour des raisons diverses (poids trop élevé du récipient, récipient trop volumineux, échantillon perdant rapidement son eau, impossibilité de transférer adéquatement l'aliqote directement dans le récipient, etc). On place

plutôt l'instrument servant à prélever l'aliquote sur la balance et on procède généralement par différence de poids. Exemple: Placer sur la balance analytique un support métallique et une pipette remplie d'environ 10 ml de lait. Noter la masse. Retirer la pipette et verser le lait dans un tube . Replacer la pipette sur le support et noter de nouveau la masse.

I.3.3. Instruments de prélèvement:

- pipette
- seringue jetable en plastique
- compte-gouttes jetable
- nacelle jetable, bêcher
- cuillère graduée,
- pincette en métal
- spatule
- papier-filtre
- etc ...

En conclusion, la technique utilisée pour le prélèvement de l'aliquote dépend de plusieurs facteurs: - la nature de l'échantillon - ses caractéristiques physiques (viscosité, produit hygroscopique, etc) - le récipient dans lequel il sera placé - la suite du protocole expérimental.

I.4. Choix de la méthode d'analyse :

Première étape, nécessite une bonne connaissance des outils analytiques disponibles, leurs avantages et leurs limites.

Critères :

- Domaine de concentration de l'espèce à doser : peut éliminer certaines méthodes pas assez sensibles et si traces ou ultratracés \diamond attention à la minimisation des pertes. Notion de traces et d'ultratracés n'ont pas de seuil strict de concentration, pas la même pour chimiste, biologiste, etc. En analyse chimique on parle de traces lorsque quelques centaines de mg/kg à quelques microg/kg et d'ultratracés pour des concentrations plus faibles. Ppm : mg/kg ; ppb : microg/kg ; ppt : ng/kg - Niveau d'exactitudes souhaité : compromis entre durée d'analyse/exactitude. - Complexité de l'échantillon : présence autres constituants \diamond élimination des interférences, séparation des différents constituants. - Nature physique de l'échantillon (solide, liquide, gaz) : échantillon doit être homogénéisé ? pertes d'analytes

volatils ? compositions échantillon risque t'elle de changer (ex : hygroskopie) ? Comment dissoudre ou décomposer l'échantillon sans perdre analytes ? etc. - Nombre échantillons à analyser : critère économique. - Données bibliographiques.

- La disponibilité de la méthode.

Chapitre II

Méthodes

chromatographiques

d'analyse

II. Méthodes chromatographique d'analyse

II.1. Introduction

Le nom de chromatographie dérive du mot grec *chrôma* qui signifie couleur, parce que le premier scientifique à utiliser cette technique, le botaniste russe Tswett, sépara en 1903 les pigments colorés d'une plante verte en filtrant un extrait de celle-ci sur une colonne de verre remplie de craie (CaCO_3) finement pulvérisée. Ce fut la première application de la chromatographie d'adsorption sur colonne. Tandis que l'on perfectionnait la méthode primitive de chromatographie d'adsorption, d'autres chercheurs s'appliquaient à découvrir de nouveaux procédés chromatographiques basés sur des principes physiques différents. L'avènement des méthodes modernes de détection a également contribué à l'éclosion de plusieurs modes de chromatographie différents. Actuellement, certains types de chromatographe permettent la détection de quantités aussi infimes que des parties par billion (ppb) de composés. La découverte des principaux modes de chromatographie apparaît dans la liste suivante par ordre chronologique:

- la chromatographie sur couche mince (CCM) (1938). (TLC : Thin Layer Chromatography)
- la chromatographie sur papier (1944). - la chromatographie en phase gazeuse (CPG) (1952). (GC: Gas Chromatography)
- la chromatographie sur gel (1959).
- la chromatographie liquide à haute pression (CLHP) (1967). (HPLC : High Pressure Liquid Chromatography)

II.1.1. Définition

La chromatographie est une technique de séparation des constituants d'un mélange, dans le but d'identifier ou de doser certains constituants du mélange.

II.1.2. Principe général de la chromatographie

Quel que soit le genre de chromatographie effectué, la séparation des composés d'un mélange est basée sur la **distribution différente de ces composés entre une phase stationnaire et une phase mobile**. Les composés seront séparés uniquement si certains d'entre eux sont plus fortement retenus par la phase stationnaire, pendant que les autres se déplacent plus rapidement au sein de la phase mobile.

Dans une chromatographie, les petites différences dans le comportement de chaque composé d'un mélange au sein des phases stationnaire et mobile sont multipliées plusieurs milliers de fois, ce qui rend la séparation possible.

- Tous les composés d'un mélange se déplacent à la même vitesse dans la phase mobile.

- Les temps de rétention des composés sur la phase stationnaire doivent être différents pour que la séparation se fasse.

L'expérience de base en chromatographie peut être décrite comme suit (fig. 1) : 1. On immobilise dans une colonne un solide finement divisé appelé phase stationnaire (papier, gélatine, silice, polymère, ..etc) 2. On place au sommet de cette colonne un petit volume de l'échantillon à séparer. 3. On force cet échantillon à traverser la colonne de haut en bas au moyen de la phase mobile afin d'entraîner ses divers constituants. Si les composés présents migrent à des vitesses différentes, ils pourront être recueillis séparément, chacun en solution dans la phase mobile. En dehors de cette exploitation de la chromatographie qui perdure depuis son origine, ce procédé est devenu en soi une méthode d'analyse lorsqu'on eut l'idée de mesurer les temps de migration des composés dans la colonne pour les identifier. Pour cela il devenait indispensable de maîtriser certains paramètres (débits, température...) et il fallait placer en sortie de colonne un détecteur pour repérer les changements de composition de la phase mobile. Cette application de la chromatographie, dont le but n'est plus de récupérer les composés séparés mais de mesurer leurs temps de passage dans la colonne s'est développée lentement.

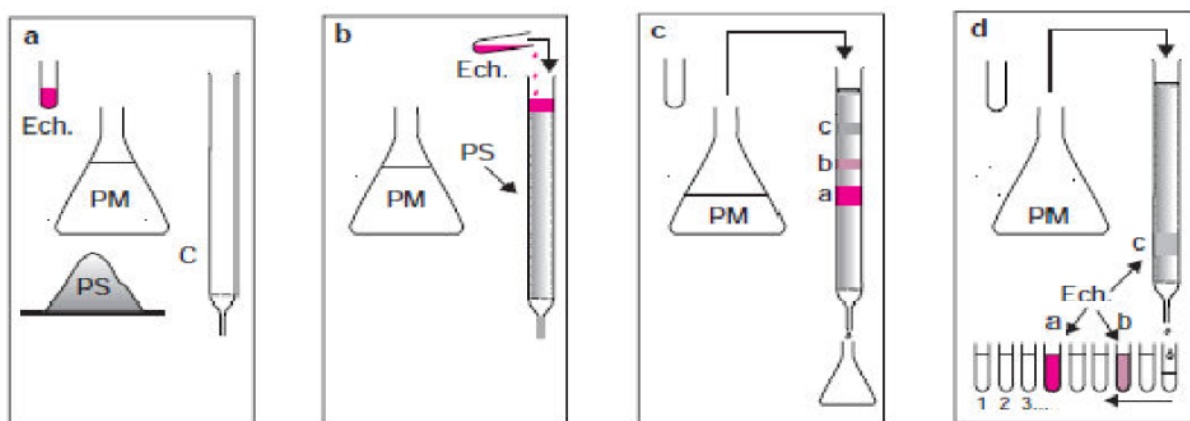


Figure 1 L'expérience de base en chromatographie.

a) Les ingrédients nécessaires C, colonne, PS, phase stationnaire, PM, phase mobile et E, échantillon ; b), le dépôt de l'échantillon ; c) le début de l'élution ; d) la récupération des produits après séparation.

L'identification d'un composé par chromatographie correspond à une méthode comparative. Pour identifier un composé, dont on ne sait s'il s'agit de A ou de B, par la méthode chromatographique, on compare son temps de migration à ceux des deux composés de référence A et B, ceci, sans changer d'appareillage et en se plaçant dans les mêmes conditions expérimentales.

II.1.3. Le Chromatogramme

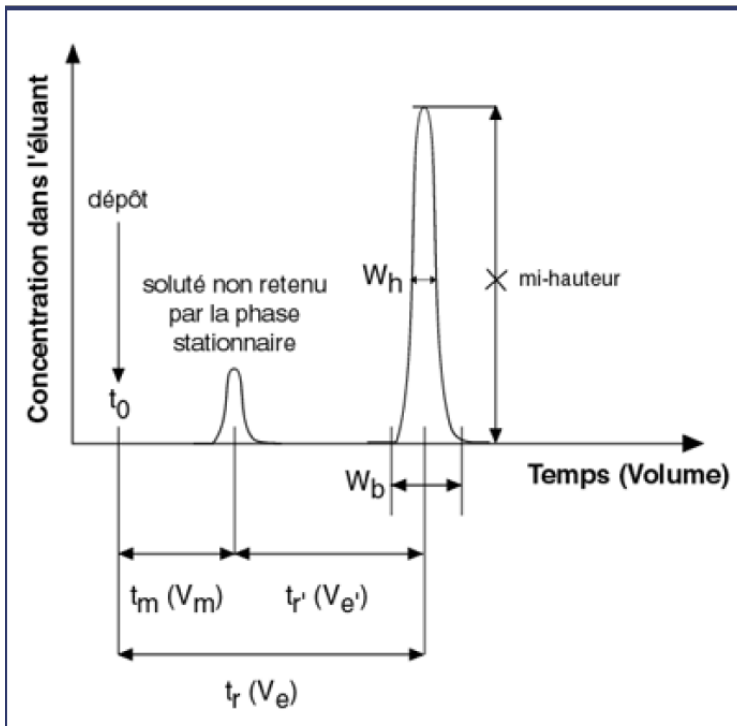
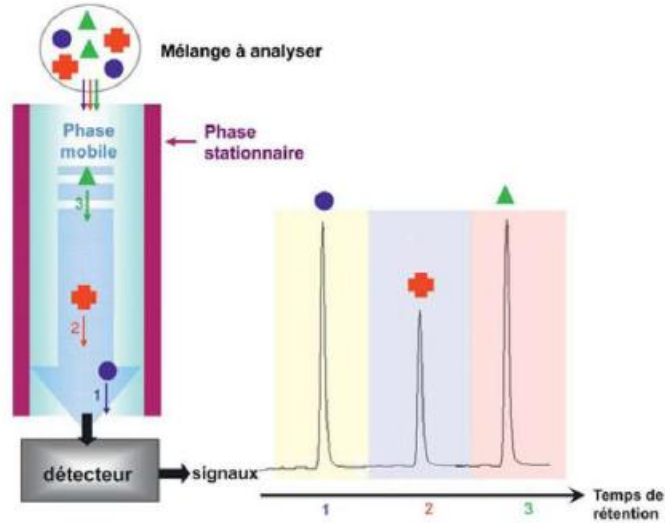
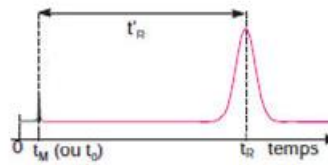
Le *chromatogramme* est une courbe qui traduit la variation au cours du temps d'un paramètre relié à la concentration instantanée du soluté en sortie de colonne (fig. 2). Le temps (ou

très rarement le *volume d'éluion*) est porté en abscisse et l'intensité du signal de détection en ordonnée. La *ligne de base* correspond au tracé obtenu en l'absence de composé élué. La séparation est complète quand le chromatogramme présente autant de *pics chromatographiques* revenant à la ligne de base qu'il y a de composés dans le mélange à analyser.

Un constituant est caractérisé par son *temps de rétention* t_R , qui représente le temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui qui correspond sur le chromatogramme au maximum du pic qui lui est lié. Dans le cas idéal t_R est indépendant de la quantité injectée. Un constituant non retenu sort de la colonne au temps t_M , appelé temps mort (désigné également par t_0).

La différence entre le temps de rétention et le temps mort est désignée par le temps de rétention réduit du composé $t_{R'}$.

En analyse quantitative on se contente le plus souvent de bien séparer du mélange le ou les constituants à doser. Si le signal envoyé par le capteur varie linéairement avec la concentration d'un composé, il en sera de même de l'aire du pic correspondant sur le chromatogramme.



Légende :

- t_0 : début de l'injection
- V_m : volume mort de la colonne
- t_m : temps mort
- V_e : volume d'éluion (de rétention, V_r) d'un composé
- t_r : temps de rétention (d'éluion, t_e) d'un composé
- V_e (volume d'éluion) = d (débit) x t (temps)
- V_e' : volume d'éluion réduit ($V_e = V_e' + V_m$)
- t_r' : temps de rétention réduit ($t_r = t_r' + t_m$)
- W_b : largeur du pic à la base
- W_h : largeur du pic à mi-hauteur

Fig.2 Pics chromatographique

Volume d'élution d'un composé (V_e) :

$$V_e = V_m + K \cdot V_s$$

- V_m : volume mort de la colonne
- V_s : volume de la phase stationnaire
- K : coefficient de distribution (de partage) du composé entre la phase stationnaire et la phase mobile :

$$K = C_s / C_m = (V_e - V_m) / V_s$$

- C_s : concentration à l'équilibre, du soluté dans la phase stationnaire.
- C_m : concentration à l'équilibre, du soluté dans la phase mobile.

Facteur de capacité ou de rétention (K') :

$$K' = (V_e - V_m) / V_m = (t_r - t_m) / t_m$$

K' varie avec la force d'élution du solvant : quand elle augmente, K' diminue.

Coefficient de sélectivité (α) :

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

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

Aussi définit-on le coefficient de résolution

Coefficient de résolution de 2 pics (R) :

$$R = (V_{e2} - V_{e1}) / [\frac{1}{2} \cdot (W_{b1} + W_{b2})]$$

de 2 pics (R) :

- $R < 1$: mauvais.
- $1,4 < R < 1,6$: optimal.

II.1.4. Les diverses techniques chromatographiques

Les techniques chromatographiques peuvent être réparties suivant plusieurs critères et en particulier en fonction de la nature des deux phases en présence. Le classement suivi ci-après est établi à partir de la nature physique des phases :

II.1.4.1. Chromatographie en phase liquide (CPL)

Ici la phase mobile est un liquide. C'est ce type de chromatographie auquel appartient la forme la plus anciennement connue en tant que méthode préparative de séparation. Cette catégorie très répandue peut être subdivisée d'après le phénomène mis en jeu :

- Chromatographie liquide/solide (ou d'adsorption). La phase stationnaire est un milieu solide perméable sur lequel les molécules adhèrent. Les phases stationnaires ont fait beaucoup de progrès depuis Tswett, qui utilisait le carbonate de calcium ou l'inuline (un polymère en poudre très fine du sucre ordinaire).

-Chromatographie ionique. La phase stationnaire solide comporte en surface des sites ioniques et la phase mobile est une solution-tampon aqueuse. La séparation met en jeu des échanges entre les ions de l'échantillon avec ceux de la phase stationnaire.

- Chromatographie d'exclusion. La phase stationnaire est un matériau comportant des pores dont les dimensions sont choisies en rapport avec la taille des espèces à séparer. On réalise ainsi une sorte de perméation sélective à l'échelle moléculaire. Cette technique est désignée par *filtration sur gel* ou *perméation de gel*.

- Chromatographie liquide/liquide ou de partage (CLL). La phase stationnaire est un liquide immobilisé sur un matériau inerte et poreux qui n'a qu'un rôle de support. L'imprégnation, le procédé le plus ancien pour immobiliser un liquide, est une voie maintenant abandonnée, par suite d'un risque important de lessivage de la colonne.

II.1.4.2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La phase mobile est un gaz inerte et, comme précédemment, ce type de chromatographie peut être subdivisé selon le phénomène mis en œuvre :

- Chromatographie gaz/liquide (CGL). La phase mobile est un gaz et la phase stationnaire est un liquide immobilisé sur un support inerte lequel peut être tout simplement la paroi de la colonne. À défaut d'être un gaz, l'échantillon doit donc être porté à l'état de vapeur. Ce sont Martin et Synge qui ont suggéré le remplacement de la phase mobile liquide par un gaz afin d'améliorer les séparations. C'est à partir de cette époque qu'on assista au véritable démarrage de la chromatographie analytique.

- Chromatographie gaz/solide (CGS). La phase stationnaire est un solide poreux (carbone graphite ou gel de silice ou alumine) et la phase mobile est un gaz. Ce type de CPG est très performant pour les analyses de mélanges de gaz ou de composés à bas point d'ébullition.

II.1.5. Phénomènes physiques exploités en chromatographie

Il existe en chromatographie plusieurs phénomènes physiques responsables de la rétention plus ou moins forte des composés sur la phase stationnaire. Les deux plus exploités sont les phénomènes d'adsorption et de partition.

II.1.5.1. Phénomène d'adsorption

Le phénomène d'adsorption est essentiellement un phénomène de **surface** par lequel les composés sont attirés sur les sites actifs de la phase stationnaire par des liaisons hydrogènes et électrostatiques. La phase stationnaire est un matériau solide en forme de petits granules de différentes grosseurs; les plus utilisées sont le gel de silice, l'alumine et la cellulose en poudre.

Influence de la polarité des composés : En chromatographie d'adsorption, la capacité d'adsorption des composés sur la phase stationnaire est en relation directe avec leur polarité. Plus un composé est polaire, plus fortement il sera adsorbé sur les sites actifs de la phase stationnaire et moins vite il se déplacera.

Influence de la polarité de la phase mobile : À l'exception de la chromatographie en phase gazeuse, la phase mobile, appelée également **éluant**, est un solvant ou un mélange de plusieurs solvants miscibles, dont le rôle est de déplacer les composés du mélange vers le haut de la plaque en chromatographie sur couche mince ou vers la sortie de la colonne en chromatographie sur colonne.

Lorsqu'on exploite le phénomène d'adsorption en chromatographie, la polarité de l'éluant a une influence considérable sur la vitesse de déplacement des composés d'un mélange. **Plus l'éluant est polaire, plus les composés se déplacent rapidement.** En effet, l'éluant est également adsorbé sur les sites actifs de la phase stationnaire et entre en compétition avec les composés du mélange.

II.1.5.2. Phénomène de partition

Dans une chromatographie de partition, la phase stationnaire est non pas un solide, mais un liquide fixé physiquement ou greffé chimiquement sur un support solide. Les composés d'un mélange vont donc se solubiliser dans la phase liquide stationnaire, au lieu de s'y adsorber. C'est la solubilité différente des composés dans la phase stationnaire et dans la phase mobile qui rend la séparation chromatographique possible.

Influence de la solubilité des composés :

- Dans la phase stationnaire :

Plus un composé est soluble dans la phase liquide stationnaire, moins vite il se déplacera.

- Dans la phase mobile :

Plus un composé est soluble dans la phase mobile, plus vite il se déplacera.

II.1.6. Modes de chromatographie

Dépendant du système chromatographique utilisé, on distingue trois modes de chromatographie : la chromatographie sur papier, la chromatographie sur couche mince et la chromatographie sur colonne. À cause de l'appareillage spécialisé, la chromatographie sur colonne se subdivise également en quatre catégories, soit la chromatographie dite traditionnelle sur colonne, la chromatographie en phase gazeuse (CPG), la chromatographie liquide à haute pression (HPLC) et la chromatographie sur gel.

II.2. La chromatographie sur couche mince (CCM)

II.2.1. Définition et appareillage

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les

substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant. Les principaux éléments d'une séparation chromatographique sur couche mince sont :

- la cuve chromatographique : un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche.

- la phase stationnaire : une couche d'environ 0,25 μm de gel de silice ou d'un autre adsorbant est fixée sur une plaque de verre à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté (plâtre de Paris) l'amidon ou un polymère organique.

- l'échantillon : environ un microlitre (μl) de solution diluée (2 à 5 %) du mélange à analyser, déposer en un point repère situé au-dessus de la surface de l'éluant.

- l'éluant : un solvant pur ou un mélange : il migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon.

II.2.2. Principe de la technique

Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. 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. Les composés se déplacent donc alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile, l'action de rétention de la phase stationnaire étant principalement contrôlée par des phénomènes d'adsorption. Généralement, en chromatographie sur couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires.

II.2.3. Applications de la CCM

Lorsque les conditions opératoires sont connues, elle permet un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé organique. Si l'analyse, réalisée avec divers solvants et différents adsorbants, révèle la présence d'une seule substance, on peut alors considérer que cet échantillon est probablement pur. De plus, étant donné que la chromatographie sur couche mince indique le nombre de composants d'un mélange, on peut l'employer pour suivre la progression d'une réaction.

II.2.4. Adsorbants et plaques chromatographiques

Par ordre d'importance décroissante, les adsorbants employés en CCM sont : le gel de silice, l'alumine, le kieselguhr et la cellulose.

Les plaques vous seront fournies prêtes à l'emploi.

II.2.5. Choix de l'éluant

L'éluant est formé d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants. Un éluant qui entraîne tous les composants de l'échantillon est trop polaire ; celui qui empêche leur migration ne l'est pas suffisamment. Choix de l'éluant dans le cas d'analyses : – d'hydrocarbures : hexane, éther de pétrole ou benzène. – de groupements fonctionnels courants : hexane ou éther de pétrole mélangés en proportions variables avec du benzène ou de l'éther diéthylique forment un éluant de polarité moyenne. – de composés polaires : éthanoate d'éthyle, propanone ou méthanol.

II.2.6. Dépôt de l'échantillon

L'échantillon est mis en solution (2 à 5 %) dans un solvant volatil, qui n'est pas forcément le même que l'éluant : on emploie fréquemment le trichlorométhane (chloroforme), la propanone ou le dichlorométhane. La solution est déposée en un point de la plaque située à environ 1 cm de la partie inférieure. Il est important que le diamètre de la tache produite au moment du dépôt soit faible ; idéalement, il ne devrait pas dépasser 3 mm. Ce sont généralement les dépôts les moins étalés qui permettent les meilleures séparations. Pour augmenter la quantité déposée, il est toujours préférable d'effectuer plusieurs dépôts au même point, en séchant rapidement entre chaque application plutôt que de déposer en une seule fois un grand volume d'échantillon qui produirait une tache plus large. L'échantillon est déposé à l'aide d'une micropipette ou d'un tube capillaire en appuyant légèrement et brièvement l'extrémité de la pipette sur la couche d'adsorbant en prenant soin de ne pas le détériorer. On vérifie l'identité des composants présumés d'un échantillon, en procédant à un dépôt séparé d'une solution de chacun d'eux puis à celui de leur mélange. Ces solutions témoins permettent de comparer la migration de chaque composé avec celle de l'échantillon à analyser.

II.2.7. Développement de la plaque

Le développement consiste à faire migrer le solvant sur la plaque. Dans les analyses usuelles de laboratoire, le principal type de développement est la chromatographie ascendante : la plaque est placée en position verticale dans une cuve et le solvant qui en recouvre le fond monte par capillarité. Le niveau de liquide est ajusté à environ 0,5 cm du fond de la cuve puis on introduit la plaque. Pendant le développement du chromatogramme, la cuve doit demeurer fermée et ne pas être déplacée. Lorsque la position du front du solvant arrive à environ 1 cm de l'extrémité

supérieure, la plaque est retirée de la cuve, le niveau atteint par le solvant est marqué par un trait fin, puis la plaque est séchée à l'air libre ou à l'aide d'un séchoir.

II.2.8. Révélation

Lorsque les composants de l'échantillon analysé sont colorés, leur séparation est facilement observable sur la plaque ; dans le cas contraire, on doit rendre les taches visibles par un procédé de révélation. Les taches sont ensuite cerclées au crayon. Les méthodes usuelles de révélation sont les suivantes : radiations UV, fluorescence, iode, atomisation. Sauf indications contraires, nous utiliserons les radiations UV. En exposant la plaque à une source de radiation UV, certains composés apparaissent sous forme de taches brillantes. Si un indicateur fluorescent est incorporé à l'adsorbant, la plaque entière devient fluorescente lorsqu'elle est soumise à une radiation UV ; les composés y sont révélés sous forme de taches sombres.

II.2.9. Calcul de R_f (retarding factor ou rapport frontal)

$$R_f = d_i / d_s$$

d_i : distance parcourue par le composé (mesuré au centre de la tache)

d_s : distance parcourue par le front du solvant

II.2.10. Description d'une analyse par CCM selon l'ordre chronologique

Préparation de la cuve chromatographique.

- Introduire l'éluant ou le mélange de solvants.
- Ajuster le niveau à environ 0,5 cm du fond de la cuve.
- Garnir l'intérieur de la cuve d'un papier filtre imprégné d'éluant et plaqué contre les parois; une ouverture est ménagée dans le filtre pour observer le développement du chromatogramme.
- Fermer le récipient (la cuve doit être saturée de vapeur de solvant)

Dépôt de l'échantillon sur la plaque.

- Procéder au nettoyage de la plaque si nécessaire.
- Dissoudre l'échantillon dans un solvant approprié en solution de 2 à 5 % . – Déposer environ 0,5 ml de la solution en un point situé à 1 cm de l'extrémité inférieure de la plaque; le diamètre de la tache doit être d'environ 2 mm pour la disposition de plusieurs produits.
- Sécher à l'aide d'un séchoir ; éventuellement faire de nouvelles applications.

Développement du chromatogramme.

- Placer la plaque dans la cuve en position verticale.

- Refermer le récipient qui ne doit plus être déplacé.
- Lorsque le front du solvant se trouve à environ 1 cm de l'extrémité supérieure de la plaque, la retirer et marquer cette position. (le trait peut être tracé à l'avance et servir de repère pour arrêter l'élution).

Révélation et calcul de R_f .

- Sécher la plaque à l'aide d'un séchoir
- Révéler les taches sous une lampe U V
- Cercler les taches et pointer leur centre.
- Calculer les R_f .

II.3. Chromatographie liquide à haute performance CLHP (HPLC en anglais)

II.3.1. Introduction

La chromatographie en phase liquide a permis de réaliser des analyses qui n'étaient auparavant pas possible avec les techniques sur couche mince ou en phase gazeuse. A l'origine la chromatographie en phase liquide se faisait sur des colonnes en verre. Le liquide traversait la phase stationnaire par gravité ou sous faible pression. Puis pour augmenter le débit, des manipulations ont été réalisées sous pression plus forte. C'est ce que l'on a appelé la chromatographie liquide sous haute pression (HPLC). Très rapidement le P de pression est devenu le P de performance lorsque l'on a optimisé la technique (diminution de la taille de particules de la phase stationnaire, régularité de cette phase...).

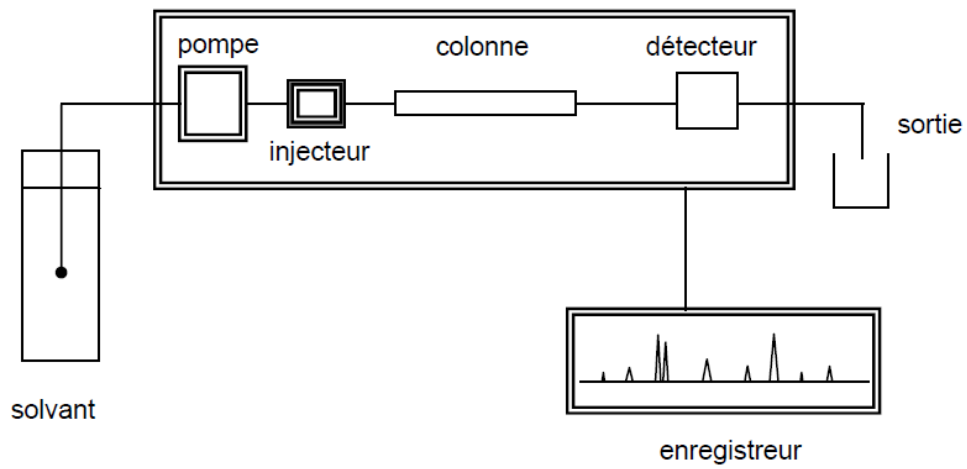
II.3.2. Principe

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

II.3.3. Appareillage et matériaux

Comme pour la chromatographie en phase gazeuse, la chromatographie liquide à haute pression s'effectue avec un appareil commercial, dont les principales composantes sont vendues

en modules séparés, ou incorporées dans la chromatographie, tel qu'illustré dans le schéma suivant:



II.3.3.1. Phase mobile

La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants qui doit être de pureté analytique et filtré pour éliminer les particules solides qui risqueraient d'endommager la pompe ou de bloquer la colonne. Le filtre, en acier inoxydable d'une porosité de $2\ \mu\text{m}$, est placé à l'extrémité dans le réservoir à solvant.

Principaux solvants en HPLC

phénomène	solvants
Adsorption	Hexane, méthanol, acétonitrile, dichlorométhane, chloroforme
Partition	Méthanol-eau, acétonitrile-eau
Échange d'ions	Solution tampon (pH contrôlé)
Exclusion	Tétrahydrofurane, toluène

II.3.3.2. Pompe

Le rôle de la pompe en HPLC est de pousser l'éluant à travers la colonne à une pression élevée et à un débit constant. Elle doit être inerte à la corrosion des solvants utilisés, offrir un bon choix de débits et être conçue pour réduire les pulsations au minimum. Les pompes utilisées en HPLC sont des pompes à piston.

II.3.3.3. Injecteur

Comme la pression dans le circuit pompe-colonne est très élevée, on utilise un moyen indirect pour introduire l'échantillon à l'entrée de la colonne. Celui-ci est d'abord introduit à l'aide d'une seringue dans un injecteur à boucle externe, en position LOAD. On injecte toujours un volume supérieur à celui de la boucle, en prenant soin de ne pas introduire de bulles d'air dans la boucle. En tournant la valve en position INJECT, seul le contenu de la boucle est dirigé en tête de colonne. Cette méthode d'injection a l'avantage de donner des résultats très reproductibles, d'une injection à l'autre.

II.3.3.4. Colonnes

La colonne est la partie la plus importante du système, puisque c'est à cet endroit que se fait la séparation des composés. Les colonnes sont en acier inoxydable, de longueur variant de 5 à 25 cm avec un diamètre interne de 4 à 4,6 mm. Ces colonnes sont remplies de la phase stationnaire, dont le diamètre des particules varie de 3 à 10 μm . Des compagnies se spécialisent dans la vente de colonnes pour HPLC. Pour éviter l'obstruction et la détérioration des colonnes par les contaminants, on place habituellement une colonne de garde plus petite et moins dispendieuse au sommet de la colonne principale. Les colonnes de garde doivent être changées régulièrement.



II.3.3.5. Détecteurs

Le détecteur est placé à la sortie de la colonne chromatographique et doit être capable de détecter les composés qui sortent de la colonne. Le signal est converti en impulsion électrique qui est transmise à l'enregistreur. Comme en chromatographie en phase gazeuse, les détecteurs utilisés en chromatographie liquide à haute pression doivent posséder certaines qualités, dont les principales sont : - une grande sensibilité - une réponse linéaire sur une gamme de concentration élevée - une capacité à détecter le plus de produits possible. Les principaux détecteurs utilisés en HPLC sont :

a) Détecteur à absorbance dans l'U.V. et le visible Le détecteur mesure l'absorbance du liquide qui sort de la colonne, à une longueur d'onde déterminée par le filtre utilisé. Son principal inconvénient est qu'il ne détecte que les composés qui ont une absorbance appréciable à la longueur utilisée.

b) Détecteur à indice de réfraction Le détecteur mesure l'indice de réfraction du liquide sortant de la colonne. C'est un détecteur universel puisque l'indice de réfraction de l'éluant est modifié lorsqu'un composé, quel qu'il soit, sort de la colonne. Il donne une réponse similaire pour les composés de la même famille (ex. : sucres), mais son principal inconvénient est sa faible sensibilité.

c) Détecteur fluorimétrique: Il mesure l'énergie de fluorescence d'un soluté excité par une radiation ultraviolette. Ce procédé sert pour les composés fluorescents ou les dérivés fluorescents de certains composés.

d) Détecteur électrochimique: Cette méthode de détection ne s'adresse qu'à la détection de molécule douée de propriétés oxydoréduction.

e) Détecteur par spectroscopie de masse: La chromatographie liquide couplée à la spectroscopie de masse (LC-MS) est une technique d'analyse qui permet d'identifier clairement un composé grâce à son rapport masse molaire/charge (m/z).

II.3.3.6. L'enregistreur

Il s'agit en fait d'un petit ordinateur qui récupère toutes les données issues des détecteurs, trace les chromatogrammes et intègre la surface des pics. Il imprime un rapport d'analyse donnant les temps de rétentions et les surfaces de chaque pic.

II.4. La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

II.4.1. 1. Introduction

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) (gas chromatography, GC, en anglais) est une technique qui permet de séparer des molécules d'un mélange éventuellement très complexe de nature et de volatilité très diverses. Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou

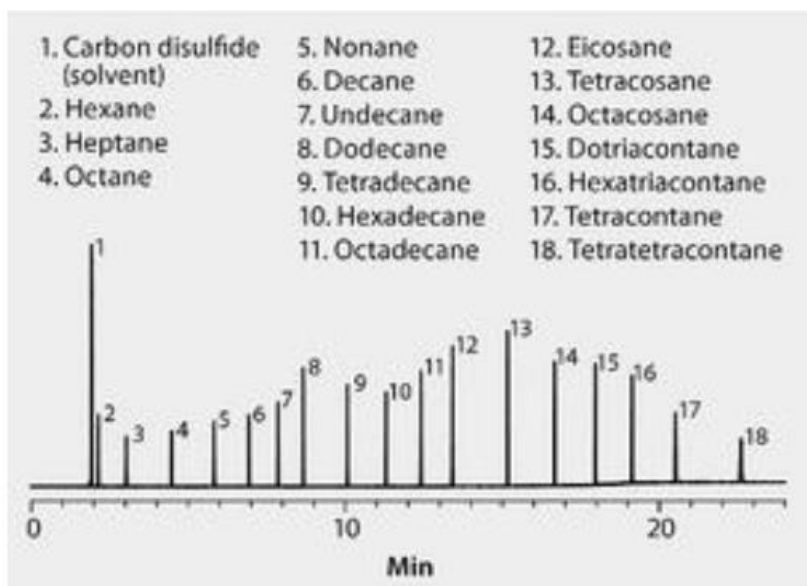
susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. C'est également le seul type de chromatographie qui utilise un gaz comme phase mobile, ce qui nécessite un appareil spécial, appelé communément le chromatographe à gaz. (La phase mobile est un gaz vecteur). Selon la phase stationnaire, Il existe deux types de chromatographies en phase gazeuse:

- Chromatographie gaz-solide (CGS) : C'est une chromatographie d'adsorption : la phase stationnaire est un solide poreux, réservé à l'analyse de mélanges de gaz ou de liquides à bas points d'ébullition.
- Chromatographie gaz-liquide (CGL) : C'est une chromatographie de partage : la phase stationnaire est un liquide immobilisé sur un support solide par imprégnation ou par greffage.

II.4.2. Principe

La CPG repose sur l'équilibre de partage des analytes entre une phase stationnaire et une phase mobile gazeuse. La séparation des analytes repose sur la différence d'affinité de ces composés pour la phase mobile et pour la phase stationnaire. Le mélange à analyser est vaporisé puis transporté à travers une colonne renfermant une substance liquide ou solide qui constitue la phase stationnaire. Le transport se fait à l'aide d'un gaz inerte, appelé « gaz vecteur », qui constitue la phase mobile. Le partage est un équilibre dynamique entre l'analyte A dans la phase stationnaire $A_{(\text{phase stationnaire})}$ et le même analyte dans la phase mobile $A_{(\text{phase mobile})}$: $A_{(\text{phase stationnaire})} \rightleftharpoons A_{(\text{phase mobile})}$. Le coefficient de partage K est la constante d'équilibre associée à cet équilibre. Plus la molécule a d'affinité pour la phase stationnaire, moins elle est entraînée par le gaz vecteur et donc plus elle est retenue sur la colonne. Ainsi, sur colonne polaire, les analytes apolaires sortent en premier, alors que sur colonne apolaire, les analytes polaires sortent en premier. Par ailleurs, plus la température est haute, plus on déplace l'équilibre de partage vers $A_{(\text{phase mobile})}$, et donc plus l'analyte A est entraîné par le gaz vecteur. Si les analytes d'un échantillon ont des coefficients de partage différents, alors, tous les autres paramètres étant identiques (débit du gaz vecteur, température), leurs durées de parcours dans la colonne seront différentes. Ainsi, les analytes se séparent puis sortent de la colonne les uns après les autres. La durée entre la date d'injection et celle de sortie de colonne d'un analyte A est son « temps de rétention ».

L'analyse conduit à l'obtention d'un chromatogramme, dont un exemple est donné ci-dessous :

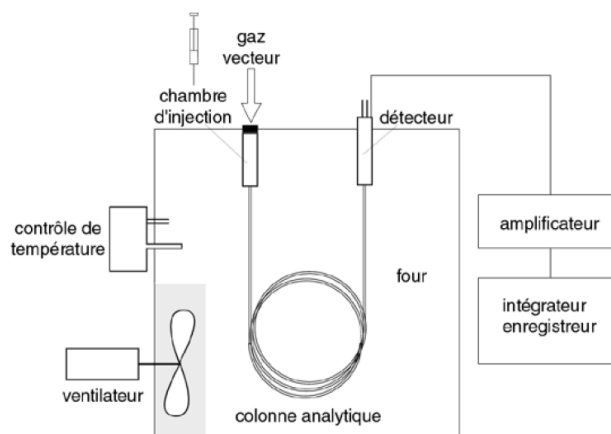


Chromatogramme d'un mélange d'alcanes

Chaque analyte du mélange d'alcanes est caractérisé par un temps de rétention bien précis. Ici, la séparation des analytes du mélange a été effectuée de façon optimale.

II.4.3. Appareillage

Quel que soit le chromatographe à gaz, on retrouve toujours les principales composantes suivantes



II.4.3.1. Le gaz vecteur (phase mobile)

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

Le débit de ce gaz vecteur est de l'ordre de 30 à 40 mL/min pour les colonnes remplies et de 0,2 à 2 mL/min pour les colonnes capillaires.

II.4.3.2. Le système d'injection

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

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

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

Certains injecteurs peuvent être munis d'une fonction « Split/Splitless ». La fonction « split » permet de ne pas injecter la totalité de l'échantillon ; cela peut être utile dans le cas d'échantillon en solution concentrée, pour éviter de surcharger la colonne.

II.4.3.3. La colonne (phase stationnaire)

Il existe deux types de colonnes : les *colonnes remplies* et les *colonnes capillaires*. Les colonnes remplies ont un diamètre de quelques millimètres et une longueur de l'ordre du mètre. Elles sont remplies de granules de support inerte, généralement de la silice, dont la surface est imprégnée ou greffée avec la phase stationnaire. Elles sont aujourd'hui supplantées par les colonnes capillaires, dont le pouvoir de résolution est bien supérieur.

Les colonnes capillaires sont de simples tubes d'acier inoxydable, de verre ou de silice fondue (matériau inerte vis-à-vis de la phase stationnaire et des échantillons) de diamètre intérieur compris entre 0,1 et 0,5 mm, et d'une longueur typique de plusieurs dizaines de mètres, pouvant aller jusqu'à 100 m. Pour tenir dans l'appareil, la colonne est enroulée, avec des spirales ayant 10 à 30 cm de diamètre. La surface interne de ce tube est recouverte d'un film de 0,1 à 5 µm d'épaisseur constitué de la phase stationnaire. Ce film est mis en place par greffage ou simple déposition, le greffage étant généralement préféré pour des raisons de stabilité thermique. Par exemple, la Carbowax® est une colonne capillaire comportant un film polaire de polyéthylène glycol greffé en surface, film qui constitue la phase stationnaire. La SE-30® est une colonne capillaire apolaire comportant un film de polydiméthylsiloxane qui constitue la phase stationnaire.

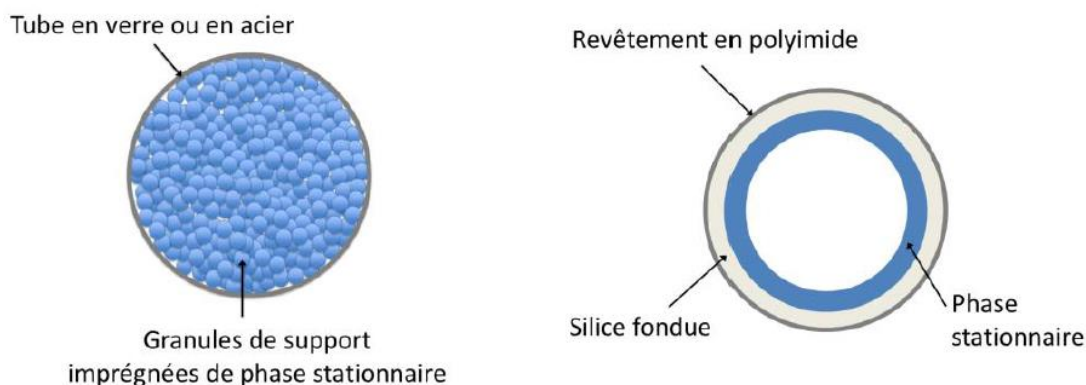


Schéma (en coupe et en photo) d'une colonne remplie (à gauche) et d'une colonne capillaire (à droite)

II.4.3.4. Le four

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

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

Une méthode pour laquelle la température est gardée constante tout au long de l'analyse est appelée « isotherme ». A l'inverse, on peut choisir d'augmenter la température du four au cours de l'analyse: cette méthode est appelée « gradient ».

D'une manière générale, une méthode isotherme tend à donner des pics larges pour les espèces les plus retenues, et donc une moins bonne séparation. Ce phénomène est partiellement dû à la diffusion : plus une espèce chimique circule longuement dans la colonne, plus elle a le temps de diffuser, élargissant ainsi le pic, et donc diminuant la hauteur des pics par la même occasion.

II.4.3.5. Le détecteur

En sortie de colonne, les analytes rencontrent le détecteur, aujourd'hui généralement couplé à un enregistreur numérique du signal qui permet son traitement. Cet élément mesure en continu une grandeur proportionnelle à la quantité des différents analytes. Il en existe de nombreux modèles, dont

- Le FID (en anglais *flame ionisation detector*, en français détecteur à ionisation de flamme), qui est le plus utilisé. La sortie de colonne traverse une flamme maintenue à une tension d'une centaine de volts. La pyrolyse ionise les composants, provoquant l'apparition d'un courant électrique entre les électrodes, ensuite amplifié. Typiquement utilisé avec les gaz vecteurs azote, hélium et hydrogène
- Le TCD (en anglais *thermal conductivity detector*, en français détecteur à conductivité thermique), ou catharomètre. La sortie de colonne arrive sur l'une des résistances d'un pont de Wheatstone ; le passage de composants fait varier la tension aux bornes du pont. Typiquement utilisé avec les gaz vecteurs hélium et hydrogène.
- Le MS (en anglais *mass spectrometer*, en français spectromètre de masse), généralement en mode EI (electron ionisation) ou CI (chemical ionisation), qui provoque l'ionisation des molécules organiques éluées et analyse ces ions. Ce couplage GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) permet, au-delà de la simple détection de présence d'espèces chimiques, d'avoir des informations concernant lesdits composants. Typiquement utilisé avec les gaz vecteurs azote, hélium et hydrogène .

II.4.3.6. Mode opératoire pour réaliser une analyse CPG:

- Vérifier qu'une colonne (ou plusieurs) est/sont déjà en place dans le chromatographe.
- Programmer le four. Si des conditions expérimentales adéquates sont déjà connues, les utiliser. Sinon :
 - ✓ Une méthode de type gradient est souvent suffisante. Balayer une grande plage de température, par exemple de 50 à 250 °C sur 10 min.
 - ✓ Si une méthode isotherme est désirée, commencer par le même gradient, puis resserrer les valeurs extrémales par itération pour obtenir le pic correspondant à l'analyte d'intérêt au temps de rétention jugé adéquat.
- Préparer une solution d'échantillon à une concentration environ égale à 1 mg.mL⁻¹, dans un solvant volatil (par exemple diéthyléther, cyclohexane, acétate d'éthyle).
- Choisir la colonne. Par défaut, une colonne apolaire est suffisante. On réserve généralement l'utilisation de colonnes polaires aux cas où les volatilités des analytes à séparer sont très proches.

- Injecter environ 1 μL dans l'injecteur. Par défaut, on peut choisir comme température de l'injecteur la plus haute température atteinte dans le four pendant l'analyse.
- Afin de nettoyer la colonne, on peut la laisser quelques minutes à la température maximale d'utilisation. Ceci permet de débarrasser la colonne des analytes les moins volatiles qui ne sont pas sortis de la colonne à la fin de l'analyse, et risquent de sortir lors d'une injection ultérieure.

Chapitre III

Introduction aux techniques spectrales d'analyse

II. Introduction aux techniques spectrales d'analyse

II.1. Introduction

L'analyse chimique correspond à un domaine très vaste qui englobe un ensemble de techniques et de méthodes pour déterminer la nature et la composition, voir la structure d'échantillons variés. On la rencontre dans de nombreux secteurs qui vont des plus traditionnels comme ceux de la chimie ou la pharmacie, aux secteurs de la biochimie, de l'agroalimentaire, au diagnostic médical, de l'environnement ou de la sécurité (police scientifique...).

La spectroscopie ou spectrométrie est l'étude expérimentale des spectres du rayonnement électromagnétique par des procédés, d'observation et de mesure avec décomposition des radiations en ondes monochromatiques. La spectroscopie s'intéresse en général au spectre d'absorption ou au spectre d'émission d'un objet. Elle fournit des informations sur l'identité, la structure et les niveaux énergétiques des atomes et des molécules grâce à l'analyse de l'interaction des rayonnements électromagnétiques avec la matière. Pratiquement les techniques spectrales sont utilisées pour l'identification d'un composé organique.

II.2. Rappels sur le domaine spectral :

La lumière ou rayonnements électromagnétique est une forme d'énergie qui se propage dans l'espace à très grande vitesse, et n'a pas besoin de support pour transmettre (traverse le vide facilement).

La vibration lumineuse se propage sous forme sinusoïdale dans une direction perpendiculaire aux deux vecteurs pour former une Onde lumineuse.

c'est à dire une onde, transversale elle est caractérisée par :

- Vitesse C : la célérité (vitesse) de la lumière dans le vide ($3 \cdot 10^8$ m/sec)
- Fréquence : C'est le nombre d'oscillations qui se produisent en une seconde
- Longueur d'onde λ : C'est la distance entre deux maxima/minima successifs d'une onde
- Amplitude

La lumière peut être décrite aussi comme un flux de particules élémentaires, les **photons** (rem : noms donné par G.L. Lewis en 1926).

L'ensemble des ondes électromagnétiques forme le spectre électromagnétique qui couvre en fait un très vaste domaine d'énergie. De manière restrictive, on appelle lumière toute onde électromagnétique qui provoque une sensation visuelle sur l'oeil humain, ce qui est le cas pour les

longueurs d'onde comprises entre 400 et 800 nm. On distingue en fait plusieurs types de spectroscopie basés chacun sur l'absorption d'énergie dans un domaine particulier de ce spectre.

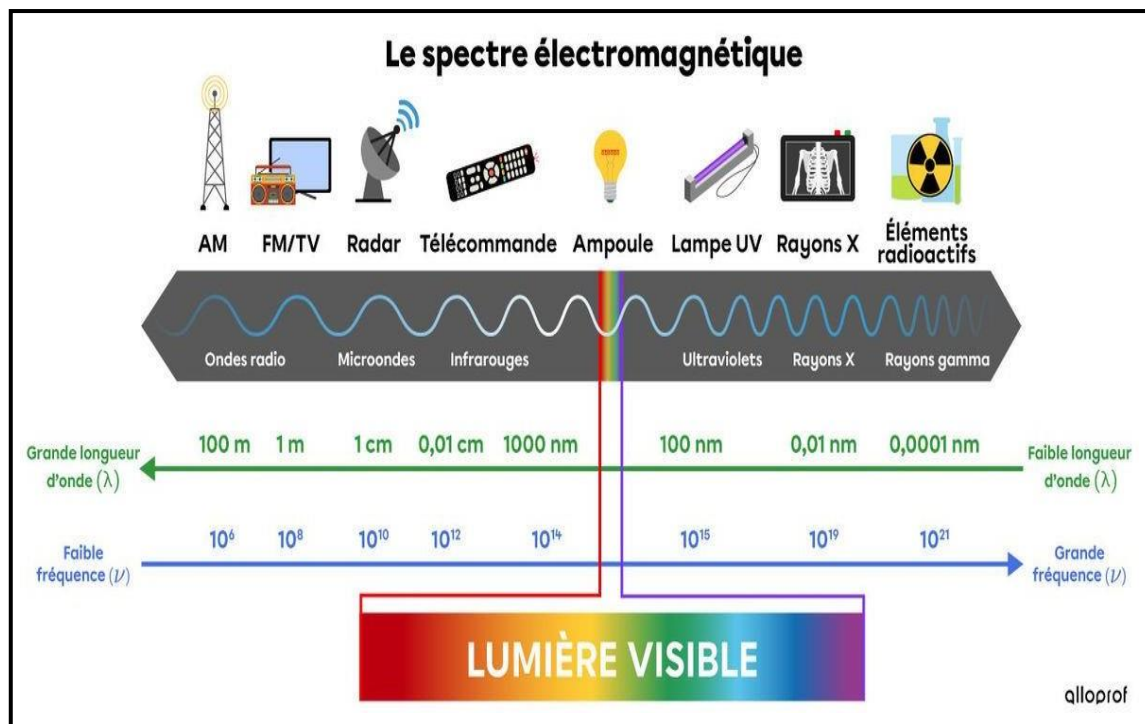


Figure 01. Illustration du spectre électromagnétique .

- **le rayonnement γ** est produit par la radioactivité lors de la désexcitation d'un noyau. Ils sont donc en particulier émis par les matériaux radioactifs et les réacteurs nucléaires. Ils sont dangereux pour les cellules humaines. Les spectres des rayons γ sont caractéristiques de l'espèce nucléaire.
- **Les rayons X** sont produits lors des transitions électroniques de haute énergie. Ils correspondent à des modifications dans l'état des électrons internes. De ce fait, ils ne dépendent pas des combinaisons chimiques dans lesquelles les atomes sont engagés.
- **Le rayonnement infrarouge** est divisé en trois régions : le proche, le moyen et le lointain infrarouges, nommés en relation avec le spectre visible. Comme pour toutes les techniques de spectroscopie, la spectroscopie **infrarouge** est employée pour l'identification de composés ou pour déterminer la composition d'un échantillon. Les spectres sont dus à des modifications dans l'état de rotation et de vibration des molécules.
- Les **micro-ondes** sont de longueur d'onde intermédiaire entre l'infrarouge et les ondes de radiodiffusion. Le terme de micro-onde provient du fait que ces ondes ont une longueur d'onde plus courte que celles de la bande VHF, utilisée par les radars pendant la Seconde Guerre mondiale. On peut citer dans cette catégorie la spectroscopie de rotation en micro-onde qui

est concernée par les mouvements de rotation des molécules.

□ **Les ondes radio** sont produites par des courants électriques de haute fréquence . Une spectroscopies se rattachant à cette région est la résonance magnétique nucléaire (RMN). La technique consiste à induire des transitions entre les niveaux énergétiques que peuvent occuper les spins de certains noyaux sous l'action d'un champ magnétique intense.

II.3. Les différents processus d'interaction rayonnement-matière

L'interaction du rayonnement électromagnétique avec la matière peut prendre différentes formes qui sont à la base de tous les phénomènes spectroscopiques :

II.3.1. L'absorption

Lorsqu'un atome est soumis à une onde lumineuse, il peut absorber un photon. L'atome, initialement dans un état d'énergie électronique E_a , passe alors dans un état électronique d'énergie supérieure $E_b > E_a$.

II.3.2. L'émission

La présence d'un rayonnement incident peut induire un atome excité à émettre un photon ayant les mêmes caractéristiques que les photons incidents. Ce processus est à la base du fonctionnement des lasers

II.3.3. La diffusion

La **diffusion** est le phénomène par lequel un rayonnement, comme la lumière, le son ou une particule en mouvement, est dévié dans de multiples directions par une interaction avec d'autres objets.

II.3.4. Les énergies d'une molécule

Une molécule en mouvement possède quatre types d'énergies :

L'énergie électronique qui est dû aux mouvements des électrons de la molécule. L'énergie de translation, de rotation et de vibration est dû aux mouvements de lamolécule, la somme de ces trois termes représentent l'énergie cinétique globale de la molécule.

En spectroscopie d'absorption seules les énergies quantifiées interviendront (Energie de vibration des atomes, de rotation des molécules et l'énergie des électrons), tandis que l'énergie cinétique de translation n'est pas quantifiée, donc n'interviendrapas en spectroscopie d'absorption car elle dépend uniquement de la température ($E_{\text{Translation}} = 3/2 kT$; k est la constante de Boltzmann).

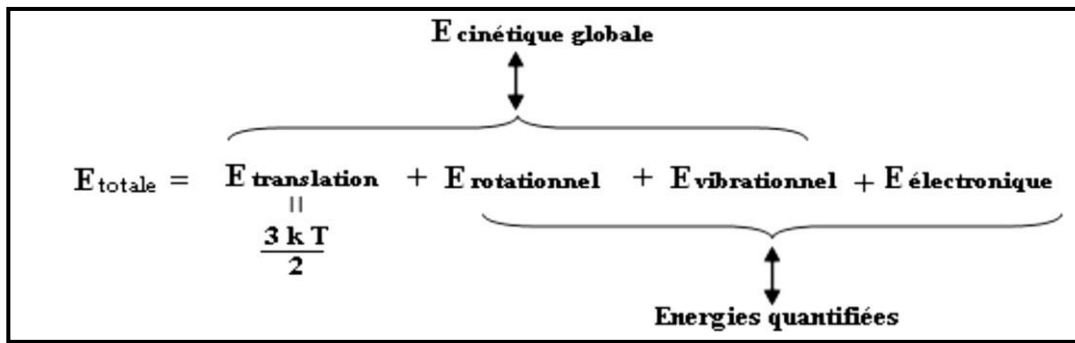


Figure 02. Divers types d'énergies moléculaires

Les divers types d'énergies moléculaires (électroniques, vibrationnelle, ou spin nucléaire) sont quantifiés ceci signifie que seules certaines énergie sont permises. La molécule peut être excitée de son état d'énergie le plus bas (état fondamental) à un état d'énergie plus élevé (état excité) par un photon (quantum d'énergie) de radiation électromagnétique de longueur d'onde approprié.

Les énergies de vibration des atomes, de rotation des molécules et l'énergie des électrons sont toutes quantifiées.

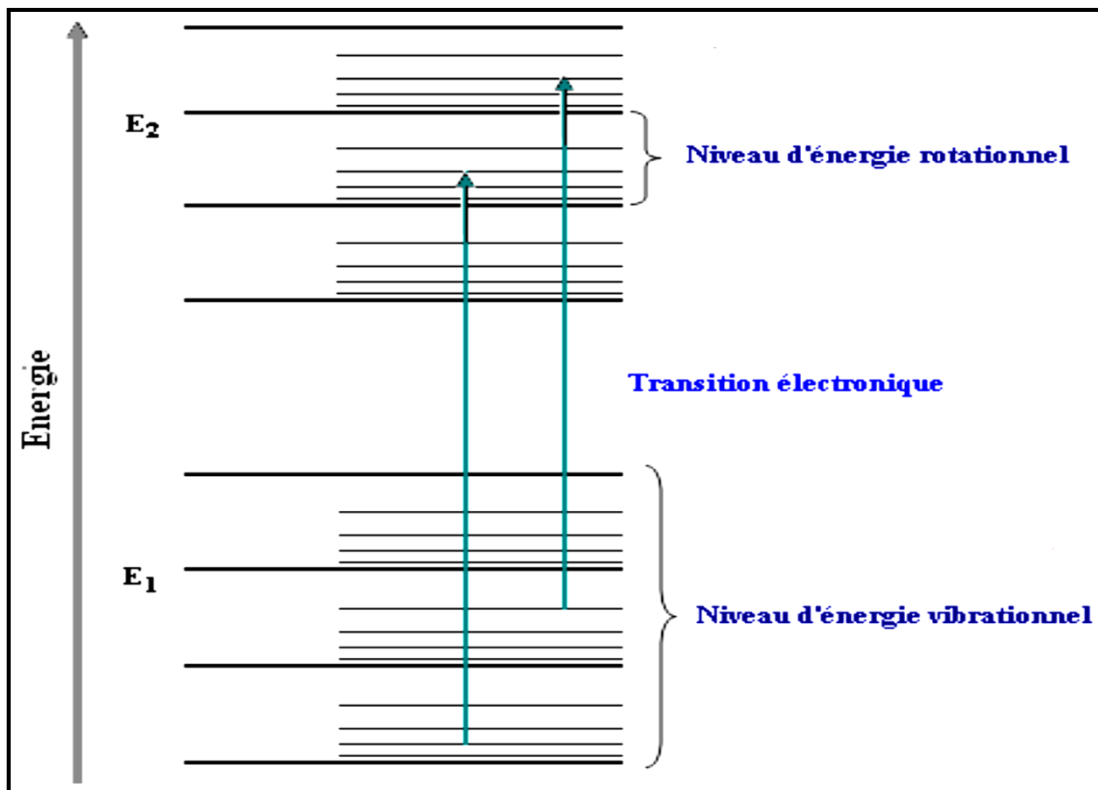


Figure 03. Niveaux d'énergie moléculaire.

La matière (atome, ion ou molécule) ne peut exister qu'à certains états énergétiques discrets. De plus, le passage d'un corps de son état fondamental à un de ses états excités ne peut se faire que

par absorption du quanta d'énergie représentant la différence d'énergie entre l'état fondamental et l'état excité. Ainsi, un corps traversé par un rayonnement électromagnétique n'absorbera que les photons possédant l'énergie permettant à ce corps d'atteindre un état excité. Il restera ensuite dans cet état un bref instant (10-13 s) avant de se relaxer à son état fondamental en réémettant l'énergie absorbée sous forme de chaleur et/ou d'onde électromagnétique.

Suite à l'échange d'énergie, le rayonnement électromagnétique entraîne une perturbation du mouvement interne moléculaire. Il se produit une transition d'un niveau d'énergie vers un autre niveau d'énergie dépendant du mouvement provoqué.

Tableau 01. Les effets d'interaction rayonnement-matière

Radiation absorbée	Effet sur la matière
Ondes radio	Transitions de spins nucléaires (résonance magnétique nucléaire RMN)
Micro-onde	Rotation moléculaire. Transitions de spins électroniques (résonance paramagnétique électronique RPE)
Infrarouge	Rotation et vibration moléculaire
Visible et ultraviolet	Saut des électrons de valence
Rayons X	Extraction des électrons des couches internes de l'atome

II.4. Principes de l'absorption

La spectroscopie d'absorption est la plus répandue. Des quanta d'énergies apportées par les ondes électromagnétiques frappent l'échantillon et sont absorbés. La quantité d'énergie absorbée dépend de la longueur d'onde du faisceau incident puisque suivant la valeur de la fréquence ν de la radiation électromagnétique, différentes transitions peuvent se produire entre les divers états d'énergie propre aux molécules de l'échantillon.

Si l'on représente l'énergie absorbée en fonction de la fréquence ν on trouve en général une série de raies ou de bande d'absorption dont la position, l'intensité, la largeur et la forme vont se révéler précieuse pour le chimiste, c'est ce que l'on appelle un spectre.

II.4.1. Classification :

- Selon phénomène mis en jeu :** Absorption ou Emission
- Nature de la matière :** Atomique ou moléculaire
- Domaine du spectre :** Rx, UV-Vis , IR, ...

- **Nature de transitions :** Electronique ,Vibration, Rotation

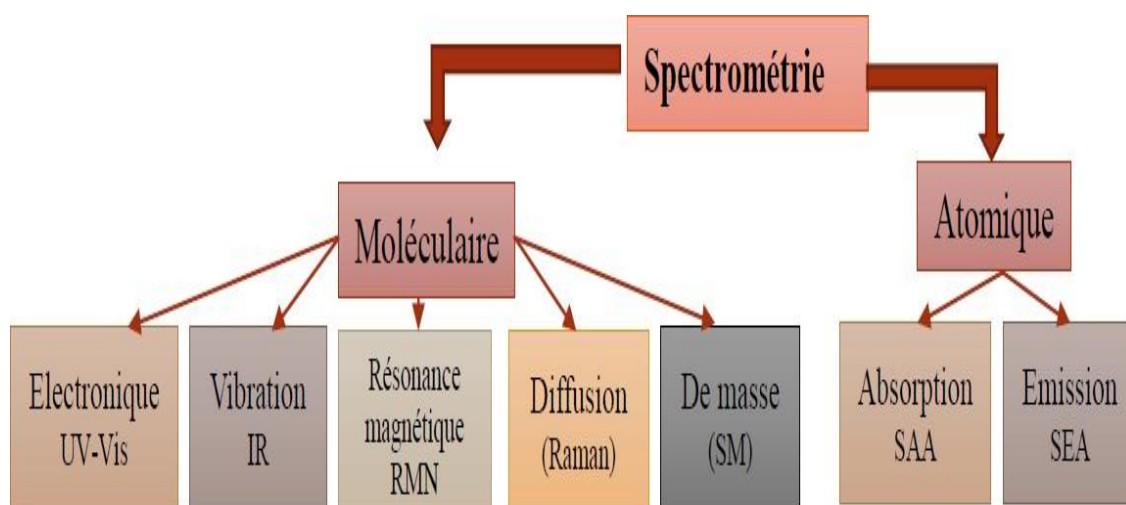


Figure 04. Classification des techniques spectrales selon la nature de la matière et le phénomène mise en jeu

II.5. Types des spectroscopies :

Les principaux types de spectroscopie utilisé sont:

II.5.1. Spectroscopie UV-visible:

Basée sur l'absorption d'une énergie élevée ($\lambda = 200 - 800$ nm) permettant aux électrons de valence des atomes et des molécules de passer d'un état fondamental à un état excité (transitions électroniques).

II.5.2. Spectroscopie infrarouge (IR):

Fait intervenir une énergie plus faible ($\lambda = 1 - 100$ cm) ne permettant que des transitions vibrationnelles ou rotationnelles au sein de molécules. C'est-à-dire que ces radiations permettent notamment à des liaisons covalentes d'atteindre des modes de vibration d'énergie plus élevée.

II.5.3. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN):

Elle utilise les ondes radios (très peu énergétiques) qui ne permettent que des transitions d'états de spin des noyaux des atomes.

II.6. Applications des techniques spectrales:

La spectrophotométrie est utilisée dans divers domaines : chimie, pharmacie, environnement, agroalimentaire, biologie etc..., aussi bien au laboratoire que sur site industriel.

Exemple : Dans l'industrie pharmaceutique, de nombreux dosages de médicaments sont réalisés par spectrophotométrie d'absorption UV-VIS.

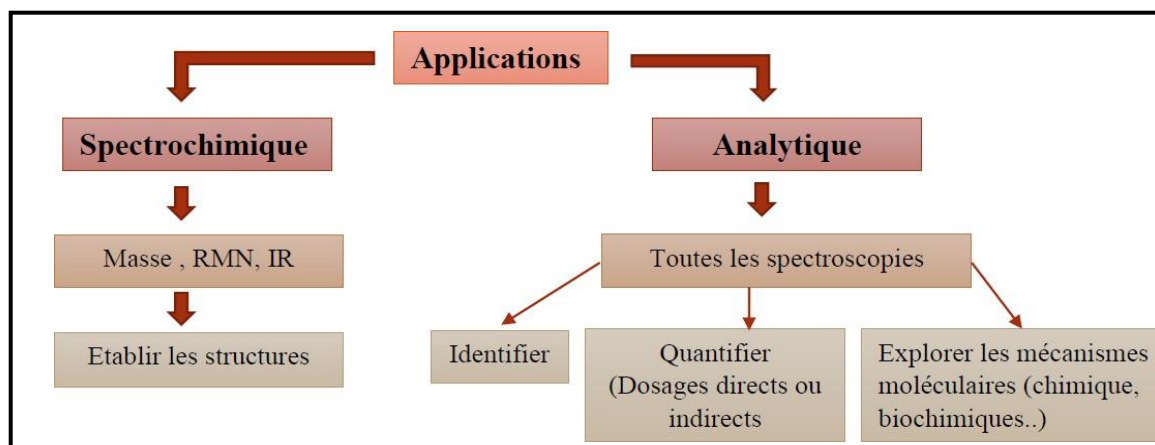


Figure 05 . Différentes applications des techniques spectrales

Chapitre VI

La Spectroscopie

UV-Visible

III. La Spectroscopie UV-Visible

III.1. Définition :

La spectroscopie UV-Vis est une technique analytique qui mesure la quantité de longueurs d'onde discrètes de lumière UV ou visible qui sont absorbées ou transmises à travers un échantillon par rapport à un échantillon de référence ou à blanc. Cette propriété est influencée par la composition de l'échantillon, fournissant potentiellement des informations sur ce qu'il y a dans l'échantillon et à quelle concentration. Étant donné que cette technique de spectroscopie repose sur l'utilisation de la lumière, considérons d'abord les propriétés de la lumière.

La lumière a une certaine quantité d'énergie qui est inversement proportionnelle à sa longueur d'onde. Ainsi, les longueurs d'onde plus courtes de la lumière transportent plus d'énergie et les longueurs d'onde plus longues transportent moins d'énergie. Une quantité spécifique d'énergie est nécessaire pour promouvoir les électrons d'une substance à un état d'énergie plus élevé que nous pouvons détecter comme absorption. Les électrons dans différents environnements de liaison dans une substance nécessitent une quantité d'énergie spécifique différente pour promouvoir les électrons à un état d'énergie plus élevé.

C'est pourquoi l'absorption de la lumière se produit pour différentes longueurs d'onde dans différentes substances. Les humains sont capables de voir un spectre de lumière visible, d'environ 380 nm, que nous voyons comme violet, à 780 nm, que nous voyons comme rouge.¹ La lumière UV a des longueurs d'onde plus courtes que celle de la lumière visible jusqu'à environ 100 nm. Par conséquent, la lumière peut être décrite par sa longueur d'onde, ce qui peut être utile en spectroscopie UV-Vis pour analyser ou identifier différentes substances en localisant les longueurs d'onde spécifiques correspondant à l'absorbance maximale

La spectroscopie UV-Visible permet d'accéder qualitativement à des renseignements quant à la nature des liaisons présentes au sein de l'échantillon mais également de déterminer quantitativement la concentration d'espèces absorbant dans ce domaine spectral. Non destructive et rapide, cette spectroscopie est largement répandue en travaux pratiques de chimie ainsi qu'en analyse chimique ou biochimique .

III.2. Principe :

Dans une molécule, les transitions électroniques UV-visibles mettent en jeu les énergies les plus importantes de la chimie (160 à 665 kJ·mol⁻¹). L'ordre de grandeur des énergies mises en jeu est celui des énergies de liaison des molécules et ces rayonnements peuvent parfois provoquer des ruptures de liaisons. Plus généralement, ils provoquent des transitions électroniques entre les différents niveaux d'énergie des molécules.

L'absorption de photons se traduit par des transitions d'électrons engagés dans les orbitales moléculaires (les électrons des liaisons σ et π ainsi que les non liants n) de l'état fondamental et les niveaux non occupés des états excités (σ^* et π^*). Chaque transition est caractérisé à la fois par sa longueur d'onde λ_{\max} et par son coefficient d'absorption molaire : ϵ_{\max} à cette longueur d'onde

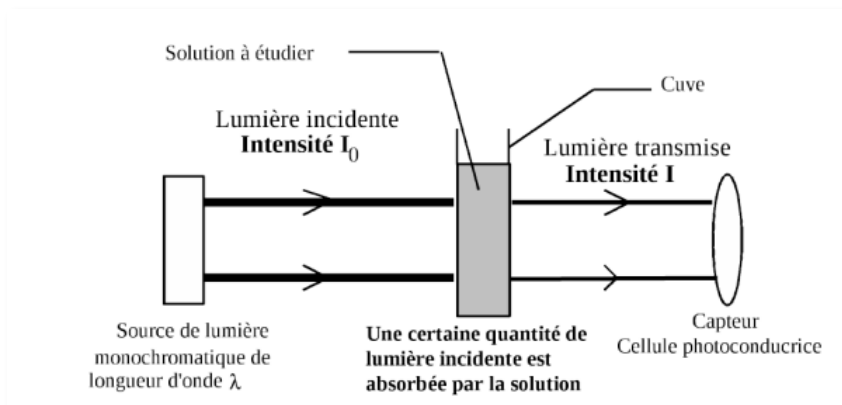


Figure 02 : Schéma montrant le principe du système UV-Vis.

III.3. Domaine spectral :

Dans une molécule, les transitions électroniques ont lieu dans la région de l'ultraviolet (400-10 nm environ) et du visible (800-400 nm).

- visible : 800 nm - 400 nm.
- proche-UV : 400 nm - 200 nm
- UV-lointain : 200 nm - 10 nm. Domaine UV utilisable en analyse : 190 –400 nm.

Donc le lointain UV n'est pas accessible aux mesures de ces conditions. Domaine visible utilisable en analyse : 400 –800 nm

III.3.1. Propriétés des UV

210-280nm propriétés bactéricide (désinfection) UV-C. 280-315nm favorise la production de la vitamine D qui est anti rachitique (assimilation du Calcium) UV-B. 315-400nm favorise la pigmentation de la peau UV-A.

III.3.2. Règle de sélection :

Une transition électronique est analysée comme un changement de population entre une orbitale moléculaire fondamentale occupée et une orbitale moléculaire excitée vacante. Mais toutes les transitions énergétiquement possibles ne sont pas permises [8].

Les règles de sélection déterminent si une transition est permise (active) ou interdite (inactive).

Les Transitions sont permise si :

-L'énergie du photon est égale à la différence d'énergie entre le terme fondamental et un terme excité

-Elles provoquent une variation du moment dipolaire électrique.

III.4. Les différents types de transition :

Les types d'électrons rencontrés : σ , π et n.

Les électrons σ : Caractérise les liaisons saturées (fortement liées)

Les électrons π : Caractérise les liaisons insaturées (faiblement liées)

Les électrons n : doublet non liant.

Pour des orbitales de type σ , π et n: Transitions électroniques : passage des électrons des orbitales moléculaires liantes ou non liantes remplies, vers des orbitales moléculaires anti liantes non remplies

III.4.1. La transition $\sigma \rightarrow \sigma^*$:

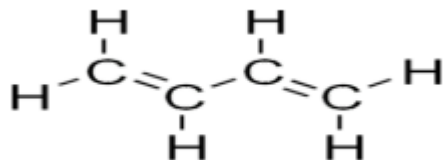
La grande stabilité des liaisons σ des composés organiques fait que la transition d'un électron d'une OM liante σ vers une OM antiliante σ^* demande beaucoup d'énergie. La bande d'absorption correspondante est intense et située dans l'UV-lointain, vers 130 nm.

III.4.2. La transition $n \rightarrow \sigma^*$:

Le transfert d'un électron du doublet n d'un hétéroatome (O, N, S, Cl..) à un niveau σ^* est observé pour les alcools, les éthers, les amines ainsi que pour les dérivés halogénés. Cette transition donne une bande d'intensité moyenne qui se situe à l'extrême limite du proche-UV. Exploitable par les appareils usuels si $\lambda \geq 200\text{nm}$.

III.4.3. La transition $\pi \rightarrow \pi^*$:

Exploitable selon la structure de la molécule (pour $\lambda > 200\text{nm}$). Elles apparaissent dans le spectre des molécules conjuguées (Butadiène, hexadiène).



Elles portent le nom de Bande K. K: Konjugierte (allemand). Le coefficient d'absorption molaire est élevé ($\epsilon > 10\ 000$).

III.4.4. La transition $n \rightarrow \pi^*$:

Cette transition résulte du passage d'un électron d'une OM non-liante n à une OM antiliante π^* . Elle s'observe pour les molécules contenant un hétéroatome porteur de doublets électroniques libres (n) appartenant à un système insaturé. Elles ont leur origine dans les groupements tels que ; (C=O ; N=O ; N=N ; etc)

Le coefficient d'absorption molaire est généralement faible ($\epsilon < 100$).

On les appelle Bande R (Radicalaire)

Il existe également d'autres bandes :

Bandes B (Benzénoïdes) :

- Elles sont également dues à une transition électronique $\pi \rightarrow \pi^*$.
- Elles apparaissent dans les spectres de molécules aromatiques ou hétéroaromatiques.

Bandes E (Ethylniques) :

- Elles sont également dues à une transition électronique $\pi \pi^*$.
- Elles apparaissent dans les spectres de molécules aromatiques.
- Elles ne dépassent rarement 210nm.
- ϵ max varie entre 2 000 et 14 000.

III.5. Loi d'absorption de la lumière-Loi de Beer-Lambert :

Soit une lumière monochromatique traversant une solution absorbante de concentration C contenue dans une cuve d'épaisseur l. Une partie de ce rayonnement sera absorbée par l'échantillon et une partie sera transmise.

De manière générale, l'absorption est bien représentée par la loi de Beer et Lambert :

$$A_\lambda = -\log_{10} \left(\frac{I}{I_0} \right) = \epsilon_\lambda l c$$

I_0 : est l'intensité de la lumière incidente.

I : intensité transmise.

l : est la distance traversée par la lumière (largeur de la cuve en cm).

C : est la concentration molaire.

Le terme: $\log(I_0/I)$ est appelé absorbance (A) ou densité optique.

$I/I_0 = T$ est la transmission (% T est la transmittance)

ϵ : est le coefficient d'extinction molaire ; Il dépend de la température, de la nature de la substance et enfin de la longueur d'onde.

L'unité de ϵ est en $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ quand on parle de coefficient d'absorption molaire et $l \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$ quand on parle de coefficient d'absorption spécifique.

On écrit la loi sous la forme :

$$A = -\log T = \epsilon lc$$

III.5.1. Condition d'utilisation de la loi de Beer et Lambert:

- La lumière doit être monochromatique.
- Les solutions doivent être diluées (Concentration faibles).
- Les solutions utilisées ne doivent pas être colloïdales. (homogène) Ce qui éviterait les pertes de rayonnement par réflexion ou diffusion.

❖ Applications de la loi de Beer-Lambert :

Cette loi est utilisée pour de nombreux dosages d'espèces chimiques colorés. Pour des composés incolores, il est parfois possible de fabriquer des complexes colorés. Cette loi n'est valable que pour les faibles concentrations est en général pour des absorbances inférieures à 1. La loi de Beer-Lambert est également utilisée dans certains détecteurs comme ceux utilisés en HPLC.

III.5.2. Additivité de la loi de Beer-Lambert

Si l'on a un mélange de substances C1, C2, C3,...,Cn et que celui-ci est traversé par un rayonnement monochromatique, alors la DO totale du mélange est égale à la somme des densités optiques partielles dues à chaque substance:

$$(DO)_T = (DO)_1 + (DO)_2 + (DO)_3 + \dots + (DO)_n$$

$$(DO)_T = \epsilon_1 C_1 l + \epsilon_2 C_2 l + \epsilon_3 C_3 l + \dots + \epsilon_n C_n l$$

III.6. Spectre d'absorption UV/Visible :

En UV/Visible on peut représenter $T=I/I_0=f(\lambda)$ ou $A=f(\lambda)$ ou $\epsilon=f(\lambda)$

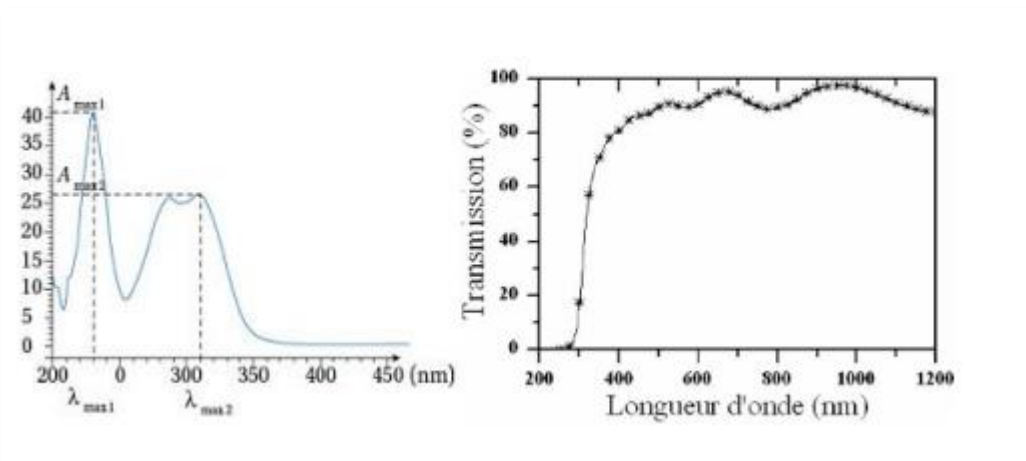


Figure 03 : exemple de spectre d'absorption

Le minimum de transmission correspond au maximum de l'absorbance. Ce spectre possède deux bandes. Chaque bande est caractérisée par un λ_{\max} (λ_{\max} : Le composé absorbe fortement à cette longueur d'onde).

Remarque : Les spectres UV/Visible fournissent souvent des renseignements insuffisants sur la structure des composés.

- **Le solvant :**

Le choix du solvant est important dans cette technique. Il doit être :

- Inerte vis-vis du soluté.
- Transparent à la longueur d'onde utilisée.

Quelques exemples de solvant :

Cyclohexane : Transparent au-delà de 210 nm.

Hexane: Transparent au delà de 210 nm.

Eau distillée: Transparent au delà de 200 nm.

Chloroforme: Transparent au delà de 230 nm.

Le solvant doit être débarrassé de toutes ses impuretés avant d'être utilisé.

III.7. Appareillage :

L'étude des absorptions nécessite l'utilisation d'un appareil appelé spectromètre. La figure suivante représente le schéma de principe d'un spectromètre d'absorption UV- visible à mono faisceau.

On dissout la substance à analyser dans un solvant et la solution obtenue est versée dans une cuve destinée à être placée dans le spectromètre. Afin de ne pas fausser les mesures la cuve et le solvant choisis ne doivent pas absorber les rayonnements émis par le spectroscopie.

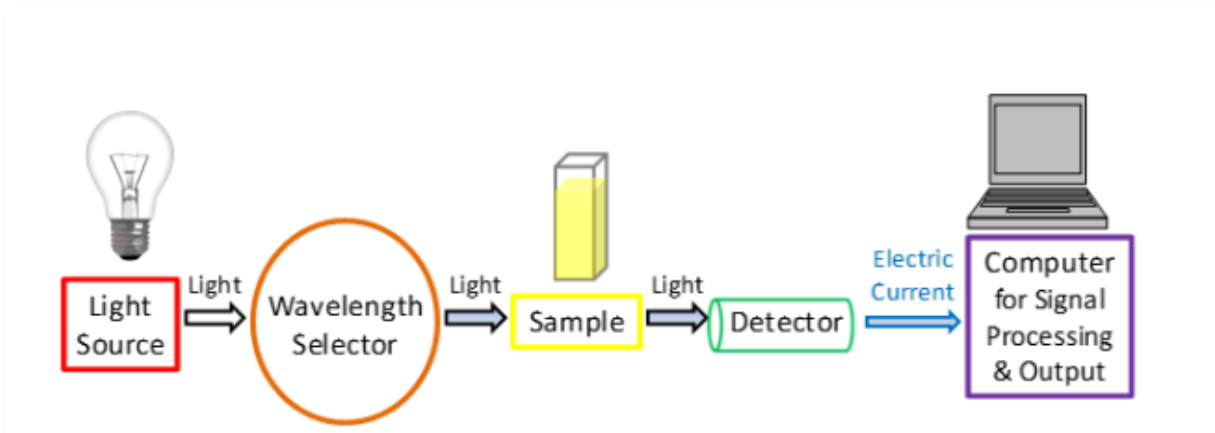


Figure 04 : Un schéma simplifié des principaux composants d'un spectrophotomètre UV-Vis.

III.7.1. Source : En tant que technique basée sur la lumière, une source stable capable d'émettre de la lumière sur une large gamme de longueurs d'onde est essentielle. Une seule lampe au xénon est couramment utilisée comme source de lumière à haute intensité pour les plages UV et visible. Les lampes au xénon sont cependant associées à des coûts plus élevés et sont moins stables par rapport aux lampes au tungstène et aux halogènes.

Pour les instruments utilisant deux lampes, une lampe au tungstène ou halogène est couramment utilisée pour la lumière visible, tandis qu'une lampe au deutérium est la source commune de lumière UV. Comme deux sources lumineuses différentes sont nécessaires pour balayer à la fois les longueurs d'onde UV et visible, la lumière source dans l'instrument doit changer pendant la mesure. En pratique, cette commutation se produit généralement pendant le balayage entre 300 et 350 nm où l'émission lumineuse est similaire des deux sources lumineuses et la transition peut être effectuée plus en douceur.

III.7.2. Monochromateur : Un monochromateur sépare la lumière en une bande étroite de longueurs d'onde. Il est le plus souvent basé sur des réseaux de diffraction qui peuvent être tournés pour choisir les angles entrants et réfléchis afin de sélectionner la longueur d'onde de lumière souhaitée. La fréquence de sillon du réseau de diffraction est souvent mesurée en nombre de sillons par mm. Une fréquence de sillon plus élevée fournit une meilleure résolution optique mais une plage de longueurs d'onde utilisable plus étroite. Une fréquence de rainure inférieure fournit une plage de longueurs d'onde utilisable plus grande mais une moins bonne résolution optique. 300 à 2000 rainures par mm sont utilisables à des fins de spectroscopie UV-Vis, mais un minimum de 1200 rainures par mm est typique. La qualité des mesures spectroscopiques est sensible aux imperfections physiques du réseau de diffraction et du montage optique. Par conséquent, les réseaux de diffraction réglés ont tendance à avoir plus de défauts que les réseaux de diffraction holographiques blazés.³ Les réseaux de diffraction holographiques blazés ont tendance à fournir des mesures de bien meilleure qualité.

III.7.3. Détecteur : Le détecteur convertit en un signal électrique l'intensité de la radiation lumineuse qui l'atteint. Sa sensibilité dépend de la longueur d'onde. On utilise soit un tube photomultiplicateur soit un semi-conducteur (détecteur à transfert de charge ou photodiode au silicium). Pour les appareils dits « simultanés » qui ne possèdent pas de monochromateur mais un système dispersif, on mesure les intensités lumineuses à toutes les longueurs d'onde pratiquement au même instant en alignant un grand nombre de détecteurs quasi ponctuels pour former une barrette de diodes. Le seuil photoélectrique, de l'ordre de 1 eV, permet de prolonger la plage de détection jusqu'à 1,1 mm.

L'efficacité d'un tube photomultiplicateur-dispositif très sensible dont la linéarité de la réponse s'étend sur 7 décades, dépend du rendement de la photocathode, qui varie avec la longueur d'onde (par ex. $0,1 e^-/\text{photon}$ à 750 nm), et de l'amplification du signal procuré par la cascade de dynodes (par exemple gain de 6×10^5).

Avec ces valeurs, l'impact de 10 000 photons/s produit un courant de 0,1 nA. Il est difficile pour un photomultiplicateur comme cela le serait pour l'oeil, de comparer avec précision deux intensités lumineuses, en provenance pour l'une, du faisceau de référence et pour l'autre, du faisceau échantillon, lorsqu'elles sont très différentes. C'est pourquoi il est préférable que l'absorbance des solutions ne dépasse pas 1. Avec un instrument dont la lumière parasite est de 0,01 % (mesurée en % de transmittance), l'augmentation de la concentration de la solution ne produira plus de variations significatives du signal au-delà de 4 unités d'absorbance.

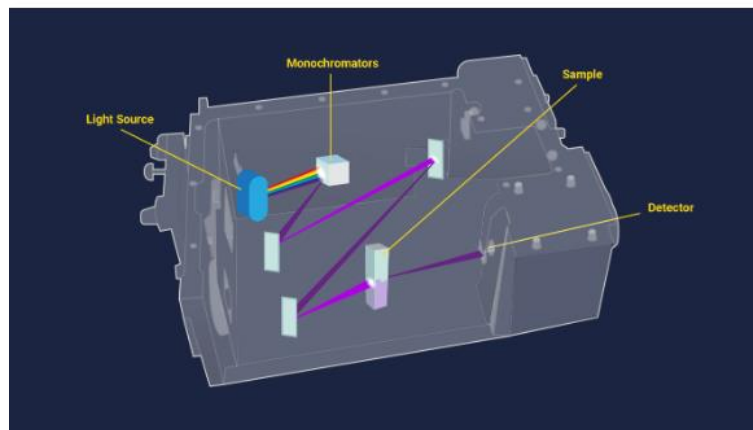


Figure 05 : Schéma de principe d'un système de spectroscopie UV-Vis à cuvette.

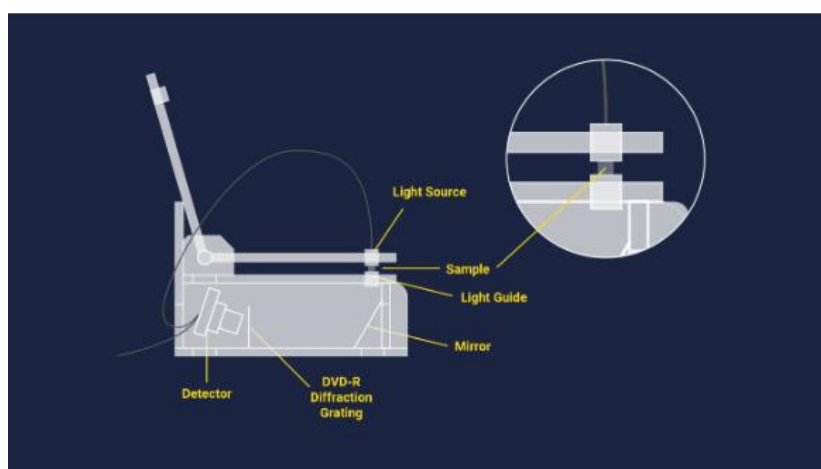


Figure 06 : schéma d'un système de spectroscopie UV-Vis sans cuvette.

III.8. Intérêts de la spectroscopie UV-Visible :

- Large domaine d'applications (Chimie analytique, minérale, organique, biochimie) ,90% des analyses médicales
- analyses quantitatives (loi de Beer-Lambert)
- grande sensibilité : limite de détection $\approx 10^{-5}$ M
- précision : 1 - 5% erreur.
- simplicité, rapidité.

III.9. Application de la spectroscopie UV/Visible

III.9.1. Analyse qualitative

Les spectres UV fournissent généralement peu de renseignements sur la structure moléculaire des composés comparés aux spectres IR et RMN. Néanmoins, on les utilise soit pour une confirmation soit pour une identification grâce aux règles empiriques.

III.9.2. Analyse quantitative

L'analyse quantitative par la spectrométrie UV-visible est très employée (beaucoup plus que l'analyse qualitative) grâce à l'utilisation de la loi de Beer-Lambert.

Comme applications, on peut citer :

- Le dosage d'impureté dont l'identité est connu.
- Le dosage d'un principe actif d'un médicament.
- Le dosage des métaux de transition par complexométrie.

III.9.3. Analyse industrielle et pharmaceutique :

L'une des utilisations les plus courantes de la spectroscopie UV-Vis est dans l'industrie pharmaceutique. En particulier, le traitement des spectres UV-Vis à l'aide de dérivés mathématiques permet de résoudre les pics d'absorbance qui se chevauchent dans les spectres d'origine. pour identifier des composés pharmaceutiques individuels. Par exemple, la benzocaïne, un anesthésique local, et la chlortétracycline, un antibiotique, peuvent être identifiées simultanément dans les formulations de poudres vétérinaires commerciales en appliquant la première dérivée mathématique aux spectres d'absorbance.

Quantification simultanée des deux substances était possible sur une plage de concentration en microgrammes par millilitre en créant une fonction d'étalonnage pour chaque composé.

Cette technique peut également être utilisée dans de nombreuses autres industries.

Par exemple, la mesure d'un indice de couleur est utile pour surveiller l'huile de transformateur en tant que mesure préventive pour s'assurer que l'énergie électrique est fournie en toute sécurité. La

mesure de l'absorbance de l'hémoglobine pour déterminer les concentrations d'hémoglobine peut être utilisée dans la recherche sur le cancer. La spectroscopie UV-Vis peut être utilisée dans les études cinétiques et de surveillance pour s'assurer que certains colorants ou sous-produits de colorants ont été éliminés correctement en comparant leurs spectres au fil du temps.²³ Elle trouve également une grande utilité dans l'analyse de l'authenticité des aliments et la surveillance de la qualité de l'air

Dosage : Le dosage se fait :

a) **Par comparaison à un étalon :** Étalon est une substance dont la concentration est connue.

X : est un échantillon avec une concentration inconnue.

$$\frac{DO_X}{DO_{\text{étal}}} = \frac{(\epsilon \cdot C \cdot l)_X}{(\epsilon \cdot C \cdot l)_{\text{étal}}} \Rightarrow \frac{DO_X}{DO_{\text{étal}}} = \frac{C_X}{C_{\text{étal}}} \Rightarrow C_X = \frac{DO_X}{DO_{\text{étal}}} \times C_{\text{étal}}$$

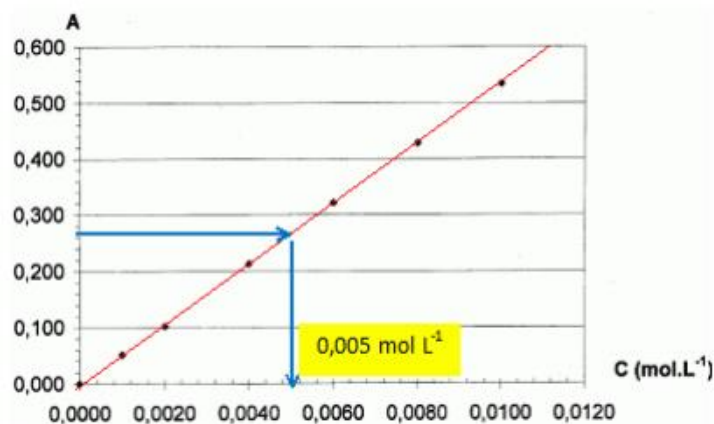
b) **Par comparaison à plusieurs étalons :**

Il suffit de mesurer l'absorbance A de plusieurs étalons :

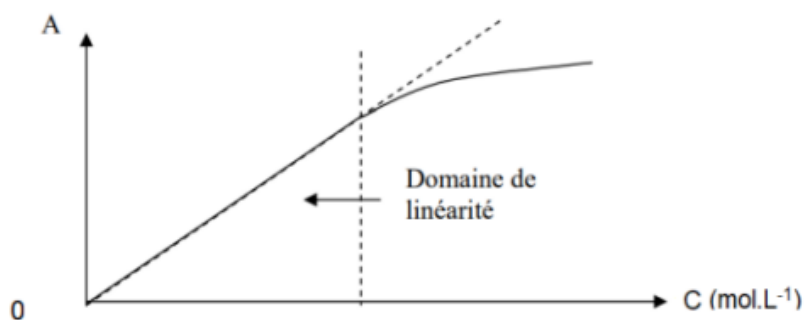
1. Préparer la solution mère de concentration connue.
2. Préparer les solutions filles (étalons).
3. Mesurer l'absorbance de chaque solution filles.
4. Tracer la courbe : $A=DO=f(C)$. (Une droite passant par l'origine).

La concentration C_x est obtenue par interpolation graphique.

Pour ce dosage, on doit choisir une longueur d'onde maximum qui correspond à la plus forte absorption.



Remarque : -Si l'allure du graphe $A=DO=f(C)$ est de la forme suivante :



Ne prendre en considération que la partie linéaire car $A=DO=f(C)$ est toujours linéaire.

Détermination de λ_{\max} par la formule chimique de la molécule :

Plusieurs auteurs ont étudié les spectres d'un grand nombre de molécules, cela a permis d'établir des corrélations entre les structures et les maxima d'absorption. Les plus connues sont les règles de WOODWARD-FIESER et SCOTT concernant en particulier les transitions $\pi-\pi^*$ de certaines fonctions caractéristiques telles que les diènes et les carbonyles [9]. Les tableaux suivants rassemblent, sous forme d'incrément, les divers facteurs et particularités de structure à prendre en compte. La position de bandes d'absorption $\pi-\pi^*$ de ces systèmes conjugués particuliers peut être prévue.

Règles de Woodward-Fieser et Scott :

Ces règles permettent d'estimer λ_{\max} pour des diènes conjugués et également pour les aldéhydes et cétones conjugués

Tableau 01 : les facteurs et les particularités des molécules conjugués.

Structure de base	Parent homoannulaire	Parent hétéroannulaire	Diène acyclique
Valeur de base	253 nm	214 nm	217 nm
			incrément à ajouter (nm)
Double liaison conjuguée supplémentaire			30
Double liaison exocyclique			5
Alkyle ou reste de cycle			5
— O — R			6
— S — R			30
— Cl , — Br			5
— NR ₂			60
— O — CO — R			0

Chapitre V

La Spectroscopie Infra-

Rouge

(IR)

IV. La Spectroscopie Infra-Rouge (IR)

IV.1. Introduction

Les vibrations moléculaires sont à l'origine de l'absorption du rayonnement infrarouge (IR) par la matière, car les niveaux d'énergie moléculaires vibrationnels sont séparés par des énergies qui tombent dans le domaine infrarouge du spectre électromagnétique. La partie infrarouge du rayonnement électromagnétique est partagée en trois domaines : le proche infrarouge (le plus énergétique) qui s'étend de 14 000 à 4000 cm^{-1} (0,7-2,5 μm en longueurs d'onde) ; l'infrarouge moyen qui va de 4000 à 400 cm^{-1} (2,5-25 μm) et enfin l'infrarouge lointain, qui couvre le domaine spectral de 400 à 10 cm^{-1} (25-1000 μm). La mise en œuvre de l'interaction d'un rayonnement infrarouge avec un échantillon, puis la détection et l'analyse spectrale (par transmission ou par réflexion) de ce rayonnement après qu'il ait interagi avec la matière est l'objet de la spectroscopie infrarouge. Cette spectroscopie, très sélective, est couramment utilisée pour l'identification de composés mais elle permet également d'obtenir des informations très importantes sur les interactions inter- et/ou intra- moléculaires, sur la conformation des molécules, sur l'organisation de la matière...

IV.2. Principe de la spectroscopie infra-rouge

IV.2.1. Interaction rayonnement-matière

De nombreux points de cette partie théorique ne sont pas utiles pour pouvoir analyser un spectre infrarouge et peuvent être traités dans la partie « Energie, matière, rayonnement », transferts quantiques d'énergie et dualité onde-corpuscule. Certains points (notés en italique) sont hors programme pour des élèves de TS et sont donnés au titre de l'information. Cette partie permet de justifier que la spectroscopie infrarouge est liée à des niveaux d'énergie vibrationnelle des molécules.

a. Description de la lumière

La lumière se comporte dans certains cas comme une onde électromagnétique

- La lumière est en général la superposition d'ondes électromagnétiques de différentes longueurs d'ondes
- Une lumière monochromatique est une onde sinusoïdale de fréquence bien déterminée.

Grandeurs caractéristiques d'une onde monochromatique dans le vide	
Période en s	Vitesse : c en m. s ⁻¹
Fréquence : $f = 1/T$ en s ⁻¹ (notée ν)	Longueur d'onde : $\lambda = cT = c/\nu$ en m

autre grandeur leur sera utile : le nombre d'onde en cm⁻¹

$$\sigma = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c}$$

La lumière se comporte dans certains cas comme si elle était composée de corpuscules : les photons

Le photon est un corpuscule de masse nulle

Le photon se déplace à la vitesse de la lumière

Le photon transporte un quantum d'énergie $E = h\nu$ avec h la constante de Plank

b. Niveaux d'énergie d'une molécule

L'énergie propre d'une molécule peut en première approximation être décomposée en trois termes indépendants

$$E = E_{el} + E_v + E_r$$

- E_{el} : énergie électronique.

- E_v : énergie vibrationnelle, associée aux mouvements des atomes autour de leur position d'équilibre sans mouvement d'ensemble.

- E_r : énergie rotationnelle, associée aux mouvements de rotation de la molécule autour d'un axe passant par le centre d'inertie.

Toutes ces énergies sont quantifiées et la différence entre deux niveaux électroniques, vibrationnels ou rotationnels ne sont pas du même ordre de grandeur :

$$\Delta E_r \ll \Delta E_v \ll \Delta E_{el}$$

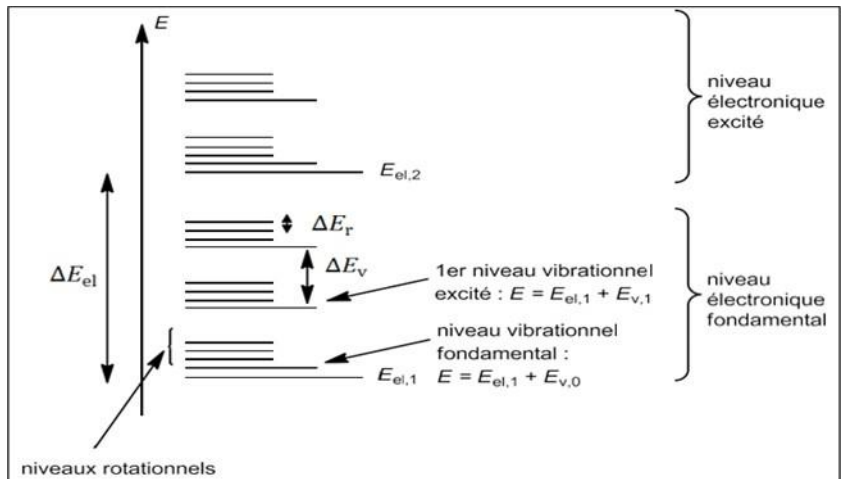


Figure 1 : Niveaux énergétiques

c. Transition de niveaux énergétiques et absorption de rayonnement électromagnétique

Une onde électromagnétique de fréquence peut être absorbée par une molécule qui va ainsi passer d'un niveau énergétique à un autre. L'absorption n'est possible que si l'énergie de l'onde correspond à la différence d'énergie entre les deux niveaux énergétiques :

$$E' - E = h\nu_0 = \frac{hc}{\lambda_0}$$

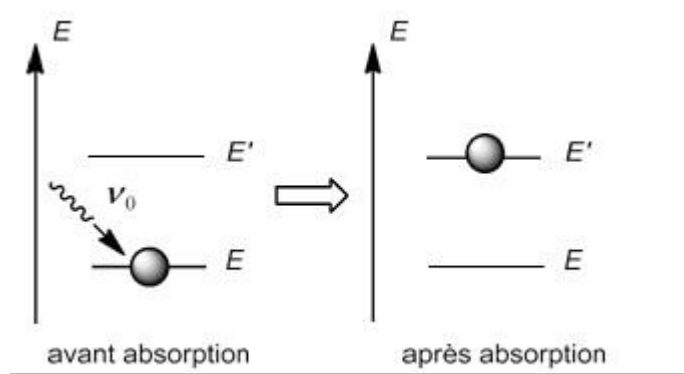


Figure 2 : Absorption de rayonnement électromagnétique

IV.3. Etude des vibrations d'une molécule

Cette partie s'attache à présenter les vibrations possibles d'une molécule. Avec les élèves on pourra se contenter de montrer que les liaisons peuvent vibrer autour de leur position d'équilibre et que pour des composés polyatomiques des modes de vibration existent.

IV.3.1. Molécule diatomique :

Modèle classique : ce modèle peut être présenté aux élèves en parallèle de ce qui est vu en mécanique

On assimile les deux atomes et unit par une liaison covalente à deux masses et qui seraient reliées par un ressort de constante de raideur k . Les masses peuvent osciller autour de leur position d'équilibre avec une fréquence donnée par la loi de Hooke :

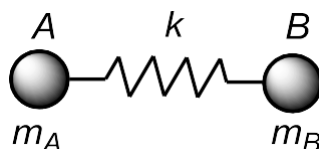


Figure 3 : modélisation de la liaison covalente

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

Lorsque cette molécule diatomique est soumise à l'action d'une onde électromagnétique caractérisée par la fréquence ν , il y a absorption (phénomène de résonance) lorsque

IV.3.2. Molécule poly atomique

La situation est beaucoup plus complexe : les différents oscillateurs constitués de deux atomes liés par une liaison covalente sont couplés. Des simplifications peuvent s'effectuer (la théorie quantique les justifie) : les vibrations complexes d'une molécule peuvent se décomposer en différents modes de vibration indépendants appelés modes normaux.

Types de modes normaux :

- Vibrations d'élongation : Il s'agit de vibrations de valences ayant lieu le long de l'axe de la liaison.
- Vibrations de déformation angulaire: Ce sont des vibrations caractérisées par une modification de l'angle de liaison. Les transitions vibrationnelles de déformation sont de plus faible énergie que les transitions vibrationnelles d'élongation







Vibration d'élongation (de valence)	
 symétrique	 asymétrique
Vibration de déformation	
Dans le plan	Hors du plan
 asymétrique (rotation plane)	 asymétrique (balancement)
 symétrique (cisaillement)	 symétrique (torsion)

Figure 04: les différents types de vibrations

Exemple : CO₂

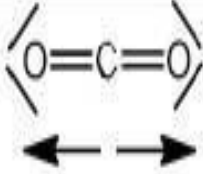
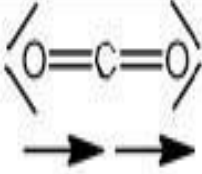
 symétrique il n'y a pas de variation de moment dipolaire qui reste nul : pas d'absorption	 asymétrique il y a variation du moment dipolaire : absorption
---	--

Figure 5 : exemples des modes de vibration d'élongation de CO₂

IV.4. Appareillage

Les spectromètres infrarouges sont construits à partir d'éléments principaux avec quelques différences au niveau de matériaux utilisés ou de leur montage selon le domaine infrarouge exploité et selon le type d'interactions entre la matière et le rayonnement. Il existe deux grands types d'appareils, leurs différences résident essentiellement dans le système de sélecteurs de longueurs d'ondes.

IV.4. 1. Spectromètre dispersif

Ces instruments (figure 6) séparent les fréquences de l'énergie émise à partir de la source infrarouge à l'aide d'un prisme ou de réseaux, éléments dispersifs plus efficace. Le détecteur mesure la quantité d'énergie pour chaque fréquence qui passe à travers l'échantillon. Il en résulte un spectre qui est tracé de l'intensité en fonction du nombre d'ondes. L'inconvénient de ces appareils se situe dans la lenteur des mesures, la complexité mécanique et l'insensibilité.

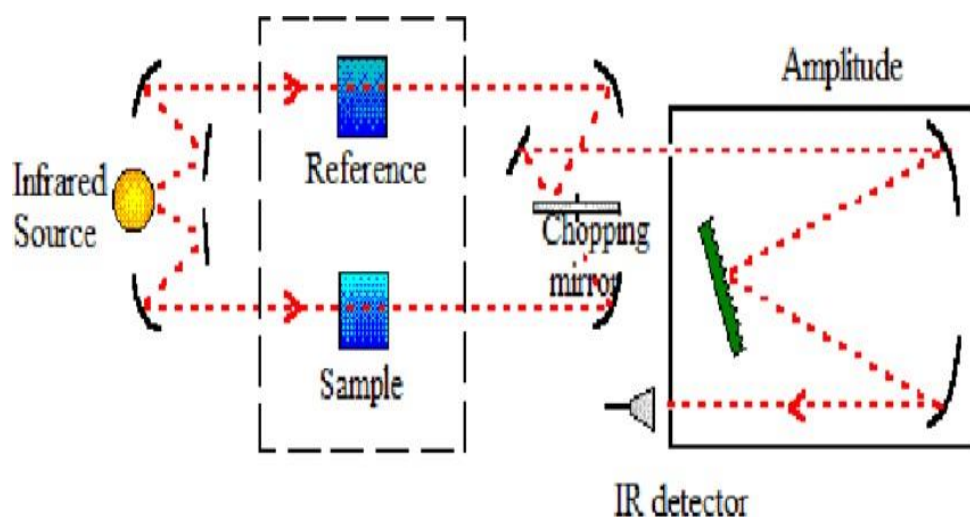


Figure 6 : Schéma du principe d'un spectromètre infrarouge classique dispersif.

IV.4.2. Spectromètre infrarouge à transformée de Fourier

Les spectromètres FT-IR ont été développés pour apporter une réponse aux limitations des spectromètres dispersifs. La difficulté principale à résoudre était celle de la lenteur d'acquisition. Il était indispensable d'imaginer un dispositif mesurant toutes les fréquences simultanément. Le dispositif est l'interféromètre.

a. Mode de fonctionnement du spectromètre à transformée de Fourier

Un spectromètre à transformée de Fourier envoie sur l'échantillon un rayonnement infrarouge et qui mesure les longueurs d'onde absorbées et les intensités de l'absorption. Le faisceau infrarouge provenant de la source est dirigé vers l'interféromètre de Michelson qui va moduler chaque longueur d'onde du faisceau à une fréquence différente.

Dans l'interféromètre le faisceau lumineux arrive sur la séparatrice. La moitié du faisceau est alors dirigée sur le miroir fixe, le reste passe à travers la séparatrice et est dirigé sur le miroir mobile. Quand les deux faisceaux se recombinaient, des interférences destructives ou constructives apparaissent en fonction de la position du miroir mobile. Le faisceau modulé est alors réfléchi des deux miroirs vers l'échantillon, où des absorptions interviennent. Le faisceau arrive ensuite sur le détecteur pour être transformé en signal électrique.

Il comporte essentiellement cinq parties (figure 7) :

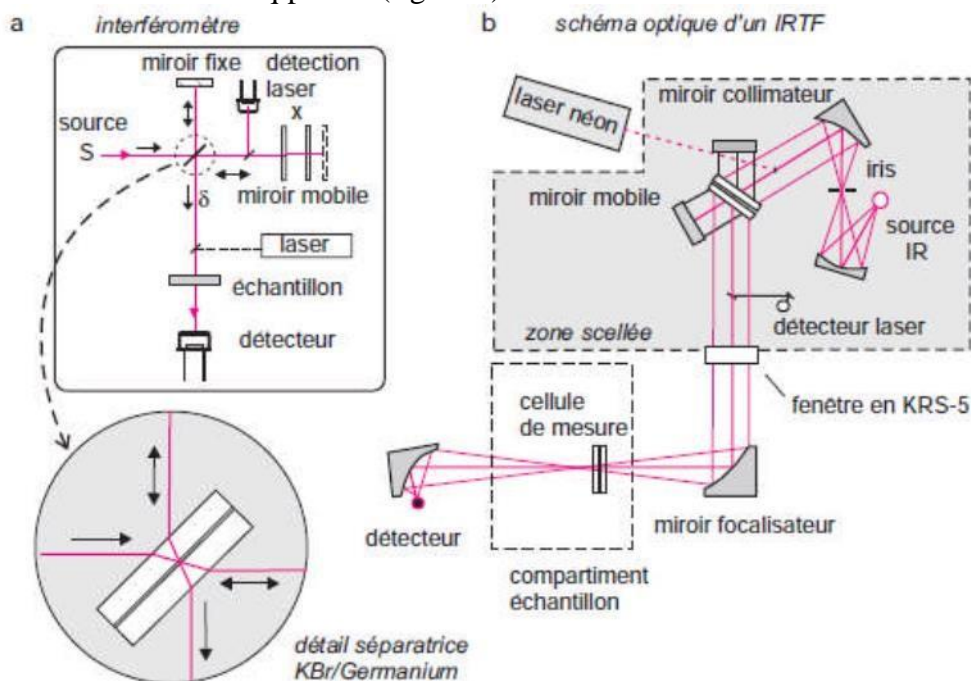


Figure 7 : Montage optique d'un appareil à transformée de Fourier.

- Une source lumineuse
- Un dispositif permettant de générer les interférences
- Un compartiment échantillon qui permet d'accueillir plusieurs types d'accessoires (portes échantillon) dépendant du mode de mesure utilisé (réflexion ou transmission).
- Un détecteur ou capteur photosensible
- Un convertisseur analogique numérique qui interroge le détecteur à des intervalles réguliers et transforme le signal numérique manipulable par le système informatique

IV.5. Présentation de l'échantillon

Il est possible de faire des spectres de solides, de liquides ou de gaz. Suivant l'état de l'échantillon, on utilise soit des pastilles à base de KBr, soit des cuves, soit on dépose une goutte de liquide entre deux lames de KBr. Pour les cellules, il faut choisir un matériau n'absorbant pas en IR : souvent NaCl ou KBr.

IV.5.1. Cas des solides Les pastilles sont généralement faites d'un mélange de l'échantillon (de 0,1 à 1%) sous forme de poudre mélangée à du Bromure de Potassium (KBr) qui est transparent aux rayonnements IR dans la zone 4000 cm^{-1} à 500 cm^{-1} , le tout finement broyé et mélangé dans un mortier de manière à être homogène. Le mélange est pressé à environ 10 tonnes dans une pastilleuse. pour obtenir une pastille. Enfin, il peut être placé en suspension dans une paraffine

Remarque : Il faut noter que tous les solvants possèdent des bandes d'absorption en infrarouge et qu'il est nécessaire de compenser ses bandes par une référence. La compensation n'étant pas toujours parfaite, les solvants utilisés pour les solutions sont choisis pour ne pas présenter de bandes d'absorption dans les zones particulièrement intéressante du spectre. Les plus couramment employés sont le tétrachlorure de carbone, le chloroforme et le sulfure de carbone (CS_2).

IV.5.2. Cas des liquides Les liquides peu visqueux et volatils sont introduits dans une cuve fermée d'épaisseur déterminée dont les fenêtres seront des monocristaux de chlorure de sodium ou de fluorure de calcium (qui a l'avantage de ne pas être altéré par l'eau).. Les liquides visqueux et peu volatils sont déposés entre deux lames de KBr. entre deux pastilles de chlorure de sodium monocristallin comprimées, de manière à obtenir un film fin,

IV.5.3. Cas des gaz Les gaz sont introduits dans une cuve de plus grand volume que celle utilisée pour les liquides.

IV.6. Analyse de spectres et bandes d'absorption classiques

IV.6.1. Allure d'un spectre d'absorption infrarouge

a. Axes

Voici le spectre d'absorption infrarouge de la 5-hydroxypentan-2-one :

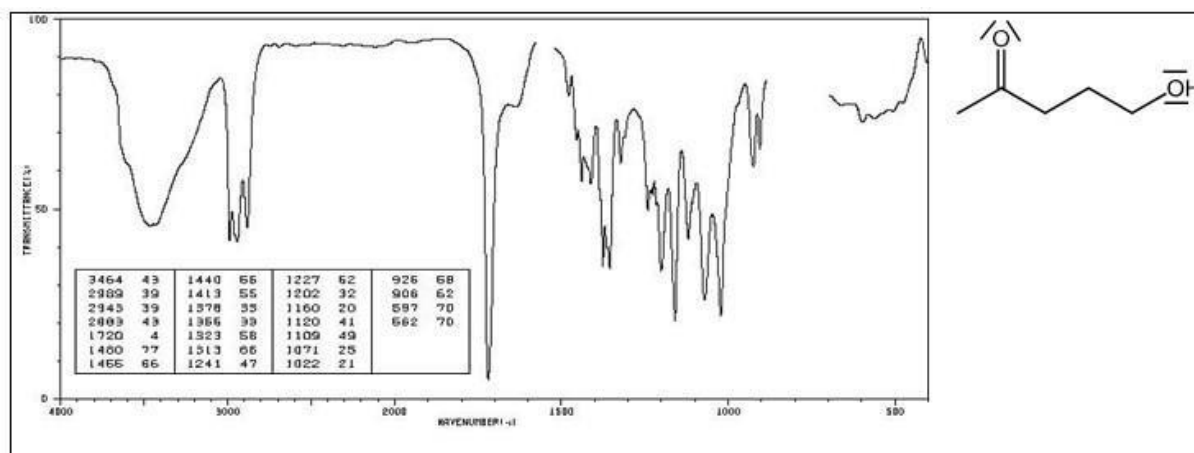


Figure 8 : Exemple de spectre d'absorption IR

- L'axe des abscisses représente le nombre d'onde en cm^{-1} , l'axe est orienté de la droite vers la gauche (de 500 à 4000 cm^{-1})
- L'axe des ordonnées est orienté vers le haut et représente la transmittance en %

b. Zones d'absorption

Il existe deux zones à analyser différemment au sein d'un spectre d'absorption infrarouge.

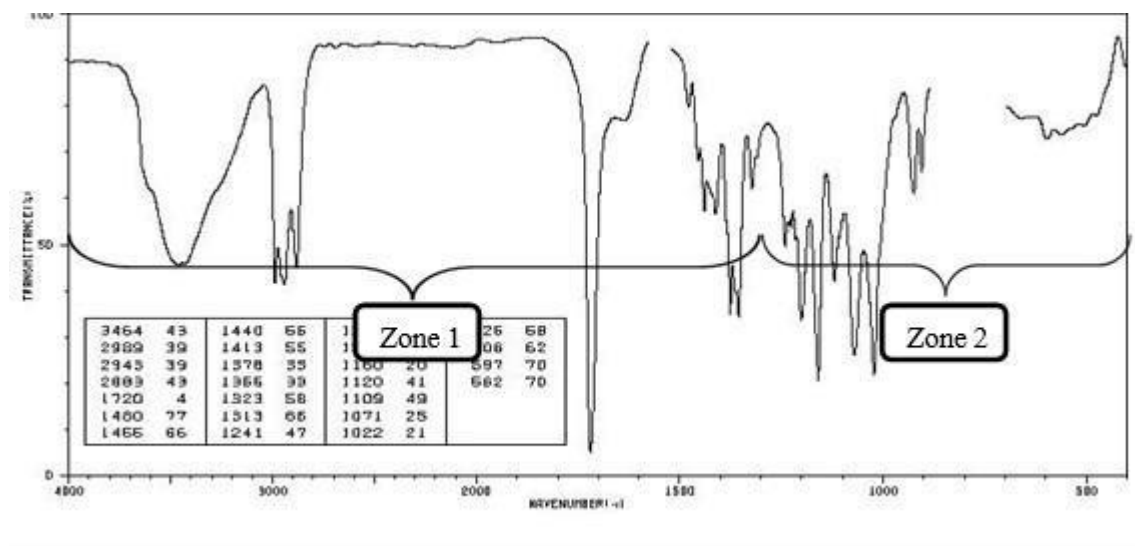


Figure 8 : Exemple de spectre d'absorption IR

- Zone 1 (entre 4000 et 1300 cm^{-1}) : on y trouve la plupart des bandes de vibration d'élongation
- Zone 2 (entre 1300 et 600 cm^{-1}) : on y trouve la plupart des bandes de vibration de déformation (zone souvent difficile à analyser, appelée zone des empreintes digitales)

Tableau 01 : frequences et intensites observees pour divers modes de vibrations

Vibrations	Domaine spectral (cm ⁻¹)	Intensité IR observée
v (O-H)	3650–3000	v
v (N-H)	3500–3300	m
v (\equiv C-H)	3300	F
v (=C-H)	3100–3000	m
v (-C-H)	3000–2800	F
v (C \equiv N)	2255–2220	F
v (C \equiv C)	2250–2100	f
v (C=O)	1820–1680	TF
v (C=N)	1680–1610	m
v (C=C)	1675–1600	m
δ (N-H)	1650–1500	F
v (C=C) aromatique	1620–1450	v
v (N=N) azo	1450–1400	f
δ (CH ₂), δ_a (CH ₃)	1480–1400	m
δ_s (CH ₃)	1380	F-m
v (C-C)	1300–800	m-f
v (C-Cl)	750–600	F
v (C-Br)	650–500	F
v (C-I)	600–450	F

TF : très forte, F : forte, v : variable, m : moyenne, f : faible

IV.6.2. Bandes d'absorption classiques

a. La chaîne carbonée

On peut présenter des molécules qui diffèrent de par leur fonction chimique mais qui possède la même chaîne carbonée, ici l'enchaînement CH₃-CH₂ .

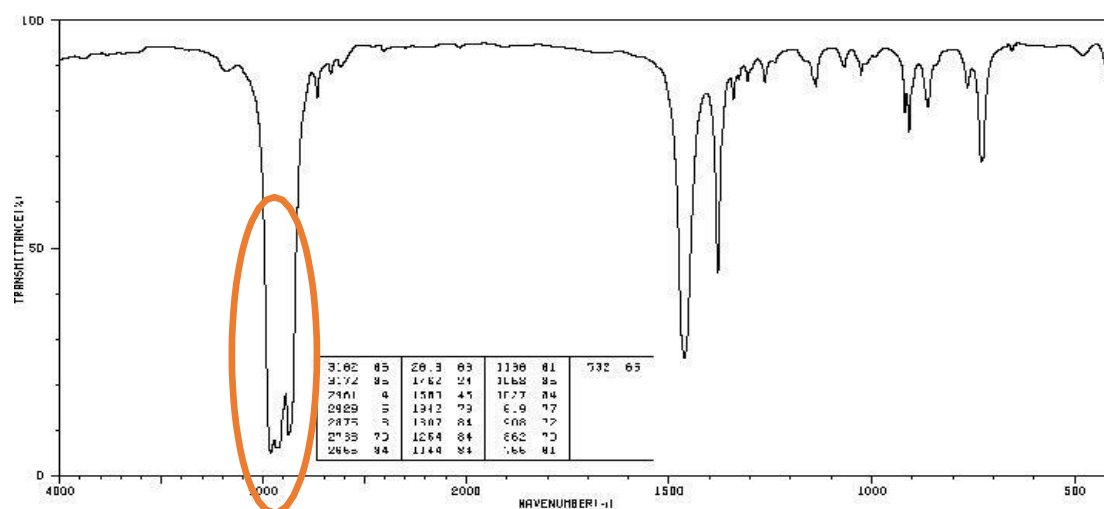


Figure 9 : Spectre d'absorption IR du pentane

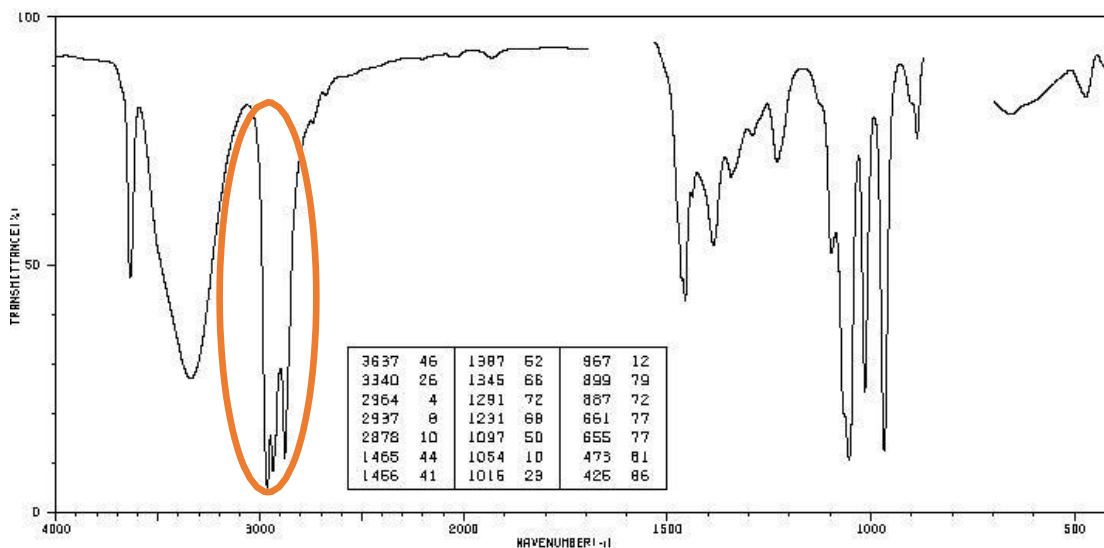


Figure 10 : Spectre d'absorption IR du propan-1-ol

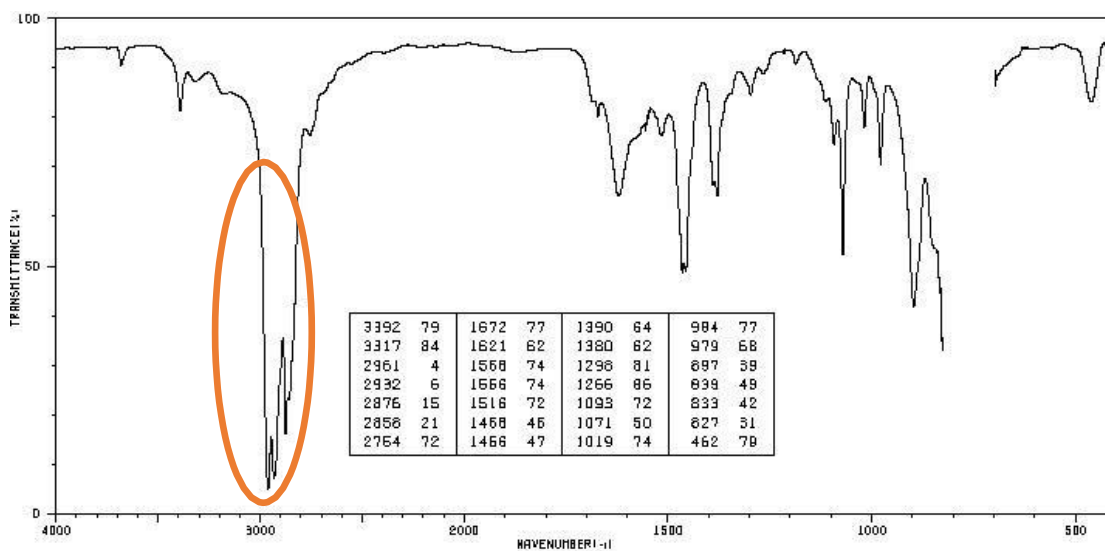


Figure 11 : Spectre d'absorption IR du propan-1-amine

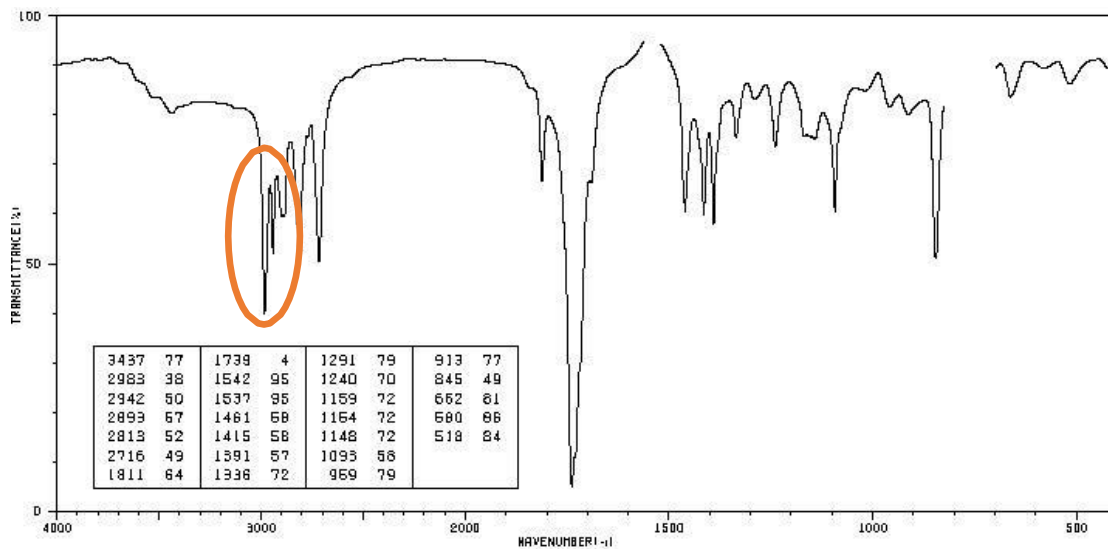


Figure 12 : Spectre d'absorption IR du propanal

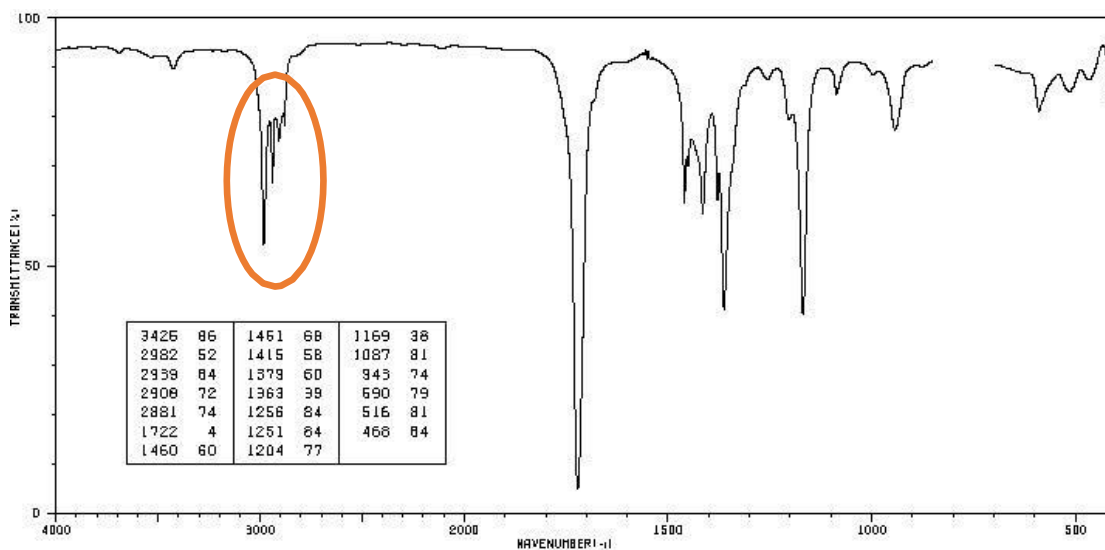


Figure 13 : Spectre d'absorption IR du butan-2-one

IV.6.3. Groupement caractéristique hydroxyle : fonction alcool

On peut présenter le spectre d'un alcane puis différents spectres d'alcools pour identifier les bandes supplémentaires qui leur sont communes

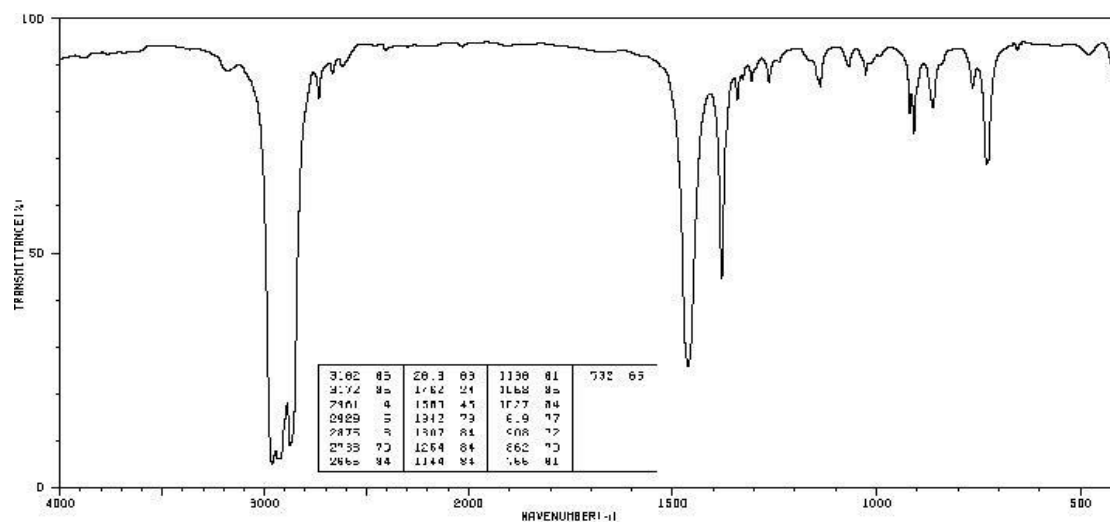


Figure 14 : Spectre d'absorption IR du pentane

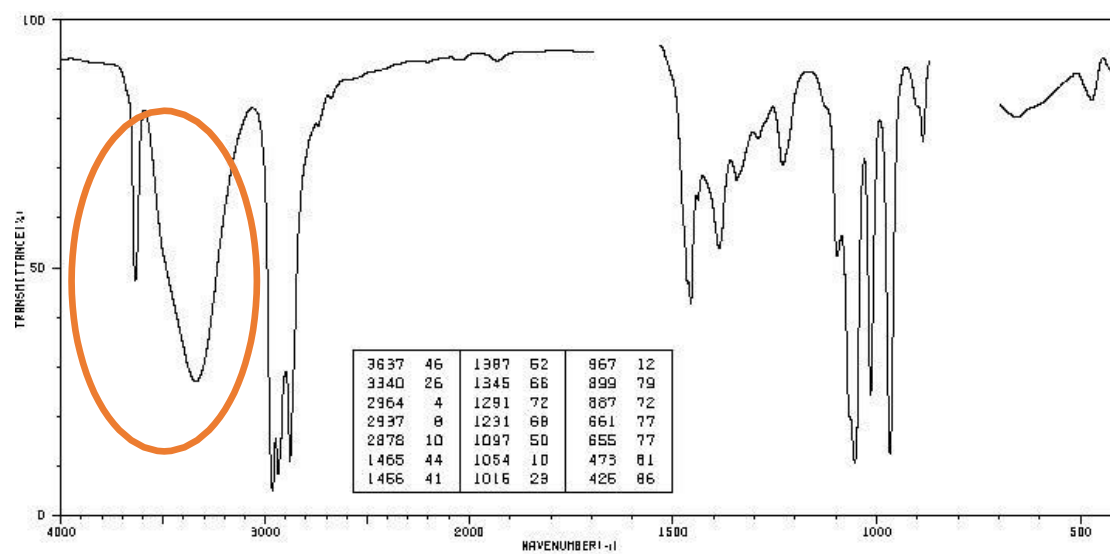


Figure 15 : Spectre d'absorption IR du propan-1-ol

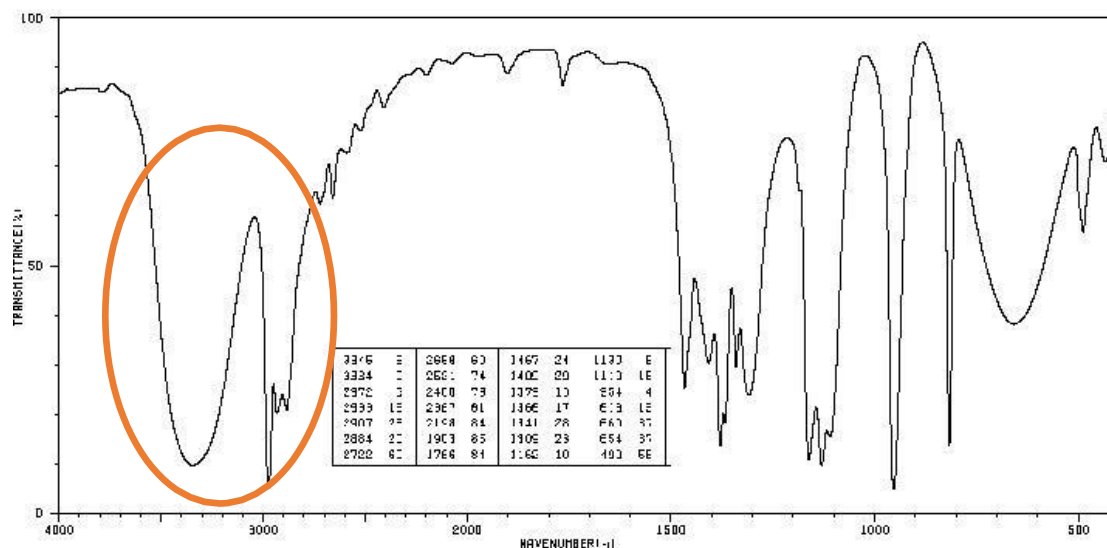


Figure 16 : Spectre d'absorption IR du propan-2-ol 1

Point commun visible à tous les spectres : bande d'absorption très large entre 3000 et 3500 cm^{-1}

Remarque :

Sur le spectre du propan-1-ol on voit apparaître une bande fine au-delà de 3500 cm^{-1} qui correspond à ce que l'on appelle « alcool libre » dans les tables. En effet en l'absence de liaison hydrogène la liaison O-H absorbe à une fréquence relativement précise, d'où une bande fine. En revanche, en présence de liaisons hydrogène la liaison O-H est plus ou moins affaiblie, ce qui a pour conséquence de diminuer la constante de raideur de la liaison et le nombre d'onde du rayonnement absorbé. On observe alors une bande large car le groupement OH de chaque molécule dans l'échantillon à analyser sera plus ou moins lié par liaison hydrogène.

On peut voir apparaître à la fois la bande de l'alcool libre et celle de l'alcool liée sur un même spectre, si l'alcool considéré est très dilué dans l'échantillon à analyser.

b. Groupement caractéristique carbonyle

On peut présenter le spectre d'un alcane puis différents spectres d'aldéhyde puis de cétone.

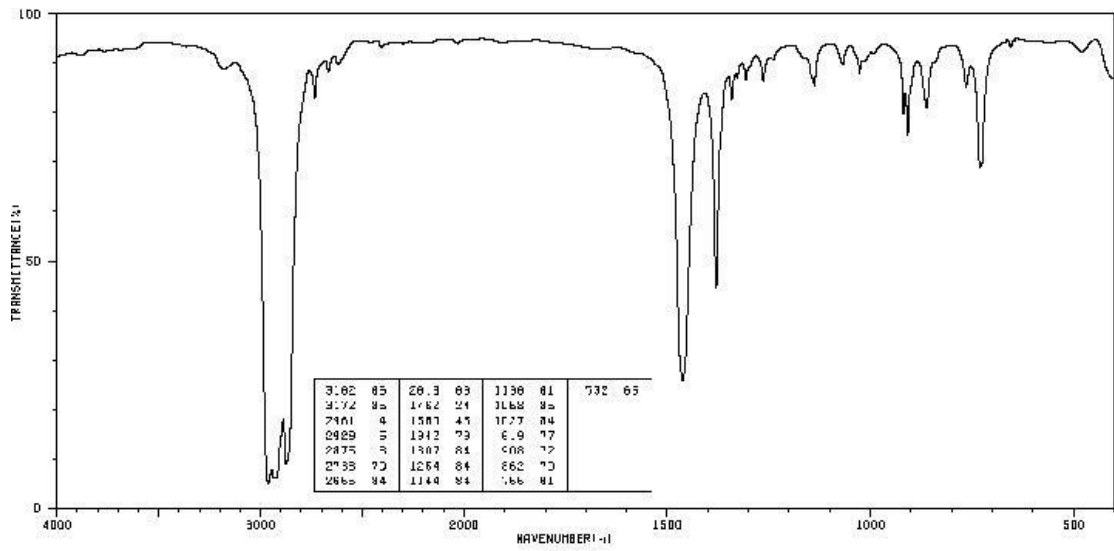


Figure 17 : Spectre d'absorption IR du pentane

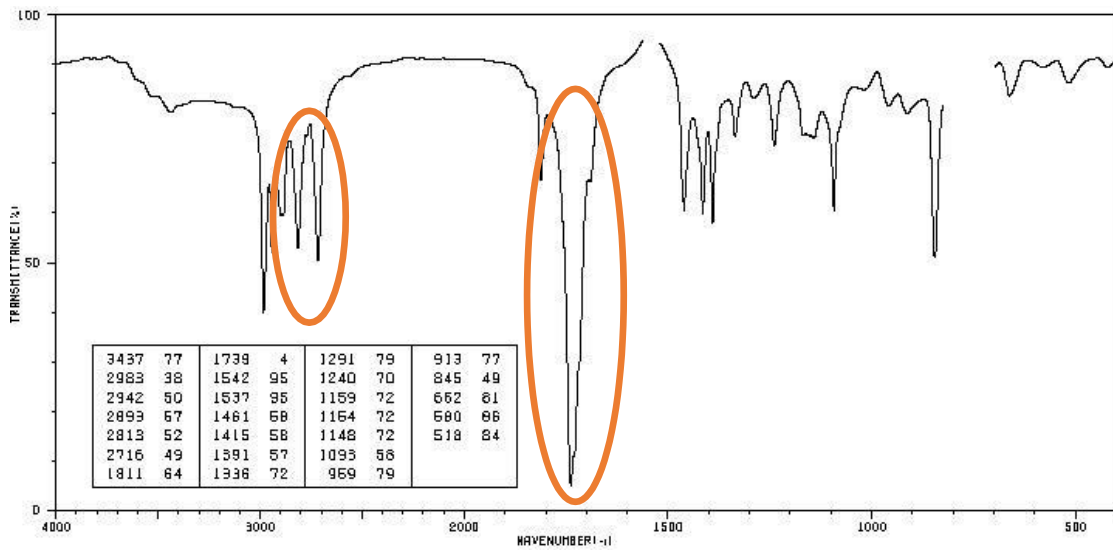


Figure 18 : Spectre d'absorption IR du propanal

c. Groupement caractéristique carboxyle

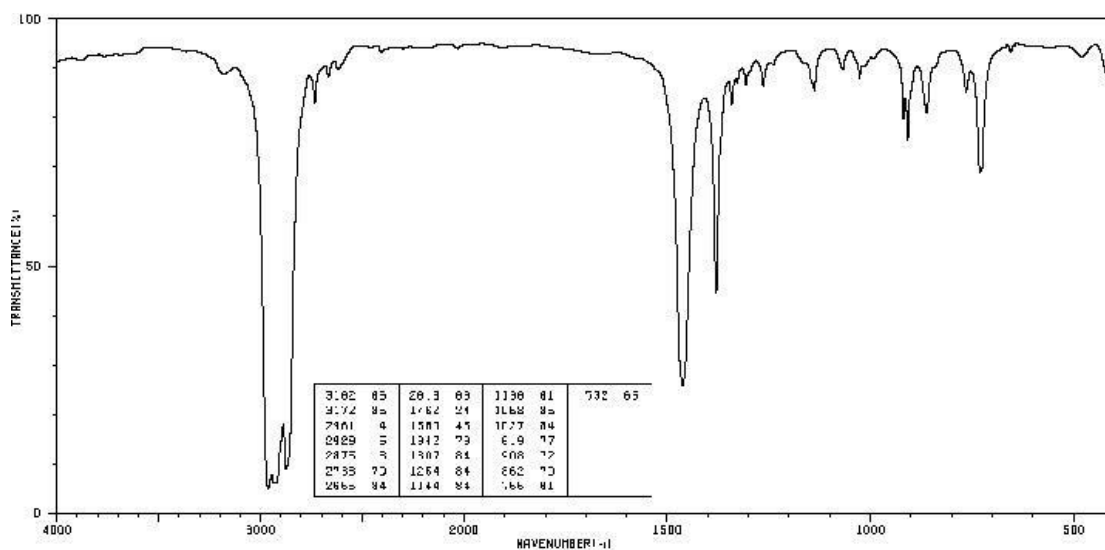


Figure 19 : Spectre d'absorption IR du pentane

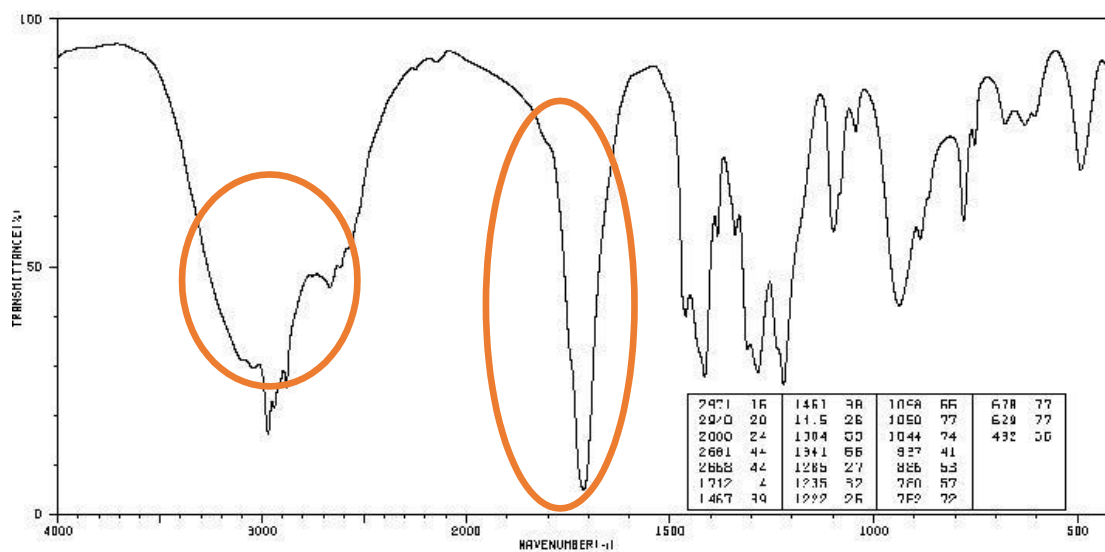


Figure 20 : Spectre d'absorption IR de l'acide butanoïque

d. La double liaison C=C

➤ Alcènes

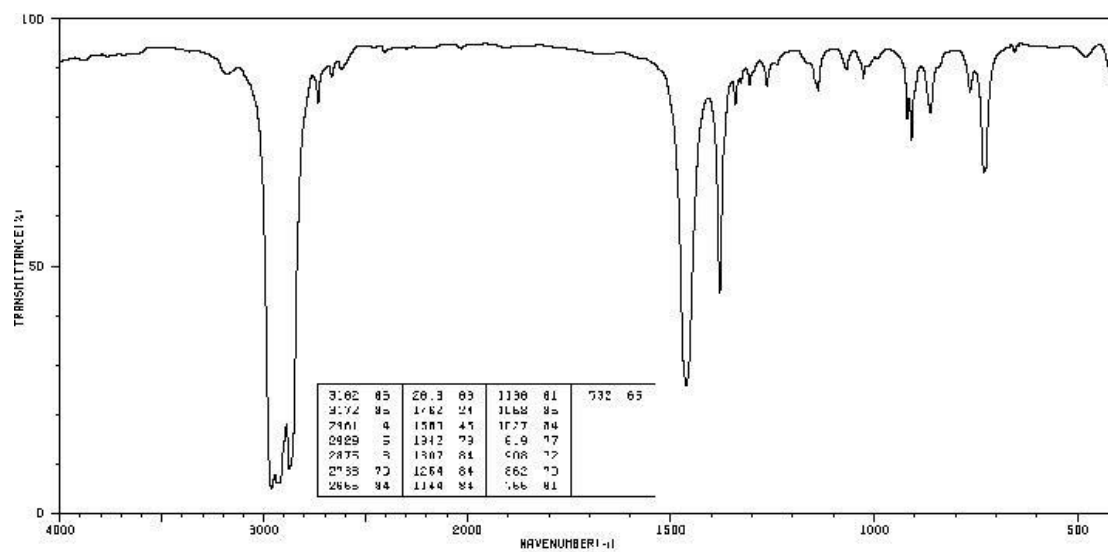


Figure 21 : Spectre d'absorption IR du pentane

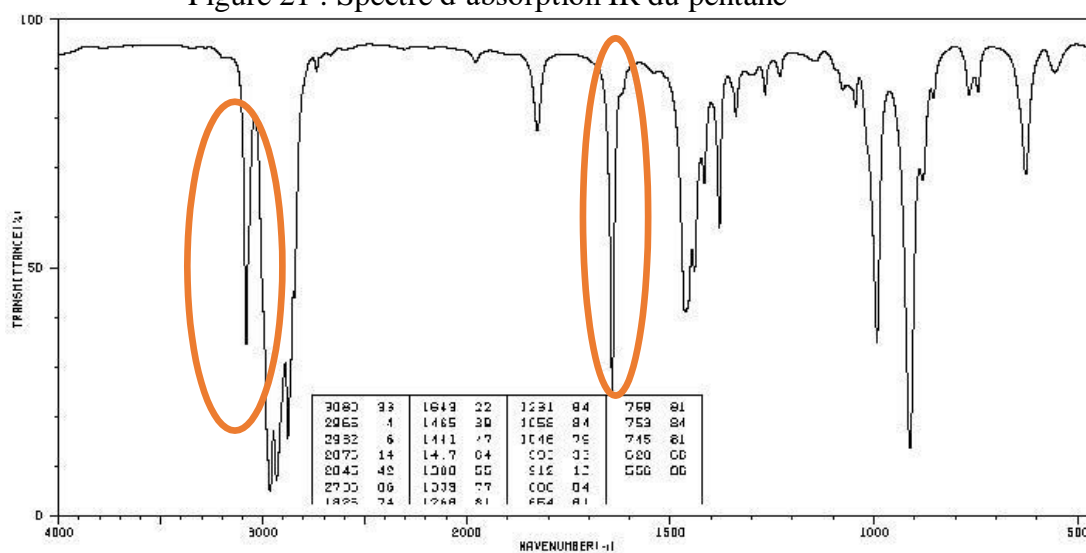


Figure 22 : Spectre d'absorption IR du pent-1-ène

➤ Cycle aromatique

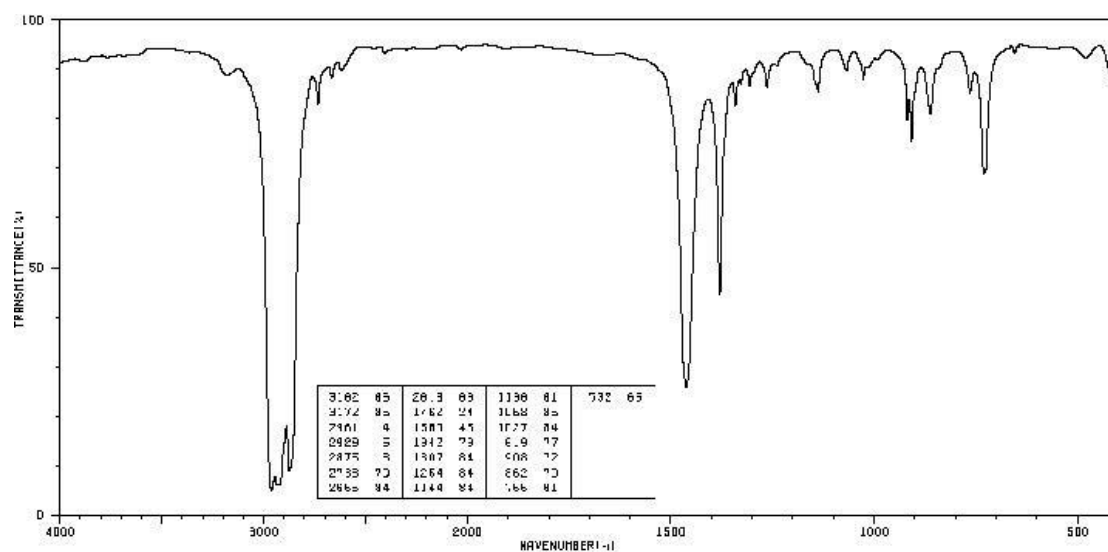


Figure 23 : Spectre d'absorption IR du pentane

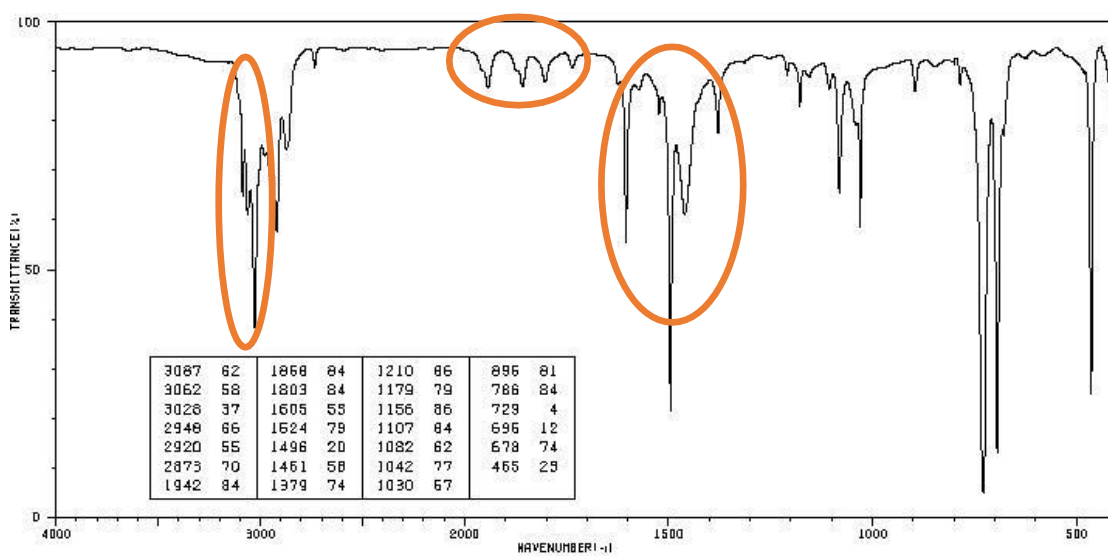


Figure24 : Spectre d'absorption IR du toluène

Références bibliographiques

- 1- Cours « La chromatographie en phase gazeuse (CPG) », Université Ferhat Abbas Sétif -1, Biotechnologie végétale et Amélioration (L3), 2019-2020
<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjYncb8tLD6AhX6gP0HHftzAzoQFnoECBcQAQ&url=https%3A%2F%2Ffs.nv.univ-setif.dz%2Fimages%2Ftelecharger%2FBEV%2FL3%2520BVA%252019-20%2520Analyse%2520instrumentale%2520Chaouchi.pdf&usg=AOvVaw39vyPA3xGf-JSNvXKntvct>
- 2- Académie de Rouen, HPLC Principe et appareillage - Ressources pédagogiques - Biochimie et Bio moléculaire - Publication date: mercredi 20 janvier 2010
https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjGx6SUTrD6AhW1gP0HHUcTB4oQFnoECA4QAw&url=https%3A%2F%2Fbiotech.spip.ac-rouen.fr%2FIMG%2Farticle_PDF%2FHPLC-Principe-et-appareillage_a9.pdf&usg=AOvVaw3qhSdIiRqXtD1Y5F_yvsrZ
- 3- La chromatographie en phase gazeuse (CPG)
https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiZ1bS9trD6AhUPg_0HHZCAA9sQFnoECACQAQ&url=https%3A%2F%2Ffac.umc.edu.dz%2Fsnv%2Ffaculte%2Fbeco1%2F2019%2FCPG%2520M1%2520BGV%2520BOUSBA.pdf&usg=AOvVaw3msLmdwoOKE_S0iuPXuBFk
- 4- MariePaule Bassez , Chromatographie en phase gaz, <http://chemphys.ustrasbg.fr/mpb>
- 5- R. SALGHI, Cours d'analyses physico-chimique des denrées alimentaires II, ANALYSES PHYSICOCHIMIQUES II CHROMATOGRAPHIE, ENSA Agadir
- 6- **BENTABET ,N .** -Méthodes Physico-Chimiques d'Analyse : Méthodes spectrales - ; p2
- 7- **CHAHER-BAZIZI N,.(2018).** -Méthodes d'analyses Spectroscopiques Document destiné aux étudiants de Master 1 Biochimie Appliquée, Biochimie fondamentale et Pharmacotoxicologie-. *Université Abderrahmane Mira de Bejaia : p2.*
- 8- **Djani , F. (2017).**- Méthodes Spectroscopiques d'Analyse Partie I La spectroscopie dans l'UV-Visible -. Université de Biskra ; p 2-3 .
- 9- **ELHAJJI .A ,.** - notions de base de la spectroscopie- .
- 10- **Union des professeurs de physique et de chimie (UPPC) . (2021).** - Méthodes spectroscopiques en chimie - . ; p 1 .

- 11- **Smain ,H . (2017)**.- Méthode d'Analyse Spectroscopiques en Chimie Organique UV- Visible, IR, RMN Spectroscopie de masse - ; p 2 .
- 12- Behzadi S, Ghasemi F, Ghalkhani M, et al. Determination of nanoparticles using UV-Vis spectra. *Nanoscale*. 2015;7(12):5134-5139.
- 13- Diffey BL. Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods*. 2002.
- 14- Forensic Fiber Examination Guidelines, Scientific Working Group-Materials, 1999, www.swgmat.org
- 15- Gendrin C, Roggo Y, Collet C. Pharmaceutical applications of vibrational chemical imaging and chemometrics: A review. *J Pharm Biomed Anal*. 2008;48(3):533-553.
- 16- Harris DC. Quantitative Chemical Analysis. 7th ed, 3rd printing. *W. H. Freeman*; 2007.
- 17- Pinheiro HM, Touraud E, Thomas O. Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. *Dyes Pigm*. 2004;61(2):121-139.
- 18- Sánchez Rojas F, Bosch Ojeda C. Recent development in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry: 2004–2008. *Anal Chim Acta*. 2009;635(1):22-44.
- 19- Tadesse Wondimkun Z. The Determination of Caffeine Level of Wolaita Zone, Ethiopia Coffee Using UV-visible Spectrophotometer. *Am J Appl Chem*. 2016;4(2):59.
- 20- Techniques expérimentales en Chimie, *Anne-Sophie Bernard et al., Dunod*, 2012.
- 21- UC Davis (2 October 2013). *ChemWiki*. Retrieved 11 November 2014.
- 22- HPrépa Chimie 2ème année PC-PC* - André DURUPHTY
- 23- Traite de chimie organique – VOLLHARDT (théorie simplifiée)
- 24- Identification spectrométrique de composés organiques – SILVERSTEIN (ouvrage très complet mais théorie complexe, de nombreux exemples)
- 25- Spectral Database for Organic Compounds (SDBS) : http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi (très utile pour les spectres IR, les spectres RMN sont analysés mais sont de mauvaise résolution)
- 26- Base de données IR par fréquence [:http://www.unice.fr/cdiiec/animations/spectroscopie/infra_rouge/infra_rouge.htm](http://www.unice.fr/cdiiec/animations/spectroscopie/infra_rouge/infra_rouge.htm)
- 27- Laurent SERVANT, *et al*, 2011 .comprendre la spectrosopie infrarouge:principes et mise en oeuvre.decouvrir 68
- 28- CHAREF N, La résonance magnétique nucléaire (RMN) Cours et TD.PDF.
- 29- J. Jeener (1971) Ampere Summer School, Basko Polje, Yugoslavia.
- 30- K. Wüthrich (1986) NMR of proteins and Nucleic Acids Wile New York
- 31- H. Senn, G. Otting and K. Wüthrich (1987) *J. Am. Chem. Soc.*

- 32- Mikou, A., Laplante, Rochat, H., « Toxin III of structures» (1992) Journal S., Guittet, E., Lallemand, J.Y., Martin, M.F & . australis Hector: Proton assignments and secondary the scorpion Androctonus nuclear magnetic resonance of biomolecular NMR 2, 57-70
- 33- Mikou (2007) , soumis à Spectroscopy letters. Yinshan, Y. & Guittet, E« .48674875Biomolecular Structure .Leroy, E., Mikou, A ,.Structure of cobratoxin at assignment, secondary and Dynamics 12,1-17.
- 34- **Cours: ENS Lyon. 2005/2006.** Notions de spectrométrie de masse et de spectroscopie RMN13C, Préparation à l'agrégation de Chimie Cyril Barsu, 1-18.
- 35- **Fiche technique: Catherine Zimmermann, André Deom, Dagmar Kessler. (2009).** Spectrométrie de masse,1-2.
- 36- **Leo M.L. Nollet & Robert Winkler. (2022).** Mass spectrometry in food analysis.
- 37- **Marie-Claude Menet. (2011).** Principes de la spectrométrie de masse. *RFL - REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES*, 41(437), 41-53. [Doi : RFL-12-2011-41-437-1773-035X- 101019-201106624.](https://doi.org/10.1019-201106624)