

Chapitre 3 :

Introduction aux principales catégories de techniques d'analyse :

Rappels sur les techniques chromatographiques ;

Rappels sur les techniques spectrales (IR, UV-Vis, spectrométrie de masse, d'absorption atomique) ;

Techniques spectrales (RMN, spectrométrie de masse tandem (MS-MS), spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS), spectroscopie Raman) ;

Techniques titrimétriques classiques (titrage par précipitation (argentimétrie ou argentométrie), titrage acide-base (protométrie en milieux aqueux et non aqueux), titrage par formation de complexes (complexométrie), titrage par réactions d'oxydo-réduction (méthodes électrochimiques)).

Rappels sur les techniques chromatographiques ;

Définition

La chromatographie est une méthode de *séparation* des constituants présents dans des *mélanges liquide ou gazeux*. Elle sert en analyse pour *purifier, identifier et quantifier* des composés au sein d'échantillons divers.

Principe

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différentes affinités d'un (des) composé(s) à l'égard de deux phases (stationnaire et mobile). **Le principe** de base repose sur *la différence des vitesses de migration des solutés* le long d'un dispositif séparateur constitué de *deux phases non miscibles*, l'une étant **MOBILE** et l'autre **STATIONNAIRE**. L'échantillon est entraîné par la phase mobile au travers de la phase stationnaire qui a tendance à retenir plus ou moins les composés de l'échantillon à l'aide d'*interactions* comme *les forces de Van der Waals ou les liaisons hydrogène*. Une fois la phase stationnaire traversée, les composés sont élués. Les différents composants de l'échantillon ont généralement une affinité différente pour l'une et l'autre des deux phases. Il en résulte une différence de vitesse de progression des produits et donc d'éluion. Ceci permet de les séparer les uns des autres voire de les identifier. Cette *vitesse de séparation* est fortement *indépendante de la nature des phases mobile et stationnaire*.

Rôle

Les techniques chromatographiques permettent :

- Identifications (analyse qualitative)
- Dosages (analyse quantitative)
- Récupération des composés (Chromatographie préparative)

Classification des techniques chromatographiques

Les méthodes chromatographiques se classent en trois façons:

a. Classification selon la nature physique des phases

Selon la nature de la phase mobile on distingue:

- la chromatographie en phase liquide (CPL)
- la chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Selon la nature de la phase stationnaire on distingue:

- la chromatographie liquide/solide (CLS)
- la chromatographie liquide/liquide (CLL)
- la chromatographie gaz/solide (CGS)
- la chromatographie gaz/liquide (CGL)

b. Classification selon le mécanisme de rétention

Cette classification repose sur la nature de la phase stationnaire et son interaction avec les molécules à séparer. On distingue ainsi la chromatographie:

- d'adsorption,
- de partage,
- d'échange d'ions,
- d'exclusion
- et la chromatographie d'affinité.

c. Classification selon la technique (le support utilisé) mise en jeu

Selon la technologie mise en jeu on distingue :

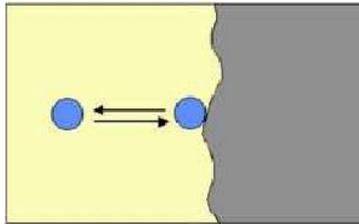
- La chromatographie sur colonne
- La chromatographie de surface (chromatographie sur papier ou chromatographie sur couche mince (une plaque)).

Classification selon le phénomène chromatographique

Ce dernier dépend de *la nature et de la structure de la phase stationnaire* utilisée (qui impose *le type d'interactions avec les solutés*).

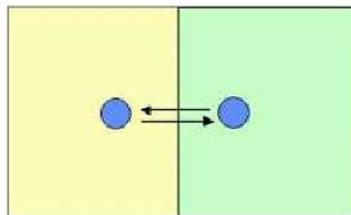
1) Chromatographie d'adsorption (LSC, GSC)

La phase stationnaire est un solide. Séparation des composés comportant *des groupements fonctionnels polaires*. *La silice et l'alumine* sont les PS les plus utilisées. Le soluté et le solvant peuvent être attirés par les sites polaires situés à la surface de la PS adsorbante. Si les *solutés présentent des interactions différentes* vis-à-vis de la PS, leur *séparation est possible*.



2) Chromatographie de partage (CLL, CGL)

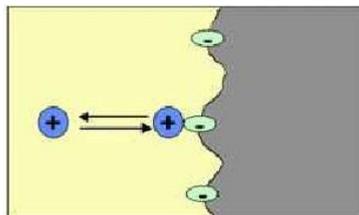
La phase stationnaire est un liquide déposé ou greffé sur un support solide. Séparation basée sur le *partage du soluté entre les deux phases liquides* (*solubilité* relative = mise en jeu de coefficients de partage).



Elle convient à la séparation des molécules *plus au moins polaires dont le poids moléculaires < 2000*

3) Chromatographie par échange d'ions

La phase stationnaire possède *des groupements chargés à sa surface* (Acides ou basiques). La séparation est basée sur les *interactions d'attraction* entre les groupements chargés de la phase stationnaire et les solutés portant une charge opposée.



Elle convient à la séparation des *solutés ionisés ou ionisables*.

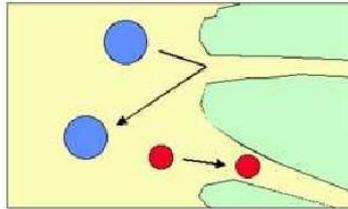
Applications

La chromatographie échangeuse d'ions est utilisée au laboratoire, *depuis la préparation de l'eau déminéralisée jusqu'à l'analyse de traces ioniques dans un échantillon*.

Elle s'applique à *l'analyse et à la séparation de sels minéraux, d'acides aminés, de peptides, de protéines, de nucléotides, d'acides nucléiques, de lipides et de glucides ionisés*.

4) Chromatographie d'exclusion stérique (ou de diffusion)

La phase stationnaire est un matériau poreux (généralement un GEL) ayant des pores de dimension bien déterminée. Il se comporte comme un véritable *tamis* vis-à-vis *des molécules ayant des masses et tailles différentes*.



Les grosses molécules ne peuvent *pas entrer dans les billes par les pores*. Elles sont exclues du volume du solvant qui se trouve à l'intérieur des billes. *Elles traversent la colonne rapidement* avec un volume d'éluant plus réduit par rapport aux molécules de petites tailles. Elle convient à la *séparation des composés à haut poids moléculaires* : macromolécules dont *les protéines et polymères*.

Applications de la chromatographie d'exclusion stérique

Le domaine d'application de ce type de chromatographie est celui de la séparation des macromolécules de masses molaires élevées.

Séparation de petites molécules et de macromolécules: Comme l'élimination des ions d'une solution de macromolécules (exemple le facteur VIII antihémophilique) 131.

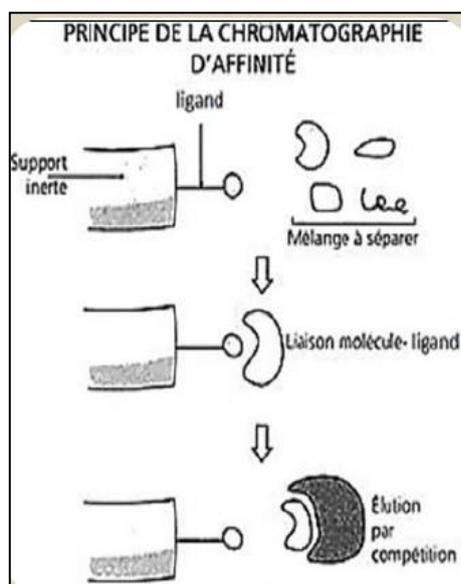
Analyse d'un mélange de macromolécules: C'est la purification de fractions plasmatiques (immunoglobulines M) pour la préparation de médicaments ou de réactifs de diagnostic.

Séparation de cellules: La chromatographie sur gel de dextran permet d'isoler les lymphocytes des monocytes.

Détermination des poids moléculaires: La meilleure méthode est l'étalonnage direct des colonnes de chromatographie d'exclusion stérique avec des étalons de poids moléculaires connus tels que le cytochrome C (12600), la myoglobine (17500), l'albumine (68000), l'ovalbumine (45000) et la γ -globuline (160000).

5) CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ

Elle se fait avec une résine sur laquelle on trouve une molécule (le ligand) qui a la propriété de se *lier spécifiquement à la molécule qu'on veut isoler*. Le ligand peut, rarement, être présent naturellement sur la résine (lectine – concavoline sur le séphadex) Fréquemment, le *ligand est fixé artificiellement sur la résine* (la résine n'a aucune affinité pour la molécule d'intérêt).



Exemple: Le **ligand** peut être un **anticorps** ayant une affinité pour un **antigène = molécule d'intérêt** : **substrat-enzyme; métal-métalloprotéine; sucre-lectine; hormone-recepteur**

Applications

La chromatographie d'affinité elle a été utilisée en:

- Enzymologie, pour l'extraction d'enzymes et la purification d'extrait enzymatiques.
- Immunologie, pour la purification d'anticorps.
- Protéino-chimie, pour l'étude des protéines membranaires.
- Chimie des acides nucléiques, pour le fractionnement de divers acides nucléiques (ARNm, ARNr, etc.)

Type de chromatographies	Phénomène physicochimiques de séparation
Chromatographie de partage	Différence de solubilité des différents dans les 2 phases après équilibre → coefficients de partage non égaux (kD)
Chromatographie d'adsorption	Accumulation des substances à résoudre à la surface d'une des phases; due à des forces de cohésion (Van der Waals) et aux interactions polaires (non spécifiques et peu connues).
Chromatographie d'échange d'ions	Échange de certains ions du mélange à chromatographier avec ceux de même signe de la phase stationnaire. -PS = macromolécule/résine portant des groupements fonctionnels acides ou basiques. -PM = solution aqueuse de sels d'acides ou de

	bases
Chromatographie d'exclusion-diffusion	Effet de tamis exercé par la phase stationnaire = gel ou réseau macromoléculaire, sur les grosses molécules. -Migration rapide des grosses molécules -Diffusion libre des petites molécules au sein de la PS d'où une migration ralentie.
Chromatographie par formation de paires d'ions	Formation d'une paire d'ions stable et neutre entre le soluté à séparer et un ion de charge opposé de la PS, facilement extractible par la PM. Les solutés à séparer donnent des paires d'ions de caractéristiques d'extractibilité différentes.
Chromatographie d'affinité	C'est une chromatographie dont les interactions substance/phase stationnaire sont connues et spécifiques.

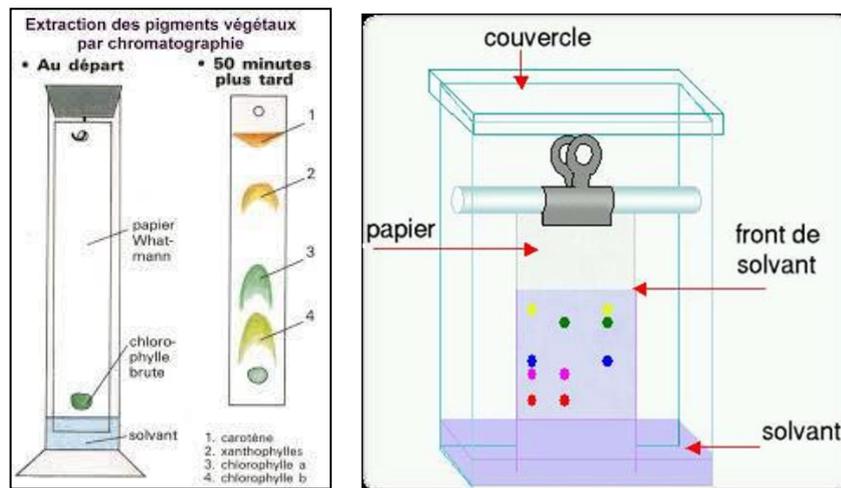
TYPES DE CHROMATOGRAPHIES

1) CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER (C. DE PARTAGE)

Composants :

- Une enceinte en verre étanche : appelée **cuve de chromatographie**
- Support : feuilles en papier-filtre maintenues verticalement dans l'enceinte ;
- Phase stationnaire : humidité présente dans la feuille de papier ;
- Phase mobile: solvants organiques(butanol/acide acétique/alcool t-amylque/pyridine, ...)

Principe : Une goutte (5-10 µl) de l'échantillon à analyser est déposée sur le papier (à l'aide d'une pipette pasteur par exemple) ; On dépose de la même façon des échantillons de substances pures connues qui vont servir de témoins. *Le passage du solvant réalise un partage des substances à séparer entre les deux phases* ; Une fois que le passage du solvant est terminé : On sort le papier (représente le **chromatogramme**) ; *On le sèche ; On le révèle* (on fait apparaître les diverses molécules qui ont été séparées sous forme de tâches).



Révélation :

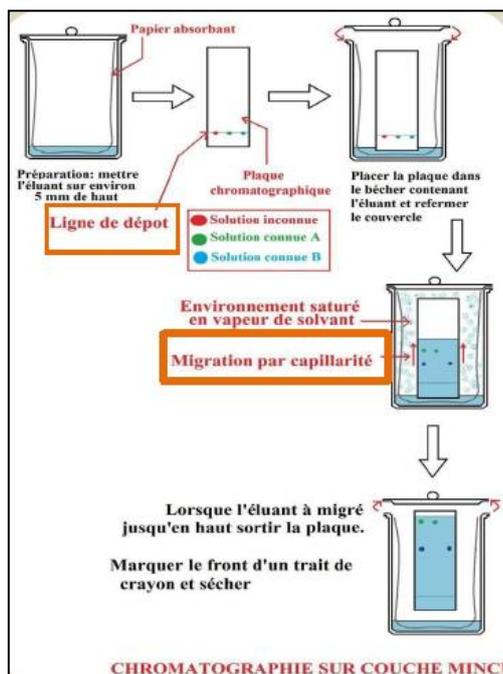
Pulvériser un réactif convenable qui fait apparaître les substances cherchées *sous forme de tâches colorées ou fluorescentes*.

Le rapport frontal (Rf) d'une substance a : Est le rapport entre : La distance parcourue par la tâche (distance entre le point de dépôt et le milieu de la tâche) ; Et la distance parcourue par le solvant (distance de la ligne de dépôt au front du solvant).

Applications : La chromatographie sur papier permet de *séparer efficacement* avec un équipement rudimentaire, *des petites molécules* (exemples : acides aminés, oligopeptides, nucléotides, les oligonucléotides...) *en fonction de leurs solubilités*

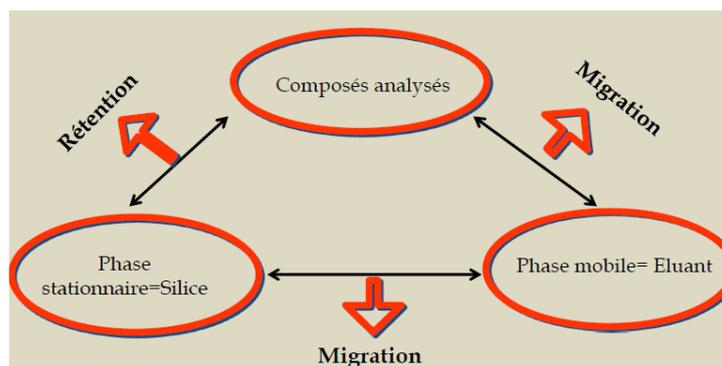
2) CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Composants : Elle diffère de la chromatographie sur papier par le fait que le papier est substitué par *une plaque sur laquelle se fixe la couche de phase stationnaire*. La phase stationnaire est *appelée : adsorbant ou couche adsorbante* (peut être *un gel, un échangeur d'ion, de la cellulose...*) Elle se *fixe sur une plaque de verre, de plastique...(le support)*



Principe :

La séparation des différents composés repose sur *la différence d'affinité de ces composés l'égard des deux phase (stationnaire et mobile)*



- Dimensions des plaques : 20X20 cm ; 20X10 cm, 5X5 cm
- Epaisseur de la couche adsorbante : 0,10 à 1,5 mm
- Durée du développement : généralement entre 1,30 à 2 heures.
- La phase mobile est choisie selon la nature de l'adsorbant et celle de l'échantillon à séparer.

Procédés de révélation :

- On peut localiser les tâches par leur couleur ou leur fluorescence;
- On peut les gratter avec une spatule, obtenir une poudre, l'agiter dans un solvant convenable et les analyser par fluorimétrie, spectrophotométrie

3) CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE EN PHASE LIQUIDE(Ch.Liquide-liquide)

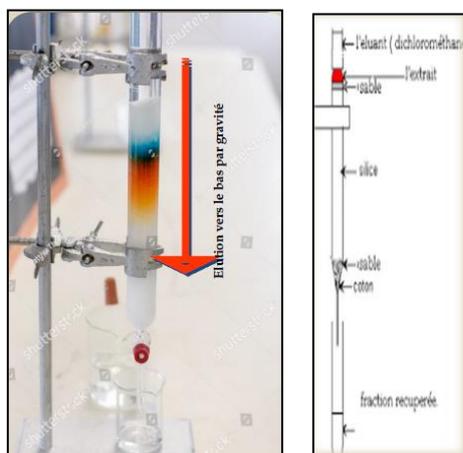
Support : Cylindre (colonne) en verre, en plastique, ou en métal placé verticalement, muni à sa base d'un filtre adéquat et d'un robinet

Taille de la colonne :

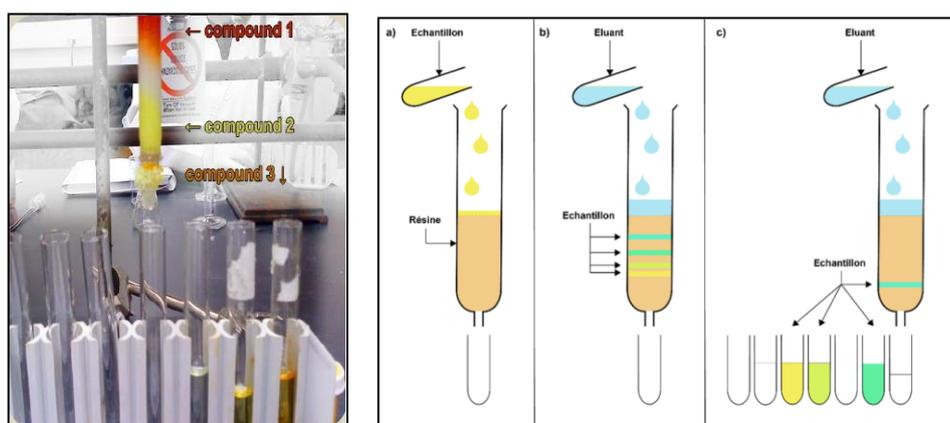
2 mètre de haut, 20 cm de diamètre : industries

Quelques centimètres de haut : microquantités,

Colonnes capillaires (diamètre <0,1 mm) :



Principe général : On dépose dans la colonne *le support* (l'adsorbant = phase stationnaire) équilibré avec un solvant adéquat ; On dépose l'*échantillon* à séparer au sommet de la colonne ; On fait couler à travers la colonne *un solvant* (l'éluant= phase mobile) avec un débit lent et constant ; *Les Substances sont fixées sur l'adsorbant puis entraînées (éluées) les unes après les autres par le solvant (l'éluant) en fonction de leur nature chimique.*



Conseil! Avant de procéder à la chromatographie sur colonne, il faut faire les chromatographies préparatoires sur couche mince *afin de choisir un éluant adapté*. Aussi après récupération des fractions issues de chromatographie sur colonne on doit leurs subir une CCM *pour séparer les composés*

Détection des substances séparées :

Séparer les molécules constitue la **1ere étape de la chromatographie ; Une fois que l'éluant (le liquide qui sort au bas de la colonne) est récupéré, on passe à la **2eme étape : la détection des substances séparées** ;**



Propriétés physiques utilisées pour la détection : Absorbance ; Fluorescence ; Radioactivité ; Variation de masse ; Variation de l'indice de réfraction

4) **Chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

Principe

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) s'adresse à ***la séparation des constituants volatils ou volatilisables***. Le mélange gazeux ou liquide est introduit dans le système d'injection, volatilisé s'il y a lieu puis entraîné par un gaz vecteur (phase mobile).

Selon leur affinité par rapport à la phase stationnaire, les constituants vont ***se séparer*** les uns des autres le long de la colonne, suivant une suite continue d'équilibres s'établissant entre le soluté et la phase stationnaire (liquide ou solide placée à l'intérieur de la colonne).

La colonne est placée dans un four thermostaté. C'est un tube de faible section, enroulé sur lui-même et contenant la phase stationnaire. Au bout de la colonne est placé un détecteur qui permet l'analyse sélective et parfois l'identification des mélanges.

Appareillage en CPG

Un appareil de CPG comprend schématiquement 3 modules spécifiques : un gaz vecteur, un injecteur(1), une colonne contenue dans une enceinte thermostatée: four(2) et un détecteur (3) relié à un intégrateur ou un ordinateur (4) sur lequel apparaît le chromatogramme

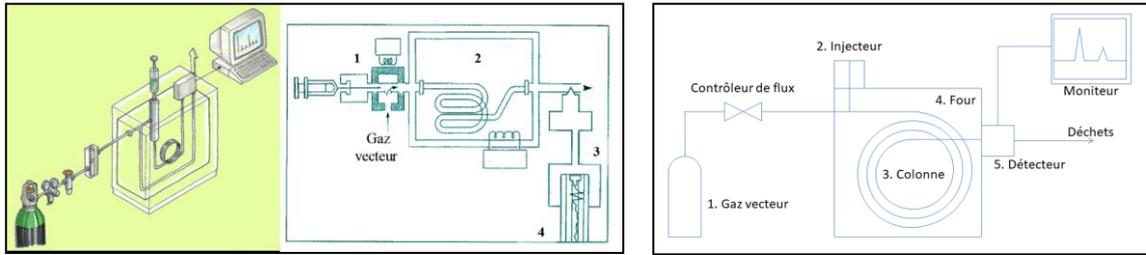


Schéma simplifié des composantes de CPG

Le mélange à analyser est injecté sous forme d'un fluide, puis vaporisé dans l'injecteur. Le gaz vecteur l'entraîne dans la colonne de séparation thermostatée. Les composés se répartissent différemment dans les 2 phases, et se déplacent donc à des vitesses différentes selon leurs affinités puis sortent à des temps différents. À leur sortie, ils sont détectés par le détecteur, et un pic apparaît sur l'enregistreur.

Gaz vecteur (réservoir)

Le gaz est contenu dans des bouteilles munies de manomètres. Il circule dans la colonne à débit constant et il doit répondre à certaines qualités :

- Faible viscosité
- Grande pureté
- Inertie vis à vis de l'échantillon et de la phase stationnaire
- Compatibilité avec le détecteur

Les principaux gaz utilisés : l'azote, l'argon, l'hélium et l'hydrogène.

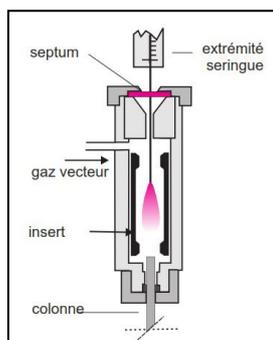
Système d'injection

Il permet:

- l'introduction, par le biais d'une seringue (1-10 L), de l'échantillon,
- son évaporation (T° de l'injecteur = T° du produit le moins volatil + 20°C),
- son entraînement par le gaz vecteur vers la colonne

Injecteur à vaporisation directe

Pour les colonnes remplies et les colonnes capillaires de gros diamètre. ***Tout l'échantillon introduit par la seringue est entièrement entraîné dans la colonne.*** Risque de saturation des colonnes capillaires à faible débit.



Injecteur avec système de fuite

Une grande partie de l'échantillon injecté, vaporisé et mélangé au gaz vecteur est éliminée de l'injecteur par une vanne de fuite. Ainsi, une petite fraction du mélange pénètre dans la colonne. Il existe deux modes selon que l'on injecte:

- vanne de fuite ouverte (mode split)
- vanne fermée pendant environ 1 minute après l'injection (mode splitless)

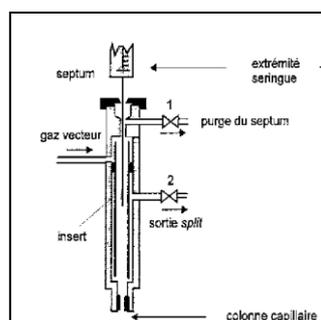


Schéma simplifié de l'injecteur avec système de fuite

Injecteur à température programmable (PTV)

Le mélange est introduit sous forme liquide dans l'injecteur à froid puis *l'injecteur est chauffé en mode split ou splitless pour vaporiser les composés.*

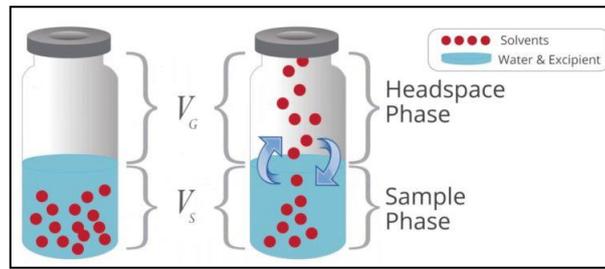
Injection à froid dans la colonne

Le mélange est injecté directement froid et liquide dans la colonne

Technique d'injection dite « espace de tête » ou « headspace »

Utilisée pour la *détermination des constituants volatils dans des solides ou des liquides visqueux, échantillons non injectables.*

L'échantillon est chauffé dans un flacon fermé: les constituants volatils sont libérés et seuls sont analysés, sans influence des composés non vaporisables.



Technique headspace

Four

Les colonnes sont placées dans des enceintes chauffées appelées four. La température du four peut-être :

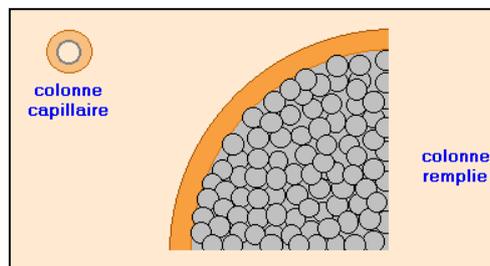
- Stable et identique du début à la fin de la manipulation (= conditions isothermes)
- Programmée par palier successif (mode gradient)

Colonnes

Elles contiennent la phase stationnaire, et se présentent sous forme de tubes fins enroulés. Il existe deux types de colonnes :

Les colonnes remplies

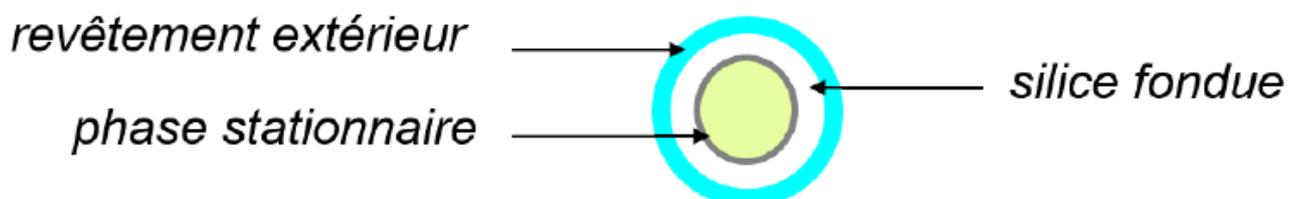
Chromosorb® ; Sphérosil® ; Porapak® Diamètre de 2 à 6 mm et longueur de 1 à 3 m. Elles sont en tubes d'acier ou verre.



Elles sont remplies d'un support poreux et inerte sous forme de grains sphériques (d'environ 0,2 mm de diamètre) sur lequel est imprégnée la phase stationnaire. Moins résolutive que les colonnes capillaires.

Les colonnes capillaires (à tube ouvert)

Diamètre de 0,1 à 0,53 mm et longueur de 10 à 100 m. Elles sont en tube d'acier inoxydable ou en silice fondue ; La phase stationnaire est directement déposée sur la paroi interne de la colonne sur une épaisseur de 0,05 à 5 mm.



Phase stationnaire

Choix de la phase stationnaire

- Une phase apolaire retiendra d'autant plus un composé qu'il sera apolaire (et inversement),
Exemple : Squalane (apolaire) ; Carbowax (polaire)
- Une phase apolaire retiendra les composés dans l'ordre de leur température d'ébullition (donc sortie des composés dans l'ordre de leur température d'ébullition croissante)
- Une phase phénylée retiendra mieux un composé aromatique

Détecteurs

Placés à l'extrémité des colonnes, Ils peuvent être plus ou moins spécifiques des composés à détecter.

T° du détecteur = T° du produit le moins volatil + 20°C

On détermine :

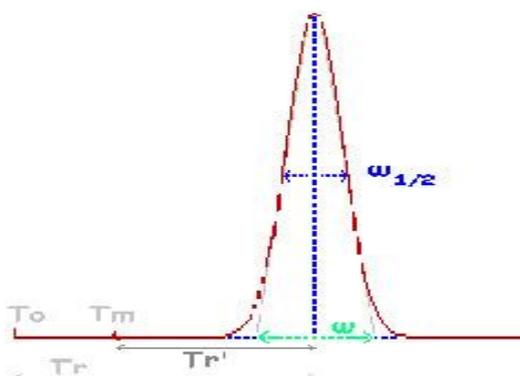
- Sa quantité minimale détectable (QMD)
- Sa sensibilité : capacité d'un détecteur à répondre à de faibles variations de concentration ou de masse. (correspond au rapport entre signal / concentration)
- Sa linéarité : domaine dans lequel la réponse du détecteur est directement proportionnelle à la concentration.

Il existe différents types de détecteurs comme le montre le tableau ci-dessous:

Tableau résumant les principaux caractéristiques des détecteurs en CPG

Détecteur	Gaz vecteur	Linéarité	QMD	Sélectivité (spécificité)	Applications
Catharomètre	H ₂ /He	10 ⁵	1 à 10 ng	NS	Tous composés
FID	H ₂ /He	10 ⁷	20 à 100 pg	NS	Composés organiques
Capture d'électrons	N ₂	10 ⁴	0,1 pg	S	Composés halogénés
Thermoionique	N ₂	10 ⁴	P : 1 pg N : 10 pg	S	Composés avec N ou P
Photométrie de flamme	N ₂ /H ₂	10 ³	P : 10 pg S : 1 ng	S	Composés avec S ou P

Paramètres caractérisant la rétention



Exemple du Chromatogramme (CPG)

1- Le temps de rétention T_r :

Le temps écoulé entre le début de l'injection et la sortie du produit par un produit S .

2- Le temps mort T_m :

Le temps que met la phase mobile pour traverser la colonne.

3- Le temps de rétention réduit T_r' :

Temps passé dans la phase stationnaire.

$$T_r' = T_r - T_m$$

1- Le volume de rétention V_r :

V_r correspond au volume de phase mobile nécessaire pour éluer le produit S. Si D est le débit de la phase mobile

$$V_r = t_r * D.$$

2- Le volume mort V_m :

V_m le volume de phase mobile qui passe à travers la colonne pour aller d'une extrémité à l'autre de la colonne (pendant le temps t_m).

$$V_m = t_m * D.$$

3- Le volume de rétention réduit V_r' :

Est le volume de phase mobile qui doit passer à travers la colonne pour éluer le composé S

$$V_r' = V_r - V_m = t_r' * D$$

Le facteur de rétention (ou de capacité)

Si on représente la colonne de chromatographie comme un milieu hétérogène constitué de deux phases non miscibles, l'une fixe et l'autre mobile et sion introduit dans ce milieu un composé présentant des affinités envers les deux phases, il s'établira, en chaque point de la colonne, un équilibre entre la concentration de ce composé dans la phase mobile et sa concentration dans la phase stationnaire. Le rapport de ces concentrations à l'équilibre est le coefficient de partage K . Le facteur de rétention K' pour un produit donné est défini comme suit :

$$K' = \frac{V_r - V_m}{V_m} = \frac{V_r'}{V_m} \quad \text{ou également} \quad K' = \frac{t_r - t_m}{t_m} = \frac{t_r'}{t_m}$$

$V_r = V_m(1 + K')$ $\text{et } t_r = t_m(1 + K')$

La chromatographie liquide haute performance

La chromatographie liquide haute performance appelé CLHP est une technique instrumentale qui permet de séparer les composants d'un mélange non volatile, thermosensible, de polarité élevée afin de les identifier et les quantifier. Elle met en oeuvre, selon la nature de la phase stationnaire, des phénomènes de partage, d'adsorption, d'échange d'ions ou d'exclusion. La fine granulométrie de la phase stationnaire permet une meilleure séparation des composants. Les pics obtenus sont plus étroits

donc la résolution est améliorée (les pics sont bien séparés). La combinaison de la rapidité et de la résolution élevées conduit à l'appellation haute performance.

- Le champ d'application de ce type de chromatographie recouvre une grande partie du domaine de la chromatographie en phase gazeuse auquel s'ajoute l'analyse:
- Des composés thermosensibles.
- Des composés très polaires.
- Ainsi que des composés de masses molaires élevées.

Un appareil d'HPLC comprend différents modules: un réservoir à solvant contenant la phase mobile, un système de pompage permettant d'effectuer des éluions graduées, un injecteur, une colonne, un détecteur et un système d'acquisition de données (**Fig**).

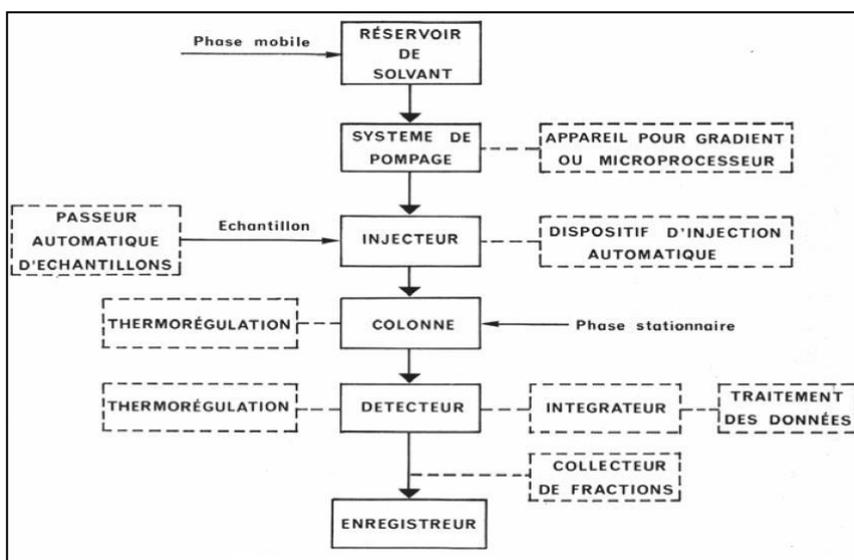


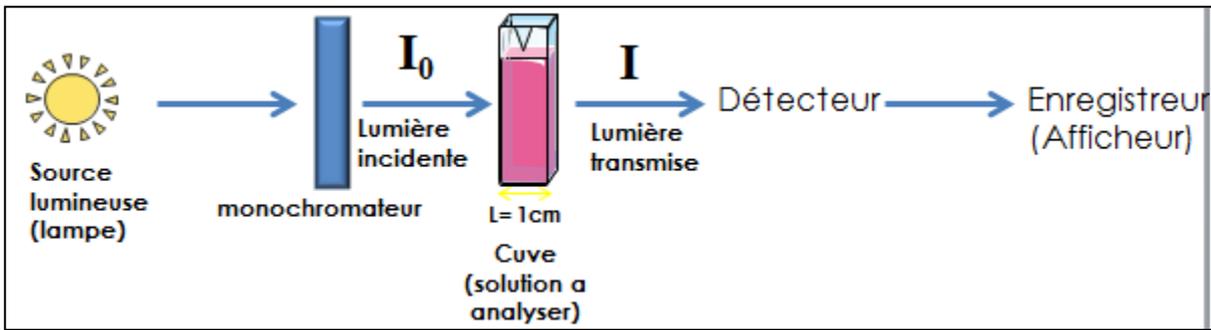
Figure. Appareillage de l'HPLC.

Méthodes spectrales

1) Spectrophotomètre UV-VIS (spectroscopie d'absorption moléculaire)

Lorsqu'un faisceau lumineux monochromatique (une longueur d'onde fixe) de longueur l et intensité I_0 traverse une solution (exp bleu de méthylène + eau) les molécules dissoutes vont absorber une quantité de la lumière incidente. L'intensité de la lumière transmise I sera inférieure à celle de la lumière incidente I_0

- La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution,
- Plus cette substance est concentrée plus elle absorbe la lumière (relation entre la concentration et l'absorbance).



• C'est la loi de Beer Lambert $A_\lambda = \epsilon_\lambda \cdot L \cdot C$.donc on peut déterminer la concentration a partir de l'absorbance.

Pour l'établissement de la loi de Beer-Lambert on suppose donc que l'on dispose d'un rayonnement monochromatique (ou du moins de largeur plus fine que le profil d'absorption) d'intensité constante $I_{0\lambda}$ à la longueur d'onde λ correspondant en général au maximum du profil d'absorption.

$$\text{absorbance} = \text{ABS} = \log \frac{I_{0\lambda}}{I_\lambda} = \epsilon_\lambda l c$$

$$\% \text{absorption} = \%A = 100 \frac{I_{0\lambda} - I_\lambda}{I_{0\lambda}}$$

$$\% \text{transmission} = \%T = 100 \frac{I_\lambda}{I_{0\lambda}} = 100 - \%A$$

$$\text{ABS} = \log_{10} \frac{100}{\%T} = \log_{10} \frac{100}{100 - \%A}$$

L'absorbance à une longueur d'onde donnée est proportionnelle à la concentration des espèces absorbantes, ce qui est à la base de l'analyse quantitative. Pour faire une l'analyse quantitative par spectrophotométrie d'absorption il faut suivre les étapes suivantes :

- Mesurer d'abord le profil ou la bande d'absorption pour déterminer le ou les maxima de (avec une solution de concentration donnée permettant une absorption suffisante).
- Choisir la longueur d'onde λ pour laquelle est maximum. Comme varie avec λ , on aura intérêt, pour une concentration donnée, à choisir la longueur d'onde pour laquelle est maximum, afin d'avoir l'absorbance la plus élevée possible.
- Etablir une courbe d'étalonnage donnant l'absorbance en fonction de la concentration connue des solutions étalon. On doit obtenir une droite $\text{ABS} = \epsilon_\lambda LC$ passant par l'origine et dont la pente est $\epsilon_\lambda LC$

Application

- Permet de déterminer la concentration d'une substance en solution dans un milieu simple ou complexe.

- Suivie de la cinétique d'une réaction chimique
- Dosage des protéines exp hémoglobine dans le sang à 540nm.
- Suivie en continue de l'éluion des protéine au cours d'une chromatographie

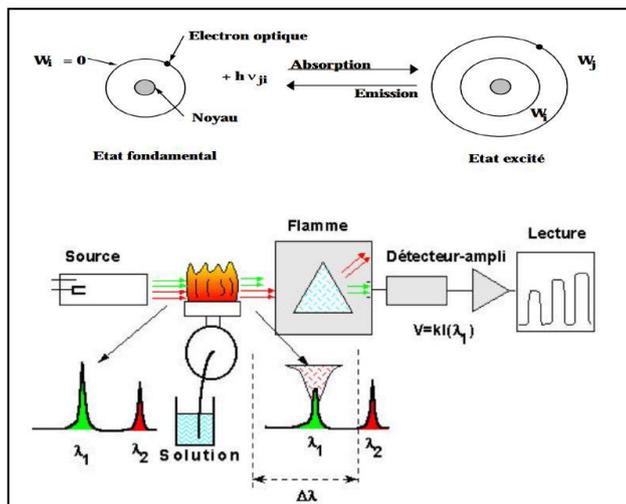
Remarque: l'opacimétrie ou la turbidimétrie est une méthode qui utilise le spectrophotomètre a 625 nm pour quantifier le nombre de particules dans une suspension (exp: suspension bactérienne ou de globules rouges)

2. photométrie d'Absorption/Emission atomique

L'émission atomique permet d'effectuer des analyses qualitatives, ce qui n'est pas le cas en absorption. En effet, c'est l'échantillon lui-même qui est la source de lumière dans une spectroscopie d'émission. Dans le cas particulier de l'absorption ou émission atomique, on travaille sur des atomes libres à l'état fondamental ($W_i = 0$), ces atomes peuvent absorber des photons et passer ainsi à leurs différents états excités. Pour un atome, on peut donc faire de l'absorption sur les raies qui correspondent au passage état fondamental - états excités, mais avec une sensibilité différente pour chaque niveau excité. Ces raies sont appelées raies de résonance. Les photons absorbés ou émis étant caractéristiques des éléments absorbants ou émis et leur quantité étant proportionnelle au nombre d'atomes d'élément, l'absorption ou l'émission permet de mesurer les concentrations des éléments que l'on a décidé de doser.

Dans le cas de l'absorption, un faisceau d'intensité connue est envoyé sur les atomes à doser, de longueur d'onde bien choisie et on mesurait l'intensité transmise, pour en déduire le nombre d'atomes absorbants présents dans la flamme. Les atomes dosés étant en large majorité à l'état fondamental car les températures habituelles de flamme sont de l'ordre de 2000 à 3000 K ce qui ne suffit pas à exciter une grande proportion d'atomes.

En émission, on excite thermiquement les atomes, dans la flamme ou le plasma afin qu'ils réémettent leur spectre de raies. En étudiant les spectres détectés, on peut donc voir quels éléments constituent l'échantillon (à condition d'avoir une température suffisamment élevée pour exciter tous les atomes), et évaluer leur quantité grâce à l'intensité des raies.



Applications de la photométrie d'absorption/émission atomique

- Dosages des sels et des métaux dans les liquides biologiques (sang, plasma, urine, homogénat de tissus.....)
- Qualité de l'eau; analyse du contenu en sels et métaux
- Toxicologie dosage des métaux lourds dans les aliments, l'eau et même dans les tissus
- Archéologie; le dosage du Ca, Sr, Zn dans les os
- Géologie l'analyse des éléments pour identification des pierres

Techniques titrimétriques classiques

Définition

La **titrimétrie** comprend l'ensemble des méthodes analytiques basées sur la détermination d'un réactif de concentration connu qui est nécessaire pour réagir complètement avec une solution de volume connu contenant la substance à analyser (l'analyte). Le réactif peut être une solution étalon (c-à-d une solution de concentration connue avec précision) (**titrage volumétrique**), un produit chimique (**titrage gravimétrique ou par précipitation**) ou un courant électrique de grandeur connue (**titrage coulométrique**). On distingue plusieurs sortes de titrages, suivant le type de réaction impliqué:

✚ **précipitation**

✚ **acide-base**

✚ **formation de complexes**

✚ **oxydo-réduction**

1) Titrage par précipitation:

Principe :

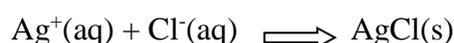
Cette méthode d'analyse a pour but d'obtenir **une séparation quantitative** (totale) d'un cation ou d'un anion (en solution aqueuse) par précipitation sélective d'un sel insoluble dans un milieu déterminé. La réaction de dosage par précipitation doit être totale, rapide et unique.

L'argentimétrie (ou argentométrie)

Désigne un ensemble de méthodes de dosage par précipitation ayant pour point commun d'utiliser une solution contenant des ions Ag^+ . La solution titrante est généralement une solution de nitrate d'argent (AgNO_3). L'espèce dosée est un anion comme les halogénures, thiocyanates (SCN^-), cyanures (CN^-),...etc.

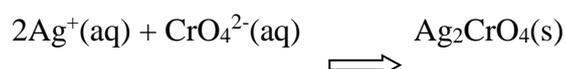
❖ Dosage des ions halogénures par la méthode de Mohr :

On précipite les ions (X^-) à l'état d'halogénures d'argent (AgX), par addition d'une solution de nitrate d'argent (AgNO_3).



On utilise pour déterminer le point équivalent un indicateur coloré d'oxydoréduction: le chromate de potassium K_2CrO_4

Après avoir consommé les ions halogénures, l'excès d'argent fait précipiter le chromate d'argent Ag_2CrO_4 de couleur rouge brique.



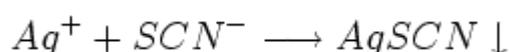
« Pour utiliser la méthode de Mohr, il faudra travailler en milieu neutre ($6,5 < \text{pH} < 7,5$) et à froid »

❖ Méthode de Charpentier-Volhard

Dans ce cas, les chlorures sont précipités en présence d'un excès de nitrate d'argent (AgNO_3). En première étape, il se forme un précipité blanc de chlorure d'argent (AgCl) selon :



L'excès d'ions argent est dosé par une solution titrée de thiocyanate de potassium ($\text{K}^+ + \text{SCN}^-$) en formant un précipité de thiocyanate d'argent (AgSCN) de couleur blanche selon :

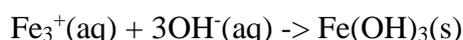


La fin du dosage est visualisée par l'utilisation d'un indicateur coloré : l'alun de fer ammoniacal 3 ($\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$). À l'équivalence, la formation du complexe avec le fer (III) et le thiocyanate est donnée par l'équation suivante :



La solution prend alors une couleur rouge-sang due au complexe formé. Cette couleur est visible que quand il n'y a plus d'ions argent à complexer par le thiocyanate.

La méthode de Volhard s'effectue en milieu acide ($\text{pH} < 2$) en présence d'acide nitrique, afin d'éviter la formation d'hydroxydes métalliques et les réactions parasites de précipitation qui empêche la visualisation de l'équivalence :



Selon la méthode de Mohr, le dosage est direct, tandis qu'il s'agit d'un dosage indirect selon Volhard.

- **Titration directe** : dosage ne nécessitant qu'une transformation pour déterminer la concentration de l'espèce à doser.
- **Titration indirecte** : dosage nécessitant deux transformations : la première transformant l'espèce chimique à doser et la seconde permet de repérer l'équivalence

2) Titration par formation de complexes (complexométrie)

Introduction

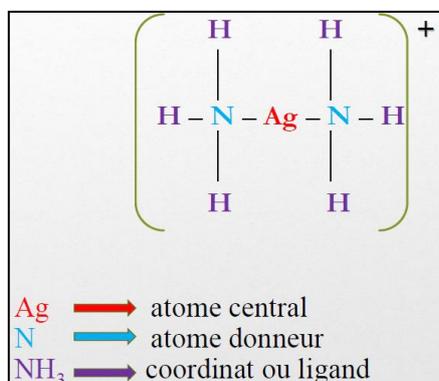
Le titrage complexométrique offre la possibilité de *dosages volumétriques simples* et rapides d'un *très grand nombre d'ions métalliques* par la *formation de complexes*. Une réaction formant un

complexe peut être utilisée comme réaction de dosage, pourvu qu'elle remplisse les conditions que doit remplir une telle réaction, à savoir être unique, totale et instantanée. C'est grâce à l'introduction d'**agents chélatants** par G.Schwarzenbach dès 1945 que *les titrages complexométriques se sont établis comme méthodes analytiques fiables.*

Définition d'un complexe

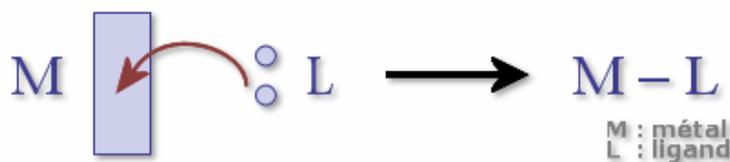
Un **complexe** est un *édifice مبنى* polyatomique constitué d'un *atome ou d'un cation métallique* appelé *atome central* auquel sont *liés* par coordination *des molécules neutres ou des anions* appelés **ligands** ou **coordinats**. La formule du complexe est écrite entre crochets. Le complexe peut être :

- neutre : $[\text{Cr}(\text{CO})_6]$,
- cationique : $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^+$,
- ou anionique : $[\text{AlF}_6]^{3-}$.



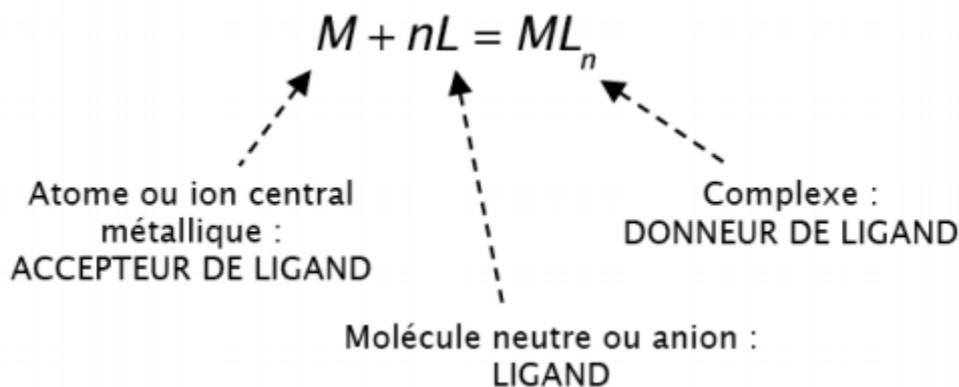
Dans les deux derniers cas, il **possède un contre-ion** ; la formule du complexe comprend alors *d'abord le cation, puis l'anion* : $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}$ ou $\text{Na}_3[\text{AlF}_6]$.

La **coordination** ou **formation d'une liaison covalente** dative est une **réaction acide base de Lewis**. *L'atome ou l'ion métallique central*, qui accepte les doublets est un **acide de Lewis**. Il possède des lacunes électroniques. *Les ligands*, qui donnent les doublets, sont des **bases de Lewis** ; ils possèdent donc des doublets libres disponibles.



Les Ligands

Les ligands couramment utilisés pour effectuer le dosage des cations, doivent **posséder au moins une paire d'électrons non liants** disponible *pour former la liaison avec l'ion central.*



Le nombre de liaisons qu'un cation *peut former* avec des donneurs d'électrons est son nombre de coordination. Le nombre de liaisons formés par l'atome central est appelé nombre de coordination ou *indice de coordination*. **La stabilité des complexes** dépend de plusieurs facteurs, notamment : *la nature du métal central et du ligand et de la composition du milieu (pH, solvant, ions étrangers, etc...)*.

Les indices de coordination les plus habitués sont **2,4,6**

$[Ag (NH_3)_2]^+$	indice de coordination	2
$[Co (NH_3)_4]^{2+}$	indice de coordination	4
$[Fe (CN)_6]^{4-}$	indice de coordination	6

Les différents types de titrages compléxométriques :

a. Titrage direct : Méthode la plus simple

Techniques de dosage

A la solution d'ions à doser, correctement tamponnée on ajoute la quantité désirée d'indicateur, puis on ajoute la solution titrée de complexonIII goutte à goutte.

Avant le virage la solution est *colorée par le complexe métal-indicateur*, car *le complexonIII réagit d'abord sur les ions libres* existant en excès dans le milieu.

Au voisinage du point d'équivalence, il existe le *complexe complexon-métal*, et le *complexe métal-indicateur*

L'addition d'un léger excès de complexonIII *déplace l'indicateur* du complexe métal-indicateur, puisque *le complexe complexonIII –métal est plus stable*. Il en résulte *un changement de couleur du milieu*. Cette technique est applicable au dosage des ions Ca^{2+} en présence du murexide ou Calcon comme indicateur, et au dosage du Mg^{2+} en présence du noir eriochromeT (N.E.T).

2) Méthode par remplacement :

Cette *méthode est utilisée lorsque l'indicateur donne avec le cation à doser un complexe trop peu stable*.

EXEMPLE: le dosage du Ca^{2+} en présence du N.E.T est très peu précis, car *le complexe calcium-N.E.T est peu stable*. Il est alors possible de sensibiliser le virage de l'indicateur en *ajoutant un peu de complexonate de magnésium* qui *donne un complexe plus stable avec l'indicateur Mg-N.E.T*.

Au cours de dosage, *les ions calcium libres* sont d'abord *complexés par le complexonIII (E.D.T.A)* puisque c'est le complexe *calcium-E.D.T.A* qui est le plus stable.

Au point d'équivalence le *complexonIII chasse le noireriochromeT* de son complexe avec le magnésium. Le complexe *Mg-N.E.T* est **remplacé par** le complexe *E.D.T.A-Mg*. Le N.E.T devient libre ce qui provoque *un changement de couleur de l'indicateur*.

3) Méthode par retour :

Cette méthode est adaptée **pour les cations** qui forment des complexes stables avec l'EDTA **mais** pour lesquels *il n'existe pas d'indicateur approprié*, ou que la réaction de complexation *est trop lente ou donnent des hydroxydes insolubles au pH considéré*. C'est le cas des dosages *de plomb, de mercure, de manganèse*.

Ce dosage en retour peut s'effectuer:

- soit par un ion métallique de même nature que celui qui a été dosé.
- soit par un ion de nature différente

Méthode:

Un excès connu d'une solution d'EDTA est ajouté à l'analyte. Lorsque la réaction est terminée, l'excès d'EDTA est titré en retour avec une solution de Mg^{2+} ou de Zn^{2+} en utilisant ERIO-T comme indicateur.

Application des complexes en thérapeutique :

Interactions médicamenteuses liées à des phénomènes de complexation: Certains médicaments (tétracyclines, aminosides, furosémide, édetate de sodium, d-pénicillamine) forment des complexes avec des cations bivalents, en particuliers avec les ions Ca^{2+} ou Mg^{2+} . Cette formation de complexe *entraîne une désactivation partielle de l'activité du médicament*.

3) Titration par réactions d'oxydo-réduction (méthodes électrochimiques)

Introduction :

Il est possible d'utiliser *de l'énergie électrique pour produire une réaction chimique : c'est l'électrolyse.*

Phénomène d'électrolyse :

Le phénomène d'électrolyse peut être envisagé sous deux aspects :

- **L'électrolyse classique** : ou les phénomènes redox aboutissant au *dépôt d'un métal sur une cathode.*
- **La microélectrolyse** : consiste à effectuer une électrolyse sur *une solution diluée pendant un temps très court*, en mettant en œuvre *un courant d'intensité très faible avec des électrodes de petite taille.* La mesure de I (l'intensité) ou de E (le potentiel) développés au cours de cette microélectrolyse peut être utilisée à des fins analytiques.

Méthodes instrumentales électrochimiques :

- Potentiométrie
- Conductimétrie
- Ampèremétrie
- **Coulométrie** Polarographie

1) Potentiométrie

Les méthodes analytiques qui sont **basées sur des mesures de potentiel** sont appelées **potentiométriques.**

La potentiométrie permet de *déterminer des paramètres thermodynamiques* (résultantes de complexation, produit de solubilité...), de *contrôler une préparation au cours d'une fabrication industrielle* et de *déterminer le point équivalent d'une réaction de titrage.*

2) Ampèrométrie :

L'ampèrométrie permet de suivre au cours du dosage les variations de concentration que subit la substance à doser à partir de *la mesure de l'intensité du courant traversant les électrodes; le point équivalent* apparaît comme un point singulier de la courbe de variation de l'intensité en fonction de la quantité de réactif versé.

3) Coulométrie

4-3-1 Principe

Les méthodes coulométriques sont basées sur la mesure de la quantité d'électricité (la charge) nécessaire pour modifier quantitativement l'état d'oxydation de l'analyte.

Applications

- Le dosage (et la synthèse) électrolytique des composés organiques (ex : l'acide de trichloracétique).
- Le mercure est la cathode la plus utilisée sur laquelle peut s'effectuer le dépôt d'environ 25 métaux différents.

4) Conductimétrie :

La conductance d'une solution est reliée linéairement aux concentrations des ions en solution. La conductimétrie, ou mesure de la conductance permet donc en principe d'atteindre les concentrations.

Une solution qui contient des ions est appelée « solution électrolytique ».

En l'absence d'ions, un liquide **ne conduit** quasiment **pas le courant électrique** : c'est quasiment un isolant.

Pour qu'une solution électrolytique soit traversée par un courant électrique, **il faut plonger deux électrodes conductrices** dans la solution et leur appliquer une tension électrique.

Dans une solution électrolytique traversée **par un courant continu**:

- les **cations** migrent vers l'électrode reliée au pôle **néгатif**.
- les **anions** migrent vers l'électrode reliée au pôle **positif**.

Domaine d'application de la méthode.

- En principe, tous les types de réactions peuvent convenir : **oxydo-réduction**, réactions **acide-base**, formation de **complexes**, **précipitation**, **échange d'ions**, **extraction**; la seule condition est que des ions soient mis en jeu dans la réaction.
- La méthode convient aussi pour les dosages en milieu dilué, jusqu'à 10^{-4} M.

La protométrie comprend l'ensemble des réactions chimiques en solution, qui mettent en jeu des protons.

→ Elle permet de déterminer la quantité de protons échangés au cours d'une réaction de neutralisation acide-base.

→ Elle est donc mise en œuvre pour le dosage de molécules, ou d'ions à caractère acide ou basique.

→ C'est une méthode bien adaptée aux matières premières et adaptable dans certains cas aux formes pharmaceutiques.

→ Elle reste actuellement une méthode de base pour le contrôle des matières premières dans l'industrie pharmaceutique.

→ La méthode est décrite dans la pharmacopée européenne, et dans d'autres pharmacopées.

→ La théorie de Bronsted est bien adaptée aux mécanismes mis en jeu en protométrie.

→ On distingue deux grands types de protométrie selon le milieu réactionnel :

- protométrie en milieu aqueux = qui est mise en œuvre chaque fois que possible, elle s'applique essentiellement aux acides et bases minéraux. Peu de molécules d'intérêt pharmaceutique peuvent être dosées par cette méthode.
sont dosés par cette méthode : les acides forts, les bases fortes, les acides faibles, les bases faibles, les sels d'acides forts et de bases faibles et enfin les sels de bases fortes et d'acides faibles.

- protométrie en milieu non aqueux = elle met en jeu des réactions de neutralisation acide-base dans des solvants autre que l'eau.

Le dosage en milieu non aqueux sera utilisé dans les cas suivants :

- ❖ lorsque le composé à doser est insoluble dans l'eau.
- ❖ Lorsque la force de l'acide ou de la base est trop faible dans l'eau.
- ❖ Lorsque le caractère acido-basique des molécules à doser n'est pas suffisamment différencié en milieu aqueux ; c'est le cas des mélanges ou bien le cas des polyacides et des polybases.

Remarque =

il faut toujours avant d'entreprendre un dosage en milieu non aqueux, évaluer la possibilité de le réaliser en milieu aqueux.

Exemple =

L'acide phénylacétique très peu soluble dans l'eau, peut être dosé en milieu non aqueux dans l'éthanol par KOH alcoolique.

Mais on peut aussi le doser en milieu aqueux par dissolution dans NaOH 0,1N (le sel de sodium correspondant est alors formé), et l'excès de base NaOH est dosé en retour par HCL 0,1N (voir dosage en retour en T.P).

Quelques rappels sur les électrolytes

Les électrolytes sont des solutions qui, lorsqu'ils sont mis en solution dans l'eau ou dans un autre solvant permettent le passage du courant électrique.

Electrolytes forts = un électrolyte fort est un composé dissocié (ionisé) à 100% en solution. La solution d'électrolyte fort conduit fortement l'électricité.

EX : les acides forts, les bases fortes, les sels comme NaCl



Il y a dissociation ionique totale

Electrolytes faibles = un électrolyte faible est un composé peu dissocié en solution. La solution d'électrolyte faible conduit faiblement l'électricité.

EX : les acides et les bases faibles



La dissociation ionique est faible

Conductivité d'un électrolyte = la conductivité d'un électrolyte résulte de la mobilité des ions à l'intérieur de la solution.

La conductivité d'une solution est déterminée en mesurant sa résistance électrique R , ou sa conductance électrique.

Les acides et les bases en solution aqueuses

1) Théorie d'Arrhenius 1893 = Arrhenius a donné le premier une définition des acides et des bases à partir de la dissociation ionique de ces substances en solution aqueuse.

- un acide est un électrolyte qui en solution dans l'eau donne un ou plusieurs protons H^+ . Exemple : $HCl \rightarrow H^+ + Cl^-$

- une base est un électrolyte qui en solution dans l'eau donne un ou plusieurs ions OH^- . Exemple : $NaOH \rightarrow Na^+ + OH^-$

C'est une théorie dépassée dont l'intérêt est historique en effet :

- sa définition n'est valable qu'en solution dans l'eau, or on utilise d'autres solvants.
- Il existe des substances basiques qui ne libèrent pas des ions OH^- . exemple NH_3

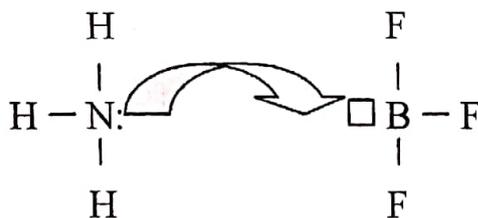
2) Théorie de Lewis :

- un acide est capable d'accepter un doublet d'électrons c'est-à-dire il présente une lacune.

Exemples : $\square BF_3$, Na^+ , $\square BCl_3$, Ag^+ , $\square AlCl_3$
 H^+ (cas particulier d'acide de Lewis)

- une base est donneur d'un doublet d'électrons.

Exemples : NH_3 , H_2O , ROH



3) Théorie de Bronsted et Lowry 1923 :

Bronsted au Danemark et Lowry en Angleterre ont indépendamment proposé une théorie du comportement acido-basique qui est particulièrement utile en chimie analytique.

Selon Bronsted La réaction d'un acide sur une base consiste en un transfert de protons.

- un acide HA est une substance capable de céder des ions H^+ . c'est un donneur de protons. $HA \rightarrow A^- + H^+$
- une base B est une substance capable de capter des ions H^+ .c'est un accepteur de protons. $B + H^+ \rightarrow BH^+$