

Méthodes d'extraction instrumentales

(Eric Marchioni)

Méthode d'analyse

- Prélèvement d'un échantillon représentatif
- Préparation de l'échantillon
- Définition de la taille des prises d'essai (prévoir assez de matière pour contre-expertise)
- Mise en suspension de l'échantillon (le dissoudre si possible)
- Extraction des analytes
- Purification de l'analyte (séparé l'échantillon en plusieurs fractions)
- Séparation des analytes
- Analyse proprement dite
- Calcul des résultats
- Estimation de la fiabilité des résultats (chimométrie)
- Rédaction du rapport d'analyse

Extraction

Si on veut extraire un produit A d'une solution aqueuse, j'ajoute un solvant pour lequel le produit a une affinité plus grande que pour l'eau.

Ex : acide benzoïque dans un médicament pour stabiliser le produit, c'est un noyau phényle avec un groupement acide et a donc une partie polaire et apolaire. Il a donc affinité pour phase aqueuse et phase organique → un partage régit par la différence des affinités pour les différents solvants. Tout ne sera jamais extrait mais on peut limiter cette quantité non extraite.

$$K_{xw} = \frac{\text{Concentration A dans la phase organique (x)}}{\text{Concentration de A dans l'eau (w)}} = P$$

On ne pas extraire avec des solvants solubles dans l'eau, ce ne sera que une dilution, donc les solvants doivent être parfaitement insoluble dans l'eau (le coefficient de dissolution doit être très faible dans l'eau en soit).

Chloroforme est translucide tout comme l'eau donc on ne voit pas l'interface entre l'eau et le chloroforme.

Faire attention à la densité des solvants pour savoir si la phase organique au dessus ou en dessous de la phase aqueuse (chloroforme en dessous par exemple).

On récupère la phase organique et on le met dans un dessiccateur et on pèse la quantité A extraite (en évaporant on peut perdre une partie de l'analyte et donc un solvant très volatil est préférable pour l'extraction).

On peut aussi extraire un composé d'une phase organique vers une phase aqueuse. Le coefficient de partage est cette fois ci K_{wx} (au lieu de K_{xw}).

$$\text{Si } V_{\text{organique}} = V_{\text{eau}}$$

$$P = K_{xw} = \frac{q_{A,\text{organique}}}{q_{A,\text{aqueux}}} = \frac{q_{A,\text{organique}}}{q_{A,\text{total}} - q_{A,\text{organique}}}$$

On considère qu'il n'y a pas de perte dans cette équation.

Il y a des pertes au niveau de l'interface entre les phases, adsorption sur les parois. Le butanol dans la phase organique casse les émulsions, on peut aussi mettre du KCl ou NaCl dans l'eau pour le même effet mais on aura une interface supplémentaire.

$$qA, total = qA, organique \frac{1 + K_{xw}}{K_{xw}}$$

Si on utilise des solvants tels que le chloroforme, l'hexane, on parlera de K_{xw}
 x étant de solvant organique utilisé
 w étant l'eau

En pratique on définit plus communément le coefficient de partage octanol-eau d'un produit A : P ou encore K_{ow}

$$K_{ow} = P = \frac{\text{Concentration de A dans l'octanol}}{\text{Concentration de A dans l'eau}}$$

Quels sont les valeurs de K_{ow} et P ?

$$10^{-3} < K_{ow} < 10^{12}$$

$$-3 < \log(P) < 12$$

amitrol : -0,086

Riboflavine -1,46

Vitamine C -1,85

Saccharose -3,7

Choix du solvant

Dans la littérature : octanol → très peu réaliste, si ce n'est que log (P)

- Absorption orale : log (P) = 1,8
- Pénétration au cerveau : log (P) = 2,0
- Absorption percutanée : log (P) = 2,6
- Absorption sublinguale : log (P) = 5,5

Comment calculer le K_{xw} , P ou encore log (P) ?

→ Choix du solvant

→ Recherche bibliographie

→ Méthode chimique

→ Détermination par HPLC (ex : colonne C18 avec phase mobile H₂O et donc test d'affinité entre eau et C18 → partage)

→ Détermination par électrophorèse capillaire

→ Prédiction

La différence de log (P) observés entre deux solvants comme l'octanol et l'hexane (neurotoxique, pentane plus volatil, heptane moins volatil) permet de comparer le pouvoir solvant et d'identifier la polarité du composé étudié (liaison H).

Dans les tables bibliographiques on retrouve des valeurs K_{ow} et P, les deux solvants sont purs, le composé A est seul dans les deux solvants, ce résultat est souvent sans intérêt pratique, juste informatif.

Méthode chimique (Méthode du flacon agité) :

Il est préférable de déterminer soi-même la valeur de K_{ow} , en fonction du solvant utilisé : on ajoute une quantité connue du composé A dans un mélange équivolume d'octanol (ou autre solvant) et d'eau (notre eau avec tous nos composés) et on mesure la distribution de A dans chaque solvant.

$$q_{A, total} = q_{A, organique} \frac{1 + K_{ow}}{K_{ow}}$$

$$K_{ow} = \left(\frac{q_{A, organique}}{q_{A, total} - q_{A, organique}} \right)$$

Détermination par HPLC : le log (P) d'un soluté peut être déterminé par corrélation entre son temps de rétention et celui de composés similaires avec un log (P) connu. Schéma voir Katia.

Prédiction : calculs prédictifs basés sur les structures chimiques (méthodes des fragments).

Un exemple simple : <http://molecular-properties.com:9080/mi/webme.html>

Imaginons le produit à extraire est polaire ou ionique, très soluble dans l'eau, peu soluble dans les solvants organiques → il faut le neutraliser, il faut modifier le solvant d'extraction. Utilisation de chélateurs très solubles dans la phase organique, peu solubles dans l'eau.

Ex : diéthyl-dithiocarbamate qui est chargé en phase aqueuse et peut donc chélater des ions (ions métalliques notamment) et faire un complexe qui devient très apolaire et donc va dans la phase organique.

Le Diphénylthiocarbazonne permet de solubiliser des ions métalliques dans la phase organique selon le pH.

Il y a aussi des éther-couronnes, des dibenzo-couronnes, des dicyclohexano-couronnes qui peuvent aussi piéger des molécules.

On peut aussi faire des paires d'ions, pôles hydrophile qui permet à l'ion de se solubiliser dans l'eau, paire d'ions dont seule la face hydrophobe est apparente. La sélectivité réside dans la stabilité de la paire d'ion formée :



Pour extraire un cation on utilise du SDS (anions laurylsulfate), du DOSS (anion dioctyl sulfosuccinate).

On peut modifier le pH et ainsi neutraliser des ions en fonction de leur pKa et les rendre plus ou moins solubles dans la phase organique ou aqueuse.

Ex : vitamine PP (B3) : charge + < pK₁ = 2,1 < neutre < pK₂ = 4,9 < charge -

On peut modifier chimiquement la molécule avec des réactions de dérivation

Ex : Aminotriazole (P=1 → 50% dans l'eau et 50% dans phase organique) on lui ajoute de l'anhydride acétique et on obtient un dérivé apolaire (qui peut être extrait à l'acétate d'éthyle). Il faudra faire attention au rendement de dérivation.

Extraction se faire dans ampoule à décantation

$$q_{A, total} = q_{A, organique} \frac{1 + K_{xw}}{K_{xw}}$$

$$A\% = \frac{qA, \text{organique}}{qA, \text{total}} 100 = 100 \frac{Kxw}{1 + Kxw}$$

Comment augmenter ce taux de recouvrement ?

$$A\% = 100 * \frac{Kxw}{Kxw * \frac{V, \text{eau}}{V, \text{orga}}}$$

On peut donc augmenter le volume de phase organique ou réduire le volume de la phase aqueuse (sécher, pomper, lyophiliser, chauffer, Na_2SO_4).

$A\%$ qui se rapproche de 100%, il faut V, orga grand mais problème de coût, de pollution et de danger pour le manipulateur.

$A_{\text{eau}} \leftrightarrow A_{\text{orga}}$ avec comme constante d'équilibre K_{xw} .

On peut réaliser plusieurs extractions, ainsi lors de la première extraction avec 50% d'extraction, il reste 50%, deuxième extraction donc il reste 25%, troisième, 87,5%, etc.

$$\frac{q, \text{orga}}{q} = 1 - \left(1 - \frac{Kxw}{Kxw + \frac{V, \text{eau}}{V, \text{orga}}} \right)^n$$

$$\frac{q, \text{aqueux}}{q} = \left(1 - \frac{Kxw}{Kxw + \frac{V, \text{eau}}{V, \text{orga}}} \right)^n$$

On a donc ces résultats après n extractions.

Exemple : 1g de viande finement broyée et dispersée dans 30mL d'eau :

- Taux de matière grasses : 10%
- $Kxw(\text{grasses}) = 2$

→ Choix : une extraction avec 90mL d'un solvant (on obtient 86% d'extraction) ou 3 extraction avec 30mL d'un solvant (96% d'extraction).

Extraction en continu avec Soxhlet (décrit en 1879 par Franz von Soxhlet) → toujours du solvant frais pour l'extraction.

Il y a le soxtec qui une version améliorée du Soxhlet.

On peut chauffer pour accélérer l'accès à la position d'équilibre.

$$K = Ae^{\left(\frac{-\Delta G^\circ}{RT}\right)}$$

MAE = microwave assisted extraction : au lieu de chauffer le solvant avec résistance électrique on chauffe directement le solvant avec des microondes. L'échantillon est mis dans un récipient qui supporte des pression et donc la température augmente et l'extraction se fait plus vite. Un four 2450 MHz (fréquence commerciale) entraîne une rotation des dipôles, alignement parallèle et anti-parallèle au champ électrique. Il y a conduction des ions par un « aller » retour » et les forces de frictions vont échauffer. La capacité d'un solvant à absorber les microondes et à convertir leur énergie en chaleur est donnée par l'équation :

$$\text{tg}(\delta) = \frac{\varepsilon''}{\varepsilon'}$$

ε'' la perte diélectrique : transformation de l'énergie absorbée en chaleur

ϵ' la constante diélectrique (liée au moment dipolaire) : opacité de la solution aux microondes.

Mécanisme 1 : l'échantillon est immergé dans un solvant qui absorbe fortement les microondes (ex : eau).

Mécanisme 2 : l'échantillon est immergé dans un mélange de solvant (héxane/acétone ; acétate d'éthyle/cyclohexane ; acétone/iso-octane), l'un servira à absorber les microondes et l'autre servira à dissoudre les composés à extraire.

Mécanisme 3 : l'échantillon, s'il présente un ϵ'' élevé, est immergé dans un solvant apolaire (donc transparent aux microondes), l'échantillon est chauffé par les microondes et va chauffer le solvant qui extrait.

$\epsilon'_{\text{MeOH}} < \epsilon'_{\text{H}_2\text{O}}$ les microondes traversent plus facilement MeOH que l'eau.

Liner (sachet dans lequel l'extraction se fait) est en verre ou en téflon armé (renforcé), support à 14 échantillons, soupape de sécurité, fonctionnement jusqu'à 200°C et jusqu'à 200psi (13bar).

La PLE = pressurized liquid extraction : mieux connue sous le nom de ASE (accelerated solvent extraction) de la société DIONEX. C'est une méthode automatisable qui ne nécessite que très peu de solvant (10 à 100mL) et dure quelques dizaines de minutes (5 à 30minutes) mais c'est un investissement élevé (un seul constructeur). On a plus de microondes donc le chauffage se fait avec un four électrique. De l'azote sous pression est injecté dans le système pour augmenter la pression.

USE = ultra sonic extraction : à défaut d'augmenter la température, on augmente l'agitation. On utilise les ultrasons qui vont dégager de la chaleur au point de l'onde de compression sonore de fréquence ultrasonique. Des bulles de gaz par un effet appelé « cavitation ». Les molécules vont se serrer les unes contre les autres et se séparer violemment, la pression et température locales de plusieurs centaines d'atmosphères et plusieurs milliers de °C.

SFE = super critical fluid extraction

Propriété physiques	Gaz 1atm ; 15-30°C	Liquide 1atm ;15-30°C	Fluide supercritique
Masses volumiques ρ	$(0,6-2) \times 10^{-3}$	0,6-1,6	0,2-1
Coefficient de diffusion Dm	0,1-0,4	$(0,2) \times 10^{-5}$	$(1-7) \times 10^{-4}$
Viscosité dynamique η	$(1-3) \times 10^{-4}$	$(0,2-3) \times 10^{-2}$	$(2-10) 10^{-4}$

C'est le CO₂ qui a le plus d'avantage en fluide supercritique. Le pouvoir d'extraction d'un fluide supercritique est caractérisé par une augmentation de la pression, de la densité ($0,2 < d < 1$) et de la force d'extraction

$$\delta = 1,25 * P_c^{\frac{1}{2}} \left(\frac{\rho}{\rho_{liq}} \right)$$

Pc la pression critique du fluide.

C'est une méthode avec une certaine sélectivité d'extraction, on a des seuils d'extraction des composés à des pressions différentes pour des composés de natures différentes. On peut ainsi extraire différentes matières grasses d'une matrice grasseuse, ce qu'on ne peut pas faire avec les méthodes précédentes.

Le CO₂ permet d'extraire des composés apolaires, si on veut extraire des composés polaire on ajoute une infime fraction (1 à 1,5%) de méthanol (polarité 5,1 alors que eau 10,2 mais quand même très polaire) ou d'acétonitrile (polarité 5,8).

Effet de la température, plus elle est faible plus l'effet de la pression est important sur la densité, plus la densité est élevée et moins le solvant diffuse.

Effet du débit, plus il est élevé, plus l'extraction est rapide, plus la détente est critique mais il y a aussi plus de phénomènes « d'entraînement » qui peuvent apporter des impuretés.

Stir bar sorptive extraction : barreau magnétique aimanté recouvert d'une phase de type polydiméthylsiloxane (PDMS). Après l'extraction, les extraits peuvent être analysés de deux façons :

- Composés volatils : le barreau est placé dans une unité de désorption. Les composés sont désorbés dans l'injecteur d'un GC.
- Composés peu volatils : le barreau est placé dans un flux de solvant et injecté en chromatographie en phase liquide.

C'est une technique d'extraction sans solvant qui permet d'avoir accès à des limites de détection extrêmement faibles (inférieur à ppb), reproductible de barreau à barreau, chaque barreau peut être réutilisé plusieurs fois.

Espace de tête statique est un système qui permet d'extraire des composés volatils comme des arômes ou des solvants. On place échantillon dans un four pendant un certain temps à une certaine température, un gaz vecteur va pressuriser le flacon. Le gaz vecteur va parcourir la colonne de chromatographie. Les produits volatils vont passer dans la phase gazeuse de l'espace de tête, on dépressurise la flacon et ainsi on remplit la boucle et on ferme une vanne avant de tourner la boucle d'injection pour injecter le gaz vers le chromatographe.

Très utilisé en cosmétique, pharmacie, agroalimentaire, etc.

Il existe une variante qui est l'espace de tête « dynamique », on fait passer le gaz vecteur à travers l'échantillon pour épuiser les produits volatils et on les piège sur un piège cryogénique ou sur des matériaux microporeux, puis on chauffe le piège de façon très violente pour libérer tout les produits volatils d'un coup vers le chromatographe.

Électrogravimétrie et coulométrie

Méthodes d'analyses électrochimiques

- composés non électroactifs
 - Conductimétrie direct
 - Titrage conductrimétrique
- composés électro actifs
 - Méthode statique $I=0$
 - Potentiométrie direct
 - Titrage potentiométrique
 - Méthode dynamique $I>0$
 - Réaction limitée
 - Voltampérométrie
 - Titrage ampérométrie
 - Polarographie
 - Réaction complète
 - Coulométrie
 - Electrogravimétrie

Coulométrie :

On mesure le courant (déplacement de charge) entre deux électrodes ou plus. Une électrode de mesure et une électrode de référence. On obtient la différence entre électrode de référence et l'électrode sur laquelle se fait la réaction d'oxydation. Si Cd^{2+} s'en va on aura moins de charges positives et si Cd^{2+} se dépose sur électrode on aura augmentation de charge +. C'est de la potentiométrie. Equation de Nernst qui permet de déterminer le potentiel.

$$E = E^0 + \frac{0,0592}{2} \log_{10}[Cd^{2+}]$$

Dans l'autre sens on fait de l'ampérométrie.

On veut doser ce qui est en solution (Cd^{2+}) → on s'oppose à l'oxydation du Cd en Cd^{2+} . On crée pour ça un courant électrique et on observe donc des pertes par effets Joule et une polarisation des électrodes.

$U = RI$ est une équation linéaire alors que dans ce cas on a une vague voltampérométrique (même aspect que courbe de croissance de MO).

Cf cours de L2 sur les potentiels membranaires.

En voltampérométrie, on ne veut réduire/oxyder qu'une partie infime de l'analyte qui est au voisinage de l'électrode.

Plus le potentiel est négatif plus on va réduire fort.

En électrogravimétrie, on veut tout réduire, il va falloir faire passer un courant important, utiliser des électrodes de grandes surfaces et agiter la solution. L'ion (ou espèce à oxyder/réduire) va se déposer sur l'électrode :

→ On mesure par gravimétrie l'augmentation de poids de l'électrode → électrogravimétrie.

→ On va mesurer la quantité d'électricité nécessaire à la réduction de la totalité du Cd^{2+} en solution → Coulométrie.

$$dQ = Idt \text{ et } Q = \int Idt$$

En électrogravimétrie le dépôt doit être insoluble (un métal), la méthode est peu utilisée, elle nécessite de fortes concentrations d'analytes (la pesée est peu sensible) et n'est pas adaptée à l'analyse de traces.

On plonge l'électrode dans la solution et on applique une ddp = 2,5V, on a un courant de l'ordre de 1,5A qui dépend de la surface de l'électrode (0,1A/cm²), la concentration de l'analyte, la tension de polarisation, etc.

Ex : solution acide de Cu²⁺, Pb²⁺, Co²⁺, Ordre de réduction :



On polarise a -2,5V

$$E = -2,5\text{V} = RI + E_{\text{cathode}} + E_{\text{polarisation}}$$

Cf Katya pour schéma.

Le Cu²⁺ sera le premier réduit, il prendra l'ensemble des électrons, U = RI intense et donc E_{cathode} sera petit. Au cours de la réduction le cuivre diminue, donc RI diminue, E = -2,5 est constant et E_{cathode} diminue, lorsque cuivre disparu, l'hydrogène sera le suivant, etc.

Or l'hydrogène fait partie du solvant acide donc on ne pourra pas l'épuiser, sa concentration va rester constant mais on aura un dégagement gazeux qui va empêcher les autres espèces de se réduire sur l'électrode et le dépôt n'adhère pas bien à l'électrode. H⁺ est donc un dépolarisant. Puis le plomb commence à se réduire à un certain potentiel mais le Cu n'a pas fini de se réduire, donc des interférences. E_{cathode} n'arrive pas à atteindre la valeur nécessaire à la réduction du Cobalt, à cause de la réduction des ions H⁺, on laisse l'hydrolyse se réaliser jusqu'à ce que la réaction soit complète, on arrête, on sèche, on rince et on pèse l'électrode, on déduit m_{Cu²⁺} + m_{Pb²⁺}. Cette technique n'est pas beaucoup sélective, elle est très utilisée pour doser l'argent, le brome, le cadmium, le cuivre, le manganèse, nickel, plomb et zinc. Ce sont essentiellement des électrodes en platine qui sont utilisé avec parfois un petit dépôt de cuivre pour des problèmes de réactivité des analytes.

On peut travailler en régime potentiostatique, sans contrôle de la tension de polarisation → mesure non spécifique, le Pb à commencé a se réduire alors que le Cu n'avait pas totalement été réduit, donc le Pb et Cu seront pesée ensemble ; → contrôle le potentiel on peut alors se limiter au potentiel de réduction d'une seule espèce.

Montage à 3 électrodes, les réactions se réalisent sur l'électrode de travail :

Oxydation des anions organiques, anode.

Réduction des cations métalliques, cathode.

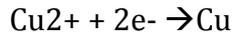
Cela permet de protéger l'électrode de référence mais sans le problème des pertes par effet Joule. La mesure se fait entre celle de référence et celle de travail ou il n'y a pas de courant et d'effet Joule.(et plus entre celle de travail et l'auxiliaire). E_{cathode} va toujours diminuer comme avant mais on peut désormais mesurer la compensation nécessaire pour que le potentiel de cathode soit constant. On arrête lorsque le courant est 1000 fois plus petit que celui de départ (erreur de 0,1%).

Le choix des l'électrodes → toiles métalliques, en platine (inerte), facilement nettoyable et pouvant être calciné (pour enlever les résidus). Il est inutile de faire des courbes de calibrages, la pesée étant une mesure absolue.

La coulométrie :

Principe identique, on ne pèse plus, on mesure la quantité de courant.

Ex : électrolyse complète d'une solution de Cu^{2+} nécessite 15,2 minutes à 0,8A. Quelle est la concentration en Cu^{2+}



1 mole de Cu déposé \leftrightarrow 2 moles d'e-. Attention, I varie avec le temps.

Il faut prendre $Q = \int I dt$, car $Q = It$ est fausse.

On distingue la coulométrie à potentiel constant (I varie) : régime Potentiostatique ; la coulométrie à courant constant (E varie) : régime ampérostatique.

Dans le régime potentiostatique, il faut intégrer $Q = \int I dt$

Ex : précédent : on trouve expérimentalement $Q = 729,6$ coulomb soit $7,56 \times 10^{-3}$ moles d'e-, ou 3,78 moles de Cu^{2+} soit enfin 0,240g de Cu^{2+} .

Dans le régime ampérostatique : $Q = It$, on impose une intensité constante entre les électrodes, il faut faire varier la tension $E_{\text{alimentation}}$. Imaginons que j'impose $I_{\text{imposé}}$, au début (concentration de Fe^{2+} = niveau 1) E environ égal à $E_{1/2}$. Quand concentration de fer = niveau 2, $E = E_2$, quand concentration de fer = niveau 3, E est trop grand. On ne pourra pas vider l'espèce en régime ampérostatique car on risque d'hydrolyser l'eau (consomme 4 électrons) et donc on ne pourra pas l'épuiser.

Le régime potentiostatique est préférable pour faire des dosages car en ampérostatique on aura dosage « par défaut ». On peut ajouter des capteurs d'électrons (Brome ou Ce^{3+}) qui vont être oxydés avant l'eau et qui vont oxyder à leurs tours le Fe^{2+} .

Quand les concentrations sont trop faibles (10^{-7}M), on procède à un dépôt sur l'électrode (réduction des cations ou oxydation des anions) et ensuite une re-dissolution du dépôt (oxydation des cations ou réduction des anions).

L'analyse se déroule en 3 étapes :

- 1) phase d'enrichissement de 1min (pour les dilutions de l'ordre de 10^{-7}M) à 30min pour les dilutions de l'ordre de 10^{-9}M) avec agitation. On se place à un potentiel volontairement très négatif, quelque $1/10^{\text{ième}}$ de volts sous $E_{1/2}$ de l'espèce analysée (Cd^{2+}). Les espèces électroactives se déposent sur l'anode par réduction (cations métalliques) ou sur la cathode par oxydation (anions organiques).
- 2) On arrête l'agitation.
- 3) On remonte doucement la valeur de la tension (de moins en moins négative) en fixant une intensité constante (coulométrie à intensité constante). Les électrodes agissent à présent en cathode (cations métalliques) ou en anode (anions organiques). La surface du pic sera proportionnelle à la quantité déposée sur l'électrode.

Si on a un mélange de plusieurs analytes en solution (par exemple Cd^{2+} et Cu^{2+}) on opère de même : on dépose tous les analytes réductibles à l'aide d'un potentiel très négatif (-1,0V), on remonte doucement la tension (de moins en moins négative) en fixant une intensité constante (coulométrie à intensité constante) et on enregistre le courant.

LES ELECTRODES SELECTIVES

Il s'agit d'une différence de potentiel qui se développe entre les deux cotés d'une membrane fine. Dans l'électrode on aura le composé qu'on veut doser et c'est la différence de concentration qui donnera une différence de potentiel sur la membrane.

Pour doser plusieurs composés il faudra plusieurs électrodes. Si on veut doser les ions H^+ on utilise une électrode de pHmétrie (membrane de verre).

Potentiels de membrane :

$$E_m = E^0 + \frac{0,0592}{n.z} \text{Log}_{10}[A_{i,ext}]$$

$$E_m = E^0 - \frac{0,0592}{n.z} p_{i,ext}$$

Pour étalonner la pente pour dosage H^+ doit être égale à $-0,0592 \rightarrow$ suivit de la fiabilité.
Courbes : cf katya

Il existe de très nombreuses électrodes à membranes :

- Cristallines
- Polycristallines
- Amorphes (en verre, ex : pHmètre)
- Liquides
- Gazeuse (membranes perméables aux gaz)
- Biocatalytique (les meilleurs qui permettent de doser de très nombreux composés)

La durée de vie de l'électrode dépend des types de travaux pour lesquelles utilisées et la façon de les utiliser.

Electrode de verre : tube en verre avec une paroi/membrane très fine et fragile, remplie d'une solution de remplissage avec un pH bien précis pour mesurer des pH. La fine membrane de verre est dopée par de fortes concentrations de Na^+ (20 à 25%). 1 Si lié à 4 Oxygène. Il y a un fil d'argent recouvert de chlorure d'argent, on aura donc une mesure de potentiel qui ne démarre pas à 0 mais vue qu'on fait une différence de potentiel avec une deuxième même électrode dans la solution, ce n'est donc pas un problème.

La membrane est un polymère de silice (SiO_2), la sodium rajouté sert à faire un échange entre le sodium et les ions H^+ de la solution, et va donner lieu à de l'hydratation du verre. Il y aura donc une fine couche d'acide silicique à la surface de l'électrode sur le coté interne et externe de l'électrode (puisque du liquide dans l'électrode). Il ne faut jamais laisser sécher une électrode, sinon elle ne pourra plus être hydratée. Elle doit être stockée dans du KCl concentré lorsqu'on utilise pas l'électrode durant un long moment, et si utilisation plusieurs fois par jours, dans de l'eau distillée.

La réciproque (lorsque H^+ diminue) est vraie, il apparaît ainsi une différence de potentiel $E_{ext} - E_{int} = E_m$ qui dépend de la concentration des H^+ à l'extérieur et donc du pH de la solution analysée.

$$E, ind : E + 0,0592 \cdot \text{Log}_{10}[H^+, ext] = E - 0,0592 \cdot pH$$

$$E_{ind} = E_{asym} + 0,0592 \cdot \text{Log}_{10} \frac{[H^+_{ext}]}{[H^+_{int}]}$$

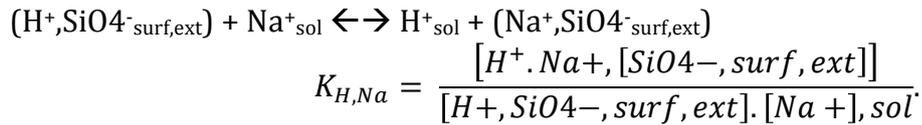
H^+_{int} est constante.

$E_{ind} = E$ indicateur.

Si on trempe une électrode dans la même solution qu'il y a à l'intérieur, on ne trouve pas une différence de potentiel de 0 \rightarrow due au potentiel d'asymétrie, car l'électrode de verre est de forme sphérique et donc on n'a pas le même rayon de courbure à l'intérieur et à

l'extérieur, il y a donc une différence de contrainte et donc les deux potentiels ne s'annulent pas et on appelle cette différence le potentiel d'asymétrie. Il y a de plus des molécules qui s'adsorbent sur le côté extérieur au fur et à mesure des mesurages et c'est en suivant ce potentiel d'asymétrie qu'on pourra déterminer l'état de propreté de notre électrode. On peut nettoyer la surface de celle-ci en trempant dans des détergents, des protéases (trypsines), et sinon poubelle. L'acide fluoridrique fait fondre le verre et donc la couche externe du verre est « épiluchée » et ne permet pas de restaurer l'efficacité de l'électrode et de plus produit très dangereux.

La sélectivité : on espère qu'une électrode soit la plus sélective possible de l'ion recherché (H^+ dans notre cas), or on sait que les ions Na^+ réagissent aussi avec l'électrode :



$$E_m + E'' + 0,0592 * \text{Log}_{10} \left([H^+]_{ext} + k_{H,Na} * \frac{\mu_{Na^+}}{\mu_{H^+}} * [Na^+]^{\frac{Z_H}{Z_{Na}}} \right)$$

$Z_H = Z_{Na} = \text{charges} (=1)$

μ_H et μ_{Na} , les mobilités respectives de H^+ et de Na^+

E sera plus élevé, concentration en H^+ sera et le pH sera donc sous-estimé

Coefficient de sélectivité $k_{H,Na}$ de l'électrode.

$$k_{H,Na} = K_{H,Na} \cdot \frac{\mu_{Na^+}}{\mu_{H^+}}$$

$$E_m = E'' + 0,0592 \text{Log}_{10} ([H^+]_{ext} + k_{H,Na} [Na^+])$$

Si $k_{H,Na} = 0$, sélectivité parfaite (pas d'interférence). Si l'électrode répond 1000 fois moins fort pour l'ion Na^+ que pour l'ion H^+ alors $k_{H,Na} = 10^{-3}$. Très bonne sélectivité.

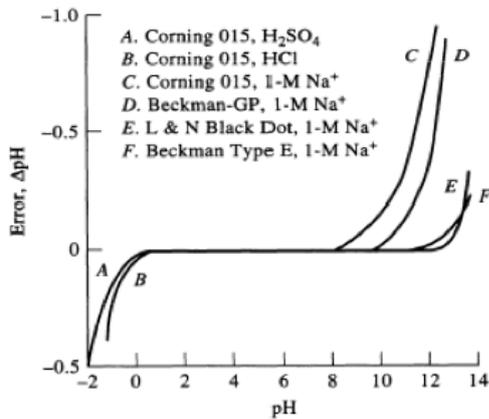
Si l'électrode répond 3 fois mieux pour l'ion Na^+ que pour l'ion H^+ alors $k_{H,Na} = 3 \rightarrow$ très mauvaise sélectivité.

Si $pH < 9$: $k_{H,Na} [Na^+] \ll [H^+]$

Si $pH > 9$ on a beaucoup de Na^+ ($NaOH$), il n'y a plus beaucoup d'ions H^+ , même si $k_{H,Na}$ est petit, il se peut que $k_{H,Na} [Na^+] > [H^+]$

De même, aux pH très faibles (inférieur à 1), il existe des dérives.

Erreur alcaline.



D'une façon générale :

$$E_m = E'' + 0,0592 \text{ Log}_{10} ([H^+_{\text{ext}}])$$

Equation de Nikolsky-Eisenmann (Forme simplifiée) :

$$E_m = E'' + 0,0592 \text{ Log}_{10} ([H^+_{\text{ext}}] + \sum k_{H,i} [i])$$

Si $k_{H,i}$ petit alors bonne électrode.

Si $k_{H,Na}$ est grand, on obtient une électrode sélective de Na⁺. On a ainsi mis au point des électrodes de verre sélectives du sodium, potassium, argent, césium, lithium, etc. En fonction de l'ion qui est ajouté dans la membrane de verre, c'est donc en jouant que la composition de verre qu'on l'on choisit l'-ion pour lequel l'électrode sera sélective.

Electrodes sélectives des ions sodium :

Na₂O (11%) Al₂O₃ (18%) SiO₂ (71%)

$$k_{Na,K} = 10^{-3}$$

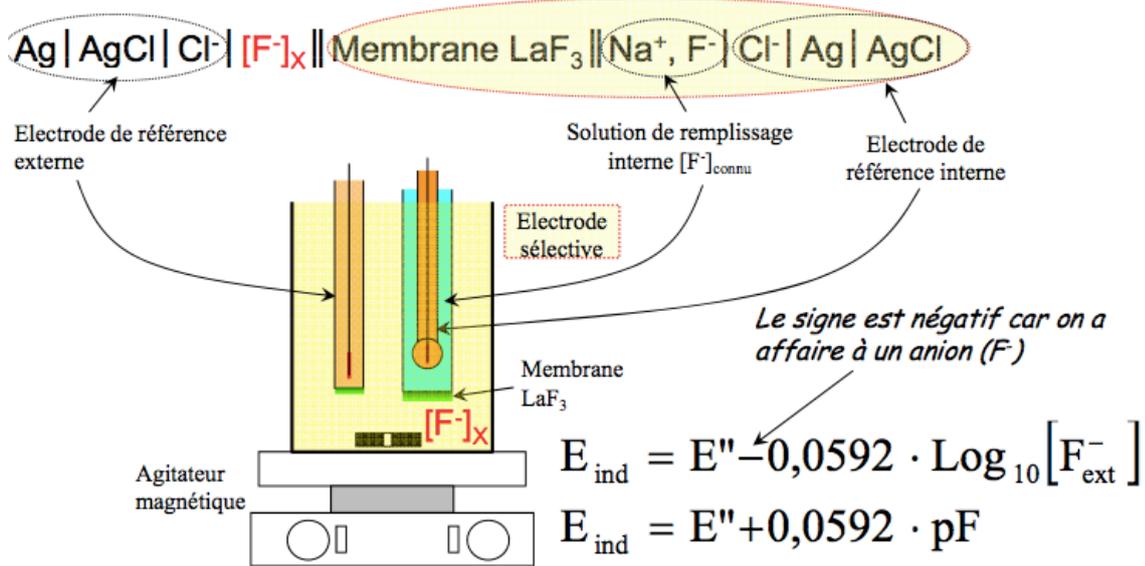
Electrodes des ions potassium :

Na₂O (27%) Al₂O₃ (5%) SiO₂ (68%)

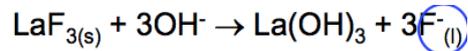
$$k_{K,Na} = 10^{-2}$$

Les membranes cristallines : il s'agit toujours de potentiométrie. Elles sont soit taillées dans un monocristal, soit constituées d'un disque obtenu par agglomération de poudres sous hautes pressions (fritté). La membrane utilisée doit être insoluble dans le solvant à doser. Elle est constituée en un sel insoluble de l'ion à mesurer.

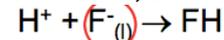
On utilise le fluorure de Lanthane (LaF₃) comme cristal de base, il est dopé avec des fluorures d'europium (EuF₂). L'apparition d'un potentiel de membrane est tout à fait identique à celui qui a été décrit lors de l'étude des électrodes de verre pour les ions H⁺.



L'électrode a F⁻ est une des plus spécifique cependant : en milieu alcalin on fait une erreur par excès (on surdose) à cause des ions OH⁻ mais aussi car OH⁻ agit sur l'électrode :



Ce qui a pour effet d'augmenter la concentration de F⁻ en solution. En milieu acide, au contraire, on a :

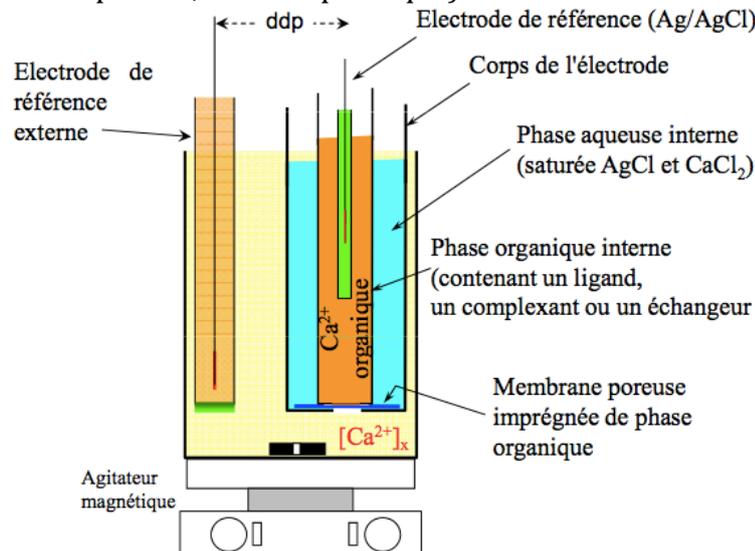


Ce qui a pour effet de diminuer la concentration en F⁻ en solution.

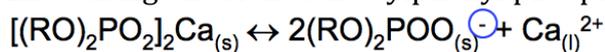
Donc il convient de travailler à pH 5-7, enfin il existe des ions qui complètent les fluorures (Al³⁺, Fe³⁺). Il convient donc de masquer ces ions gênants, donc dans un tampon de force ionique contrôlée : TISAB (Total Ionic Strength Adjuster Buffer).

Il y aussi des électrodes cristallines pour doser le cyanure, le sodium (verre).

Les électrodes à membranes liquides : La surface sensible de ces électrodes se situe au niveau d'une interface liquide-liquide. C'est une phase spécifique avec un solvant organique polaire et non miscible à l'eau et très souvent contient un ligand organique pour améliorer le système. Ce liquide est immobilisé sur un support inerte (verre fritté, téflon poreux, matière plastique).



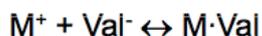
Ex : échangeur d'ions : dioctylphényl phosphonate.



La position de l'équilibre dépend de la concentration de Ca^{2+} dans la solution. Le groupement est bien hydrophobe et va rester sur la membrane et va mettre en place différence de potentiel négatif sur la membrane.

Il y a aussi des séquestrant comme la valinomycine

Dans du PVC



$$K_{val}(M) = \frac{[M \cdot Val]}{[M^+][Val^-]}$$

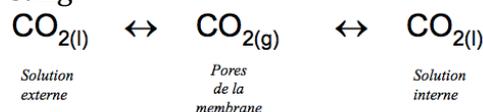
Pour les cations K^+ ; $\log_{10}[K_{val}(K^+)] = 4,5$
 Pour les cations Ca^{2+} ; $\log_{10}[K_{val}(Ca^{2+})] = 0,7$
 Pour les cations NH_4^+ ; $\log_{10}[K_{val}(NH_4^+)] = 1,7$
 Pour les cations Na^+ ; $\log_{10}[K_{val}(Na^+)] = 0,5$

La complexation des ions K^+ est donc plus forte de 3 à 4 fois.

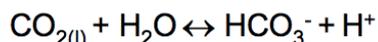
On peut aussi utiliser des éther couronnes.

Taille des cavités d'éthers couronne et de certains ions				
Diamètre du cation (Å)	Li^+ 1,2	Na^+ 1,9	K^+ 2,7	NH_4^+ 3,34
Diamètre de la cavité (Å)	14-Cr-4 1,3	15-Cr-5 2,0	18-Cr-6 2,9	21-Cr-7 3,9

Les électrodes à membranes gazeuse : il s'agit toujours de simples électrodes contenant une électrode de référence (Ag/AgCl) et une membrane (PTFE) mince (0,1 mm) et poreuse perméable aux gaz qui permet aux petites molécules de migrer et de se dissoudre dans la solution interne. Cela permet de doser par exemple le CO_2 dans le sang.



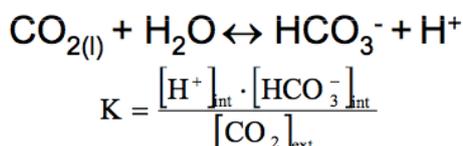
Dans la solution interne s'établit l'équilibre :



L'apparition de H^+ peut être quantifiée à l'aide d'une électrode de pH

L'apparition de H^+ peut être quantifiée.

L'équation chimique globale s'écrit ainsi :

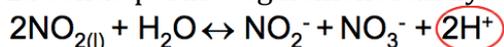


Si lors de la concentration $(\text{Na}^+, \text{HCO}_3^-)_{\text{int}}$ est suffisamment élevée (10^{-2}M), elle ne sera pas affectée par les quelques molécules de CO_2 qui vont migrer au travers de la paroi. $(\text{HCO}_3^-)_{\text{int}}$ est considérée comme constante.

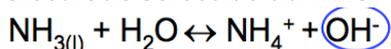
$$K_g = \frac{[\text{H}^+]_{\text{int}}}{[\text{CO}_2]_{\text{ext}}} \text{ ou encore } [\text{H}^+]_{\text{int}} = K_g \cdot [\text{CO}_2]_{\text{ext}}$$

$$E_{\text{ind}} = E'' + \frac{0,0592}{1} \cdot \text{Log}_{10}(K_g \cdot [\text{CO}_2]_{\text{ext}}) = E'' + \frac{0,0592}{1} \cdot \text{Log}_{10}[\text{CO}_2]_{\text{ext}}$$

La sonde permet également l'analyse du NO_2

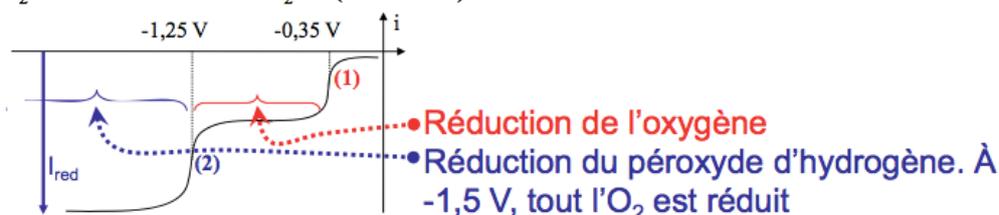
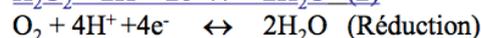


Si on remplace la solution interne de $(\text{Na}^+, \text{HCO}_3^-)$ par du $(\text{NH}_4^+, \text{Cl}^-)$ on obtient une électrode sélective du NH_3 -



Dosage de HF, H_2S , SO_2 , NO_2 , HCN aussi possibles.

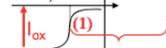
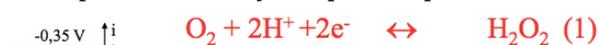
Electrode de Clark: dosage de l'oxygène (dans le sang par exemple) → voltampérométrie sélective. PTFE = téflon, membrane très fine de 10microns d'épaisseur, très poreuse et perméable à l'oxygène. On trempe dans la solution interne une électrode particulière, tube en plastique avec au bout un disque métallique et un anneau qui l'entoure avec isolant entre, on aura 1,5volt de différence de potentiel entre anode et cathode. L'oxygène arrive à la cathode, et on aura des réactions d'ox/red



L'intensité sera 4 fois plus grande que le nombre de mole d'oxygène consommé.

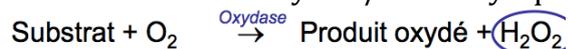
On peut aussi doser l'eau oxygénée :

Il est possible d'oxyder par ampérométrie de l'eau oxygénée (réaction 1)



• Oxydation du peroxyde d'hydrogène.
 $E > -0,35 \text{ V}$, En pratique on se place à $+0,8 \text{ V}$

Les électrodes à enzymes/biocatalytiques



Ex : glucose avec glucose oxydase.

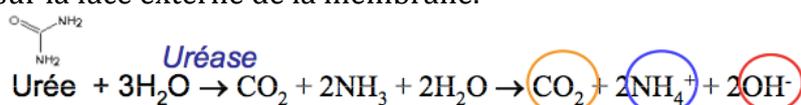
De nombreuses analyses possibles : lactate oxydase, cholestérol oxydase, divers amino acides oxydases, éthanol oxydase, glutamate oxydase, lysine oxydase, oxalate oxydase,

etc. Très sélectif car des enzymes qui peuvent même doser des isomères. Elles sont immobilisées sur la membrane de l'électrode de Clark par exemple.



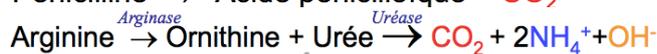
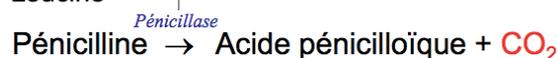
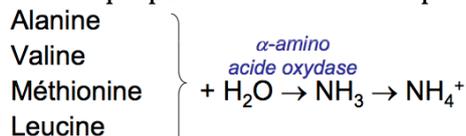
Dans un glucomètre commercial on dépose une goutte de sang sur une mèche hydrophile qui attire tout les produits hydrophiles et laisse toutes les lipides, etc, on a 2 électrodes, une qui va oxyder le glucose et l'autre va oxyder le peroxyde l'hydrogène en O₂ qui sera dosé. On peut aussi doser l'O₂ consommé par la réaction par réduction ampérométrique de l'O₂ à -1,25V < E < -0,35V (pour éviter l'interférence d'H₂O₂).

Soit on ajoute l'enzyme dans la solution, soit on fixe cette enzyme sur l'agitateur magnétique (utilisation d'électrode universelle), il peut se produire un dégagement de gaz du à la réaction, en fait, pour économiser l'enzyme (qui coûte cher), on l'immobilise sur la face externe de la membrane.



On dose OH⁻ s'il s'agit d'une électrode de verre sensible aux ions H⁺ (électrode de verre), on peut doser NH₄⁺ s'il s'agit d'une électrode de verre sensible aux ions NH₄⁺ (en verre) ou doser le CO₂ s'il s'agit d'une électrode sensible au CO₂ (électrode à gaz).

L'alpha-aminoacide oxydase catalyse la décomposition des alpha-acides aminés en NH₄⁺ qui pourra être détecté par une électrode de verre sensible aux ions NH₄⁺



Toutes ces électrodes présentent des sélectivité plus ou moins bonne : équation de Nikolsky-Eisenmann :

$$E_{\text{ind}} = E'' + \frac{0,0592}{n} \cdot \text{Log}_{10} \left\{ [\text{ion}] + \sum_{i=1}^n \left(K_{\text{ion,interf}_i} \cdot \frac{\mu_{\text{interf}_i}}{\mu_{\text{ion}}} \cdot [\text{interf}]^{\frac{z_{\text{ion}}}{z_{\text{interf}_i}}} \right) \right\}$$

Les électrodes ne donnent accès qu'à la mesure de la concentration des ions LIBRES. Elles ne donnent pas accès à la teneur totale en un composé. On mesure l'ACTIVITE d'un ion et non pas sa CONCENTRATION, il convient de bien contrôler le pH, toujours faire les mesures dans le tampon TISAB (sauf si on veut mesurer le pH), il faut également contrôler la température et la présence éventuelle d'agents complexant et préférer la méthode des ajouts dosés.

Les chromatographies modernes :

La résolution, la sélectivité et la sensibilité sont les maîtres mots de la chromatographie. La résolution est le facteur principal. Si le pic n'est pas une gaussienne, c'est que les deux phases utilisées ne sont pas adaptées au composé.

s/b = signal sur bruit, si inférieur à 3 le pic n'est pas considéré comme détectable. Si supérieur à 10, on peut quantifier le produit. La résolution doit être de 1,5 au minimum pour pouvoir différencier les pics car que 2% d'erreur.

On peut travailler sur la sélectivité de détection pour supprimer les pics interférents avec des détecteurs sélectifs (MS et MS/MS, fluorescence, NPD, ECD, etc.). Les solvants doivent être miscibles pour faire des mélanges de solvants.

Filtration sur membrane de 0,45 microns pour éviter les poussières.

On peut augmenter la pression de la phase mobile (pompe en HPLC, pression du gaz en GC) → les pics seront plus larges et risques de chevauchement, on peut augmenter la température → diminue viscosité de la phase mobile et donc pression plus limite et produits sortent mieux → paramètre fondamental, on peut diminuer la longueur de la colonne → perte de résolution, raidir les gradients (HPCL) ou les rampes de température (GC).

Toute accélération entraîne des conséquences sur la qualité des chromatogrammes.

Les nouvelles colonnes de GC sont des colonnes creuses en fibre de verre de 250 microns de diamètres internes sur des longueurs variables. Une phase stationnaire est greffée sur le Quartz et tapisse l'intérieur et a une épaisseur de 10 microns. La colonne est revêtue d'un revêtement de polyimide qui permet de rendre flexible le verre.

La théorie cinétique est caractérisée par 3 phénomènes :

- diffusion moléculaire longitudinale
 - h = hauteur du plateau théorique
 - D_m = coefficient de diffusion
 - G = constante de proportionnalité
- transfert de masse dans la PS : plus la couche de PS est épaisse plus le pic sera large, donc nécessité d'avoir couche fine.
 - d_p^2 = diamètre de la particule
 - D_s = coefficient de diffusion de la PS
- anisotropie d'écoulement : λ = forme de la particule.

En diminuant la taille des particules, on perd peut de résolution lorsqu'on augmente la pression ou vitesse et d'ailleurs on doit aller plus vite lorsque grains plus vite. En réduisant la taille du grain, la perte de charge (perte de pression) va augmenter.

Introduction à la protéomique

(Peter Horvatovich)

1. Introduction à la protéomique

Protéines composées d'acides aminés qui peuvent être regroupés selon leurs propriétés physicochimiques. Association des acides aminés par des liaisons peptidiques.

PTM = post translational modifications.

L'empreinte peptidique ou tandem MS après Bottom up.

Détermination de la charge des protéines, spectromètres de hautes résolutions, dissociation par ECD (electrocapture detection) et ETD (electrotransfer detection) après approche top-down.

2. Approche par électrophorèse 2D

Méthodes de visualisations des protéines les plus utilisées : bleu de coomassie, coloration à l'argent, coloration fluorescente, isotopes radioactifs, coloration par activité.

3. Approches de protéomique dirigée

4. Méthodes chromatographies

5. Systèmes intégrés

6. Marquage par isotope stable

7. Puce à protéines – criblage à haut débit