La "RMN Chromatographique"

Guilhem Pagès

▶ **To cite this version:**

Guilhem Pagès. La "RMN Chromatographique". Chimie analytique. Université Paul Cézanne (Aix Marseille 3), 2006. Français. NNT : . tel-03238234

HAL Id: tel-03238234
https://hal.inrae.fr/tel-03238234

Submitted on 27 May 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PAUL CEZANNE AIX-MARSEILLE III

N° attribué par la bibliothèque :
2006AIX30041

THESE
pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PAUL CEZANNE

Discipline : Chimie analytique, théorie et spectroscopie

présentée et soutenue publiquement par **Guilhem PAGES**
le 26 octobre 2006

La « R.M.N. Chromatographique »

Directeur de thèse : Professeur Stefano CALDARELLI

Ecole Doctorale des Sciences Chimiques de Marseille

JURY :

Professeur	ALBERT	Klaus	Université de Tübingen	Allemagne
Professeur	CALDARELLI	Stefano	Université Paul CEZANNE	France
Docteur	DELAURENT	Corinne	Université Paul CEZANNE	France
Professeur	GUIOCHON	Georges	Université du Tennessee	U.S.A.
Professeur	PRIVAT	Mireille	Université de Bretagne Occidentale	France
Professeur	TCHAPLA	Alain	I.U.T. d'Orsay	France

ANNEE : 2006

UNIVERSITE PAUL CEZANNE AIX-MARSEILLE III

N° attribué par la bibliothèque
2006AIX30041

THESE
pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PAUL CEZANNE

Discipline : Chimie analytique, théorie et spectroscopie

présentée et soutenue publiquement par **Guilhem PAGES**
le 26 octobre 2006

La « R.M.N. Chromatographique »

Directeur de thèse : Professeur Stefano CALDARELLI

Ecole Doctorale des Sciences Chimiques de Marseille

JURY :

Professeur	ALBERT	Klaus	Université de Tübingen	Allemagne
Professeur	CALDARELLI	Stefano	Université Paul CEZANNE	France
Docteur	DELAURENT	Corinne	Université Paul CEZANNE	France
Professeur	GUIOCHON	Georges	Université du Tennessee	U.S.A.
Professeur	PRIVAT	Mireille	Université de Bretagne Occidentale	France
Professeur	TCHAPLA	Alain	I.U.T. d'Orsay	France

ANNEE : 2006

À mon ami Benjamin que je n'oublierai jamais,

Oui mais jamais, au grand jamais
Son trou dans l'eau ne s'refermait
Cent ans après coquin de sort
Il manquait encore

Georges Brassens, Les Copains d'abord

À mes grands-parents, Papi Jeannot et Mamie Lulu
Papi Bonbon et Mamie Arlette

Le premier pastis, tu le bois par soif,
Le deuxième, ben tu commences à y trouver du goût,
Au troisième t'apprécies enfin !

Jean-Claude Izzo, Total Khéops

REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait pas pu être réalisé sans le soutien financier du **laboratoire pharmaceutique DistriB3** et du **conseil régional de Provence-Alpes-Côte-d'Azur**. Que Monsieur le **Pharmacien Alain Montel**, PDG de la société DistriB3, soit assuré de ma gratitude.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au **Professeur Stefano Caldarelli** pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir confié ce sujet de thèse. Un grand merci au **Docteur Corinne Delaurent** sans qui mon CV ne ressemblerait pas à ce qu'il est aujourd'hui.

Je remercie le **Professeur Georges Guiochon** et le **Professeur Klaus Albert** d'avoir accepté d'évaluer ce manuscrit.

Que le **Professeur Alain Tchapla** et le **Professeur Mireille Privat** reçoivent toute ma reconnaissance pour avoir accepté d'examiner mes travaux.

Je témoigne toute mon amitié aux **Docteurs Stéphane Viel** et **Fabio Ziarelli** pour m'avoir appris la pratique de la RMN et s'être investis lorsque j'avais besoin d'aide, ainsi qu'à **Didier Pujol**, véritable « docteur » des chromatographies.

Mes salutations vont à l'ensemble des membres de la J.E. TRACES et de Spectropôle.

Je tenais à remercier **l'ensemble du personnel du laboratoire pharmaceutique DistriB3**, avec qui j'ai pu partager une belle année avant de commencer ces travaux, pour leur gentillesse et amitié qu'ils m'ont témoigné.

Une partie des travaux non présentée dans ce manuscrit a été réalisée en collaboration avec le **Professeur Michelle Sergent,** le **Professeur Roger Pan-Tan-Luu,** le **Professeur Jean-Marc Roussel** et le **Professeur Laurence Charles** à qui j'exprime toute ma gratitude ainsi qu'aux stagiaires qui y ont participé : Michael, Laure, Grégory, Nathalie, Isabel et Laetitia.

J'adresse des remerciements particuliers **aux personnes qui m'ont fait découvrir et partager leur passion pour la plongée sous-marine** qui est devenue la mienne maintenant : Jean-Michel, Frank et Cyrille.

Que **mes collègues arbitres** et plus particulièrement ceux qui sont membres de la CRAMC de la Ligue de Provence trouvent dans ces quelques lignes toute l'amitié que je leur porte. Aux souvenirs des réunions, stages, soirées et des fameux « charters » passés ensembles pour travailler ou s'amuser. Bref, que des bons moments (enfin presque) avec Jean-Pierre, Arnaud P, Arnaud D, Damien, José, Danielle, Laurent, Bernard, Cyrille.

Je tiens à témoigner ma grande reconnaissance à **mes parents** qui m'ont laissé libre de mes choix tout au long de mon parcours, ainsi qu'à mon frère **Loïs**, ma sœur **Laurà** et à **Stéphanie**. A **mes amis** (Fanny et Doumé, Laetitia, Cyrille, Sandie, Damien, Arnaud D et P, José et Danielle, Isabelle, Pierre, Fabio, Stéphane…) qui m'ont encouragé, soutenu et avec qui j'ai partagé de bons moments : quelques verres de pastis (parfois en quantité déraisonnable), quelques chasses sous-marines ou plongées, des randonnées, des discussions pour refaire le monde et de bonnes bouffes.

SOMMAIRE

INTRODUCTION 11

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 15

1. Introduction 17

2. La mesure de coefficients de diffusion par RMN 17
2.1. L'autodiffusion 18
2.2. Les gradients de champ magnétique 20
2.2.1. Principes 20
2.2.2. Les différentes séquences d'impulsions 22
2.2.2.1. L'écho de spin 23
2.2.2.2. L'écho stimulé (STE) 25
2.2.2.3. Gradients bipolaires et suppression des courants de Foucault 26
2.2.3. Traitement des données 27
2.2.3.1. Diffusion-ordered spectroscopy 28
2.2.3.2. Autres méthodes d'exploitation des résultats 29

3. La RMN d'échantillons hétérogènes 30
3.1. Interactions magnétiques en milieu anisotrope 31
3.1.1. Susceptibilité magnétique et échantillons hétérogènes 32
3.1.2. L'interaction dipolaire 32
3.1.3. L'anisotropie de déplacement chimique 33
3.1.4. La rotation à l'angle magique 34
3.2. Les spécificités de la sonde HRMAS 35
3.2.1. Les technologies des fournisseurs : 36
3.2.2. L'homogénéité du champ magnétique 36
3.2.3. Les gradients de champ magnétique 39
3.3. Quelques exemples d'applications de la RMN HRMAS 40
3.3.1. La synthèse sur support solide 40
3.3.2. Le domaine biomédical 41
3.3.3. L'agroalimentaire 42
3.3.4. Mesure de la diffusion avec une sonde HRMAS 42

4. L'utilisation de la RMN pour appréhender la chromatographie 43
4.1. La caractérisation de phase par RMN du solide 44
4.2. La HRMAS pour une mise en évidence des interactions 45
4.3. Des impulsions de gradients et des mesures de diffusions pour caractériser les interactions support/liquide 47
4.3.1. L'imagerie du processus chromatographique 47
4.3.2. La distribution de déplacement moléculaire moyen 49
4.3.2.1. Principes 49
4.3.2.2. Exploitation de la méthode 51
4.3.3. La diffusion en HRMAS 54

5. Les moments pour une compréhension de la chromatographie liquide haute performance à polarité de phase inversée 55
5.1. La théorie 56
5.2. Les résultats 58

MATERIELS ET METHODES 63

1. Matériels 65
1.1. RMN HRMAS 65
1.2. Chromatographie 65
1.3. Phases chromatographiques, solvants et solutés 66

2. Méthodes 67
2.1. Préparation de l'échantillon RMN 67
2.2. Réalisation d'une expérience RMN PGSE 67
2.3. Traitement des données 69

RESULTATS ET DISCUSSION 71

1. Introduction 73

2. Optimisation des conditions opératoires 73
2.1. Préparation de l'échantillon 74
2.1.1. Volume de liquide dans le rotor 74
2.1.2. Durée entre la préparation de l'échantillon et la mesure 75
2.1.3. Concentration des solutés 76
2.1.4. Nature du solvant 77
2.2. Influence des paramètres MAS 79
2.2.1. Vitesse de rotation 79
2.2.2. Volume du rotor 80

3. Influence des propriétés du mélange liquide 81
3.1. Etude des greffons 81
3.1.1. Etude du spectre RMN 1D 82
3.1.2. Isotope du solvant 84
3.1.3. Composition du solvant 85
3.1.4. Modifiant organique 86
3.2. Diffusion des solutés 88
3.2.1. Influence de la phase stationnaire 89
3.2.2. Variation de la composition de la phase liquide 92
3.2.3. Influence de la température : une énergie d'activation ? 95
3.2.4. Nature du déplacement des solutés 99
3.3. Conclusion 101

4. Influence des propriétés du support stationnaire 101
4.1. Comparaison des silices vierge et greffée 102
4.1.1. En RMN Chromatographique 102
4.1.2. En CLHP 104

4.2. Rôle du pore 106
4.2.1. Mise en évidence grâce à un support non poreux 107
4.2.2. Diffusion des greffons 109
4.2.3. Influence du diamètre moyen du pore 110
4.2.3.1. Sur le solvant 110
4.2.3.2. Sur les solutés 112
4.3. Conclusion 114

5. Limitations de la technique et perspectives 115
5.1. Problèmes technologiques et de traitement des données 115
5.2. Problèmes dus au système 116
5.3. Perspectives 117

CONCLUSION 119

REFERENCES 121

GLOSSAIRE 129

ABREVIATIONS 131

NOTATIONS 133

LISTE DES TABLEAUX 137

LISTE DES FIGURES 139

INTRODUCTION

Il y a un siècle, en 1906, le botaniste Mickaïl Tswett (1872 - 1919) réalisa la première séparation physique des différents constituants d'un mélange. La filtration sur une colonne de carbonate de calcium d'une solution à base de feuilles d'épinards lui permit de mettre en évidence une séparation des différents pigments. La chromatographie, du grec *khrôma* signifiant pigment et *graphein* pour l'écriture, venait de voir le jour. Cette technique s'est développée en un siècle comme très peu de technologie, au point d'être aujourd'hui la techniques séparative la plus utilisée dans les laboratoires. Le principe de séparation repose sur une différence de distribution des analytes entre deux phases non miscibles. L'une d'elle fixe est appelée phase stationnaire et l'autre, en mouvement constitue la phase mobile. Les espèces à séparer sont entrainées par la phase mobile, et peuvent être retenues par la phase stationnaire suivant leur affinité. Les solutés présentent donc des vitesses de déplacements différentes ; il s'agit du phénomène de rétention.

Le mode de chromatographie liquide le plus utilisé est la chromatographie de partage à polarité de phase inversée, associant une phase stationnaire hydrophobe et une phase mobile liquide hydrophile. Il existe un nombre considérable de supports chromatographiques et il est difficile, à priori, d'évaluer la phase la plus adaptée aux objectifs de l'analyste. Dans ce contexte, un des moyens pour prédire les propriétés de rétention du support chromatographique consiste à effectuer des tests dans des conditions précises pour estimer une ou des propriétés caractéristiques de la phase stationnaire (hydrophobie, activité des silanols résiduels…). Cependant, les mécanismes de rétention et les différentes interactions mis en jeu font toujours l'objet de polémiques malgré les nombreux travaux publiés dans la littérature scientifique. La rétention est due soit à un mécanisme de partage entre les deux phases stationnaire et liquide, soit à de l'adsorption des analytes sur le support, ou encore à une combinaison de ces deux mécanismes.

A l'issue de la seconde guerre mondiale, la résonance magnétique nucléaire (RMN) est apparue. La caractérisation structurale d'échantillons liquides puis solides s'est développée, au point que cette technique spectroscopique est devenue un outil de choix pour les chimistes organiciens. Depuis une décennie environ, il est possible d'étudier des échantillons hétérogènes grâce à la combinaison de techniques utilisées en RMN du solide et du liquide.

La rotation à l'angle magique (*magic angle spinning*, MAS), utilisée à l'état solide, permet de moyenner à zéro les interactions anisotropes présentes dans ce type d'échantillon tandis que les séquences d'impulsions sont issues de la RMN du liquide. L'utilisation d'une sonde haute résolution avec rotation à l'angle magique (*high resolution magic angle spinning*, HRMAS) permet d'obtenir des spectres RMN présentant une résolution proche de celle obtenue en RMN du liquide.

En RMN, le déplacement des molécules peut être codé dans la séquence d'impulsion, à partir de gradients de champ magnétique, puis extrait des données expérimentales pour mesurer le coefficient d'autodiffusion. Cette technique a connu un nouvel essor lorsque Johnson a eu l'idée de représenter les résultats sous la forme d'une carte à deux dimensions pour laquelle une des dimensions représente le coefficient d'autodiffusion, propriété caractéristique de la molécule et l'autre dimension les déplacements chimiques des solutés, permettant ainsi l'obtention du spectre de chaque composé d'un mélange. La faible résolution dans la mesure de la diffusion constitue le principal désavantage de cette technique. Une méthodologie permettant notamment d'augmenter la résolution spectrale a été découverte et développée au laboratoire. L'ajout d'une phase stationnaire chromatographique est utilisé pour ralentir sélectivement les molécules d'un mélange et augmenter ainsi la différence entre les coefficients de diffusion. Dans ce cas précis, il convient de parler plus particulièrement de coefficients de diffusion apparents (*apparent diffusion coefficient*, ADC). De même, il convient d'insister sur le fait que la technique développée au cours de ce travail de recherche permet de réaliser des séparations spectrales : séparations observables uniquement sur l'écran de l'ordinateur et non pas au sein de l'échantillon ; *a contrario* des techniques chromatographiques qui impliquent des séparations physiques et donc, le cas échéant, la possibilité d'isoler les molécules constitutives d'un mélange. Tout au long de ce manuscrit, le terme de « séparation » sera utilisé sans distinction dans les deux cas ; le qualificatif de « spectrale » ou « physique » étant finalement implicite selon la technique mise en œuvre.

Plutôt que de développer des applications de cette technique RMN, à savoir multiplier les exemples de séparations de composés en mélanges, nous avons entrepris d'appréhender les interactions qui se déroulent à l'intérieur du rotor. Cette approche à deux objectifs. Le premier est la compréhension des interactions mises en jeu dans le rotor pour prédire les propriétés séparatives d'une phase chromatographique. Le second porte sur la compréhension d'une partie des phénomènes intervenant au cours du processus chromatographique et plus particulièrement au niveau ou à proximité de la phase stationnaire.

Dans une première partie consacrée à l'étude de l'art, la RMN à gradient de champ magnétique sera abordée comme un outil dans la détermination des coefficients d'autodiffusion. Puis nous montrerons comment la MAS permet d'obtenir des spectres de composés en mélange présentant une bonne résolution spectrale et nous présenterons les avancés technologiques développées pour ces applications. Ensuite, les travaux réalisés en RMN pour caractériser les interactions à la surface d'une phase stationnaire chromatographique seront détaillés. Comme les résultats obtenus en RMN Chromatographique seront comparés à ceux obtenus en chromatographie liquide haute performance (CLHP), nous nous intéresserons aux travaux réalisés principalement par Guiochon et Miyabe sur l'utilisation des moments en chromatographie, pour estimer les différentes diffusions mises en évidence au niveau des supports chromatographiques greffés.

Les résultats expérimentaux sont présentés dans la deuxième partie de ce manuscrit. Tout d'abord, l'influence des conditions opératoires sur la mesure de l'ADC sera traitée, les données seront ensuite présentées en fonction du paramètre modifié. Ainsi, nous étudierons dans un premier temps l'influence de la composition de la phase liquide sur la diffusion des solutés puis le rôle du support stationnaire sur le processus séparatif. Tous les résultats ainsi obtenus seront comparés à ceux issus d'expériences menées en CLHP.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Introduction

La CLHP à polarité de phase inversée (*reversed-phase liquid chromatography*, RPLC) consiste en l'utilisation d'une phase stationnaire hydrophobe, classiquement de la silice greffée avec une chaine carbonée fonctionnalisée ou non, et d'une phase mobile hydrophile. Cette méthode représente environ 80 % des analyses effectuées classiquement en laboratoire. Malgré ce, le mécanisme de séparation fait toujours l'objet de polémiques au sein de la communauté des chromatographistes, avec la question récurrente de savoir si la rétention est gouvernée par du partage ou par de l'adsorption. Les études actuelles montrent que ni l'un ni l'autre des mécanismes n'est exclusif en RPLC, la rétention résulterait plutôt d'une combinaison des deux. Le phénomène est d'autant plus complexe à expliquer que les supports utilisés présentent de nombreux paramètres intervenant également dans le processus chromatographique, comme la géométrie des particules et du pore... A l'heure actuelle, de nombreuses publications [1-6] tentent d'expliquer la rétention et les phénomènes mis en jeu. Pour un aperçu rapide de la complexité du problème ainsi que des nombreux travaux, il convient de se référer à ces trois revues de littérature [7-9].

Cette étude bibliographique est consacrée à la présentation de la technique utilisée au cours des travaux de cette thèse. Nous ne développerons pas les différentes techniques chromatographiques utilisées pour mettre en évidence les différents processus intervenant dans la rétention, mais nous nous intéresserons à la méthode des moments pour comprendre la rétention et à l'utilisation de la RMN, pour caractériser et appréhender les phénomènes se déroulant à l'interface de la phase stationnaire et de la phase mobile. La mesure des coefficients de diffusion par RMN aura été détaillée au préalable, avant d'aborder l'étude d'échantillons hétérogènes dans un champ magnétique en utilisant une sonde dédiée. Enfin, nous mettrons en exergue les différentes méthodes et applications de la combinaison de la RMN et d'une phase stationnaire chromatographique.

2. La mesure de coefficients de diffusion par RMN

Le but des paragraphes qui suivent n'est pas de réaliser une étude exhaustive des différentes méthodes de mesure de la diffusion par RMN, ni de produire un inventaire exhaustif de toutes les séquences d'impulsions existantes permettant d'estimer le coefficient d'autodiffusion. Nous avons voulu principalement décrire les bases de la théorie car, les coefficients de diffusion mesurés ne sont pas des coefficients d'autodiffusion, mais peuvent être défini par le

terme plus approprié de coefficients de diffusion apparents (connu également sous le terme anglo-saxon *apparent diffusion coefficient*, ADC).

Depuis les premières expériences de diffusion qui remontent à une trentaine d'années, la littérature sur ce sujet est abondante. Les notions abordées dans les paragraphes qui suivent peuvent être complétées par les données de quelques ouvrages ou revues de littérature [10-13].

2.1. L'autodiffusion

L'autodiffusion est définie, pour un liquide, comme le mouvement de translation aléatoire de molécules ou d'ions provenant de l'énergie thermique moléculaire dans des conditions d'équilibre thermodynamique. Ce déplacement ne doit pas être confondu avec la diffusion mutuelle et le phénomène de convection dus respectivement à des gradients de concentration et thermique.

Le concept d'autodiffusion a été appréhendé par Brown en 1928, avec la description d'un mouvement aléatoire des molécules, permettant leurs déplacements au cours du temps. Il s'agit de la forme de transport de matière fondamentale. Einstein a montré que pour des molécules non liées en solution, dans un milieu isotrope, le déplacement moyen $\bar{s}$ d'une molécule diffusant pendant un temps t est exprimé par :

$$\bar{s} = \sqrt{6Dt} \qquad (1)$$

où D est le coefficient d'autodiffusion de la molécule. Le facteur 6 provient de l'existence de 3 degrés de liberté associés à la diffusion dans les trois dimensions. La diffusion pour des particules non chargées et dans des conditions de dilution infinie est donnée par l'équation de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{k_B T}{f} \qquad (2)$$

où f est le facteur de friction, T la température absolue et k_B la constante de Boltzmann. Pour les particules sphériques, la loi de Stokes permet de relier f au rayon hydrodynamique R_h et à la viscosité dynamique η :

$$f = 6\pi\eta R_h \qquad (3)$$

Ainsi, il est directement possible de relier la diffusion D au rayon hydrodynamique R_h et à la viscosité η des particules sphériques en combinant les équations 2 et 3 :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \qquad (4)$$

Cette dernière relation n'est valable que pour des particules sphériques à dilution infinie. Dans le cas de particules non sphériques, l'expression du coefficient f doit être modifiée et adaptée à la forme de la molécule.

Plusieurs techniques ont été mises au point pour mesurer le coefficient d'autodiffusion. Ainsi, les traceurs radioactifs ont été très largement employés au début, avant de devenir complètement obsolète aujourd'hui. Le coefficient d'autodiffusion est déterminé à partir de l'activité d'un isotope radioactif de la molécule étudiée. Cette méthode est particulièrement sensible, mais présente des inconvénients : comme la nécessité d'avoir des déplacements macroscopiques (de l'ordre du millimètre), des diffusions rapides, de synthétiser les radiomarqueurs, de contaminer l'échantillon étudié… La spectroscopie de neutrons polarisés, quant à elle, permet d'obtenir des corrélations à l'échelle du nanomètre et de déterminer directement la fonction de corrélation de Van Hove [14, 15]. Il s'agit d'un moyen très performant pour déterminer les déplacements à l'échelle microscopique de molécules ayant des vitesses relativement élevées. Le déplacement de molécules peut être déterminé également par RMN, à partir d'une technique indirecte reposant sur la mesure des temps de relaxation, dans une gamme d'échelle s'étendant de la nano à la micro seconde. La relaxation des noyaux de spin est directement reliée aux mouvements rotationnel et linéaire de la molécule. La relaxation majoritaire dans un liquide est le mécanisme de relaxation dipôle-dipôle, au cours duquel ces deux types de mouvements, ainsi que la direction du vecteur internucléaire peuvent avoir une influence sur la valeur du temps de relaxation. Cette relaxation correspond au temps de relaxation longitudinal, ou temps de relaxation spin-réseau T_1. De plus, les interactions dipôle-dipôle intramoléculaires dépendent uniquement des mouvements rotationnels, alors que les interactions intermoléculaires sont principalement dues à des mouvements de translation. Des modèles mathématiques ont été développés pour prendre en compte la diffusion par rotation et la diffusion par translation, pendant la durée de la relaxation. Les mesures de temps de relaxation sont traitées pour déterminer le temps de corrélation rotationnel d'une molécule τ_c. L'utilisation de l'équation de Debye permet de relier τ_c à la viscosité dynamique et au rayon hydrodynamique :

$$\tau_c = \frac{4\pi\eta R_h}{3k_B T} \qquad (5)$$

Cette dernière équation permet de déterminer le coefficient d'autodiffusion à l'aide des équations (2) et (3). Il faut souligner les inconvénients nombreux de cette technique comme la nécessité d'un mécanisme de relaxation de l'espèce connu ou d'une différenciation des

contributions intra- et intermoléculaires. Pour pouvoir caractériser la dynamique par une relation temporelle simple, la molécule doit être sphérique. De plus, cette expression du temps de corrélation dans l'équation (5) est restreinte aux milieux homogènes. Les limitations de cette technique dans la détermination du coefficient d'autodiffusion, ainsi que son domaine d'application restreint n'ont pas permis son développement. *A contrario,* les techniques à gradients de champ ont connu un formidable essor ces dernières décennies.

2.2. Les gradients de champ magnétique

Contrairement à la mesure de T_1, la technique des gradients de champ magnétique a été considérablement utilisée pour étudier l'autodiffusion par RMN, technique plus connue sous son terme anglo-saxon *pulsed gradient spin echo* (PGSE). Les premières mesures en PGSE ont été effectuées par Stejskal et Tanner [16, 17], au milieu des années soixante. Par la suite, la mise au point de la RMN à Transformée de Fourier (TF) a permis de développer la RMN PGSE qui, initialement, était une technique non résolue dans le domaine des fréquences. Le concept de la RMN PGSE à TF a été mis en évidence par Vold et ses co-auteurs [18], tandis que la première application a été décrite par James et McDonald [19]. Les enjeux analytiques de cette technique ont été montrés par Stilbs et Moseley [20-23] à la fin des années soixante-dix.

Il est intéressant de comparer les différentes techniques de mesures du coefficient d'autodiffusion. Comme l'a noté Callaghan [10], l'échelle de mesure utilisée en RMN permet d'étudier une large gamme de déplacements compris entre 0,1 et 100 µm et de déterminer des coefficients de diffusion inférieurs à ceux obtenus à partir des traceurs radioactifs ou de la polarisation de neutrons (Tableau 1). Les performances de ces trois techniques sont présentées dans le Tableau 1.

Techniques	Ordre de grandeur des mesures		
	Temps de diffusion	Déplacement moléculaire	Coefficients de diffusion
Traceurs radioactifs	Du jour à la semaine	Supérieur à 1000 µm	Supérieur à 10^{-9} m².s^{-1}
Spectroscopie de neutrons polarisés	Environ 10 ns	Inférieur à 0,01 µm	Supérieur à$n10^{-9}$ m².s^{-1}
RMN PGSE	De 1 à 1000 ms	0,1 à 100 µm	Entre 10^{-14} et 10^{-8} m².s^{-1}

Tableau 1 : Comparaison des performances de la RMN, de la spectroscopie de neutrons polarisés et des traceurs radioactifs pour la mesure du coefficient d'autodiffusion.

2.2.1. Principes

La diffusion est déterminée en RMN PGSE à partir de la mesure du déplacement des molécules à deux temps distincts : $t = t_0$ et $t = t_0 + \Delta$, t_0 et Δ étant respectivement la position de la molécule au temps initial et le temps de diffusion. L'expérience permet, à partir de l'atténuation de l'écho obtenue en laissant diffuser pendant Δ millisecondes, d'estimer la longueur du déplacement de la molécule selon un axe, et de déterminer ainsi le coefficient d'autodiffusion. Toutefois, aucune information concernant le déplacement effectué pendant le temps de diffusion dans les trois dimensions ne peut être ainsi obtenue.

Plusieurs approches théoriques existent pour expliquer le phénomène et la mesure du coefficient de diffusion. La première concerne la fonction d'auto-corrélation [24] qui est une approche reposant sur les probabilités, la deuxième est fondée sur les équations de Bloch [25], décrivant l'aimantation de paires des spins, tandis qu'une troisième utilise une approche macroscopique [11, 26]. Nous présenterons ci-dessous cette dernière approche, tandis que l'approche probabiliste appliquée à l'étude d'un matériau en présence d'un débit sera abordée dans le chapitre 4.3.2.1.

En théorie, les gradients pourraient être appliqués selon n'importe quelle direction de l'espace ; mais, classiquement, les inhomogénéités de champ magnétique représentée par le gradient g sont crées le long de l'axe z, axe du champ magnétique statique B_0. Les expressions sont écrites pour un spectromètre configuré ainsi. Dans le repère cartésien $(\vec{e_x}, \vec{e_y}, \vec{e_z})$, nous avons :

$$\vec{B_0} = B_0 \vec{e_z} \tag{6}$$

$$\vec{g} = \frac{\partial B_0}{\partial x}\vec{e_x} + \frac{\partial B_0}{\partial y}\vec{e_y} + \frac{\partial B_0}{\partial z}\vec{e_z} = \frac{\partial B_0}{\partial z}\vec{e_z} \tag{7}$$

Le champ magnétique effectif $\vec{B_{eff}}$ ressenti par un spin situé à un endroit $\vec{r}$ peut être exprimé par la relation suivante :

$$\vec{B_{eff}}(\vec{r}) = \vec{B_0} + \vec{g}.\vec{r} \tag{8}$$

Dans le cas où un seul gradient constant est appliqué le long de l'axe z :

$$\vec{g} = g\vec{e_z}$$

ainsi, le champ magnétique effectif subi par un spin nucléaire en fonction de ses coordonnées sur l'axe z est exprimé par :

$$\vec{B_{eff}}(\vec{z}) = \vec{B_0} + \vec{g}.\vec{z} = (B_0 + g.z)\vec{e_z} \tag{9}$$

La fréquence de Larmor ω ressentie par un spin nucléaire en fonction de la valeur de z peut être estimée à partir de :

$$\omega(z) = -n\gamma(B_0 + g.z) \tag{10}$$

où γ représente le rapport gyromagnétique et n l'ordre de cohérence quantique considéré. Cette équation n'est applicable que durant la période pendant laquelle le gradient est appliqué et il apparaît que lorsqu'un gradient homogène d'amplitude connue est appliqué, il existe alors une dépendance spatiale de la fréquence de Larmor du spin nucléaire. Le déphasage ϕ subi par un spin durant une impulsion de gradient de durée δ peut être estimé à partir de l'équation suivante :

$$\phi(\delta) = \gamma B_0 t + \gamma \int_0^{\delta} g(t) z(t) dt \tag{11}$$

Le premier terme de la somme exprime le déphasage du à la précession de Larmor, alors que le second représente l'impulsion du gradient de champ magnétique.

Un schéma de l'aimantation après une impulsion de gradient a été proposé par Johnson [12]. L'échantillon est découpé en fine couche perpendiculaire à z de telle sorte que l'aimantation est représentée par un ruban. Les épaisseurs des couches sont suffisamment fines pour avoir un champ parfaitement homogène et suffisamment épaisses pour couvrir une quantité significative de spins nucléaires. Chaque couche est ensuite associée à un vecteur d'aimantation représentant ainsi ses coordonnées z. L'expérience commence par une impulsion non sélective à 90° basculant tous les vecteurs dans le plan xy. L'application d'un gradient va induire la rotation du ruban sous forme d'une hélice dont la hauteur Λ peut être estimée à partir de la relation (12) :

$$\Lambda = \frac{2\pi}{\gamma g \delta} = \frac{2\pi}{q} \tag{12}$$

où q représente l'aire de l'impulsion de gradient exprimée en m^{-1} :

$$q = \gamma g \delta \tag{13}$$

Cette représentation de l'aimantation longitudinale peut être utilisée pour toutes les séquences (Figure 1).

2.2.2. Les différentes séquences d'impulsions

La technique PGSE est sensible aux mouvements moléculaires, qu'ils soient aléatoires (mouvement Brownien), ou cohérents (flux dû à des convections thermique ou de gradient de concentrations). Il est donc important, lors de l'analyse des données, de considérer que l'enregistrement peut contenir des informations sur les différents types de diffusion. Pour supprimer la convection, il est possible d'utiliser soit des gradients selon les axes x ou y, soit des séquences d'impulsions spécifiques [12].

Dans la séquence d'impulsions, il est nécessaire de :

- Refocaliser l'aimantation. Ce qui est réalisé grâce à l'écho de spin ou à l'écho stimulé.
- Connaître la position spatiale des spins. Ce qui est effectué à partir d'au moins deux impulsions de gradients, la première servant à encoder et la seconde à décoder le déplacement des noyaux.

Les principaux avantages de cette technique résident dans le fait que l'aire des impulsions de gradients peut être contrôlée indépendamment du temps d'écho et que le signal est enregistré alors que les gradients ne fonctionnent pas (évitant ainsi une inhomogénéité du champ magnétique). *A contrario*, les impulsions entraînent des inconvénients comme la mise en marche et l'extinction rapide des gradients, la production de forces mécaniques, le chauffage par effet Joule, ou la production de courants de Foucault. Pelta [27] a présenté des travaux sur différentes séquences d'impulsions pour mesurer la diffusion et a commenté les avantages et inconvénients de chacune des techniques grâce à l'étude d'une molécule présentant un système complexe de couplage.

2.2.2.1. L'écho de spin

La séquence de l'écho de spin (*spin echo*, SE) est schématisée en Figure 1. L'amplitude du signal RMN mesuré lors de l'écho peut être exprimée, dans le cas d'un mélange isotrope, par l'équation :

$$S(2\tau) = M_0 \exp\left(-\frac{2\tau}{T_2}\right)\exp\left[-Dq^2\left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)\right] \qquad (14)$$

où M_0 représente l'amplitude de l'aimantation en absence de gradients et q est relatif à l'aire de l'impulsion utilisée.

Le terme $\frac{\delta}{3}$ est un terme correctif applicable pour les formes de gradient rectangulaires. L'utilisation d'autres formes donne lieu à l'application de facteurs correctifs spécifiques [28].

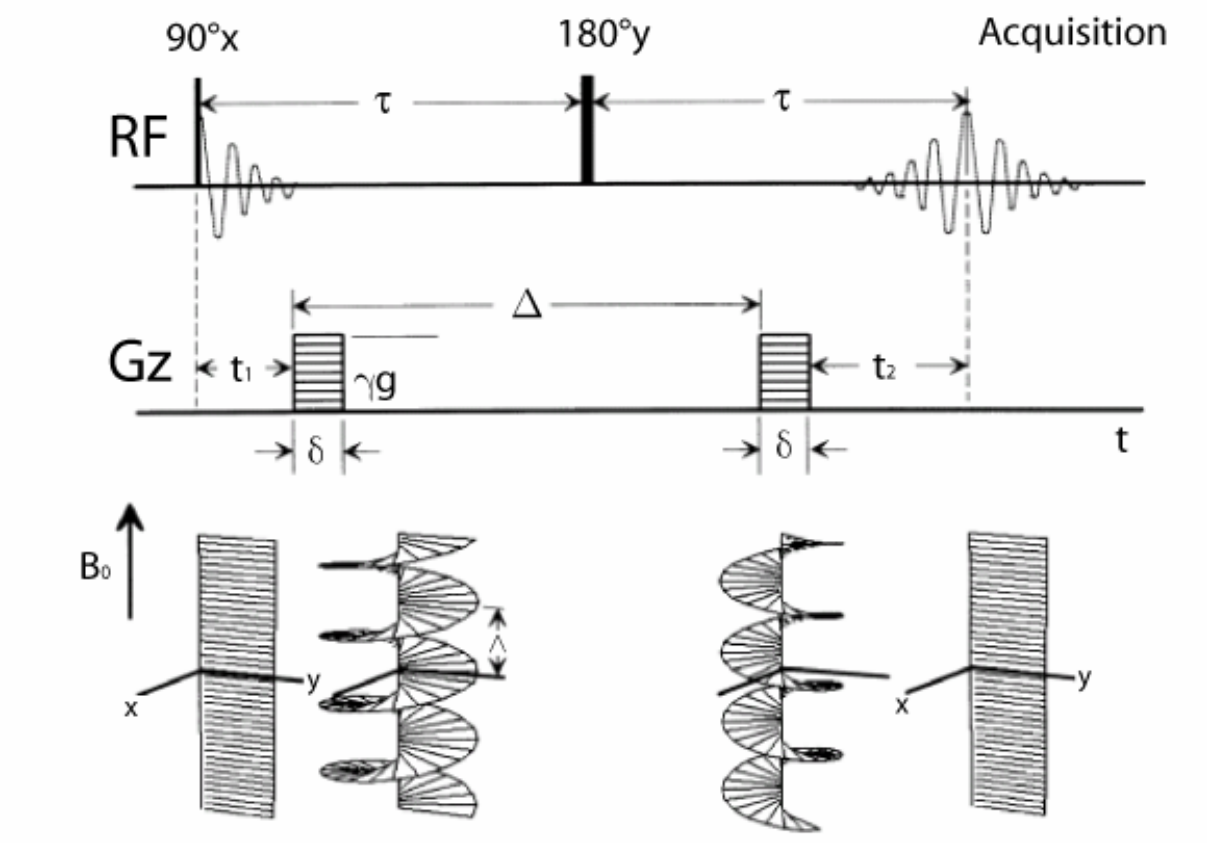

Figure 1 : Séquence d'impulsions de l'écho de spin et représentation de l'aimantation sous la forme de ruban comme décrite par Johnson [12].

La RMN PGSE permet également d'étudier la diffusion de solutés au sein des milieux dans lesquels la diffusion n'est pas libre dans les trois dimensions, soit des milieux restreints. Le terme de diffusion anisotropique est alors employé pour mettre en exergue des déplacements non proportionnels dans les différentes directions de l'espace, dépendant habituellement de la structure et de l'organisation du matériau étudié. L'expression du signal dans les expériences PGSE selon l'axe des gradients ne dépendra plus de g^2D mais de $g\hat{\hat{D}}g$ où $\hat{\hat{D}}$ est un tenseur cartésien. Ainsi, en fonction de l'axe dans lesquels les gradients de champ magnétique sont appliqués, il est possible d'étudier les éléments non diagonaux de ce tenseur d'autodiffusion.
Par exemple, dans le cas d'une symétrie cylindrique, le signal peut alors s'exprimer par une somme (équation (15)) :

$$S = \exp\left(-\gamma^2\delta^2 g^2 \Delta D_{per}\right)\int_0^1 \exp\left[-\gamma^2\delta^2 g^2 \Delta\left(D_{par} - D_{per}\right)x^2\right]dx \qquad (15)$$

où D_{per} et D_{par} représente les diffusions respectivement perpendiculaire et parallèle à l'axe de direction moléculaire. Pour des systèmes avec une symétrie de dimension 2 (une bicouche par exemple), il est possible d'exprimer l'atténuation de l'écho grâce à l'équation (15) avec

une diffusion perpendiculaire à l'axe du mouvement moléculaire qui est largement supérieure à celle qui est parallèle :

$$S = \exp\left(-\gamma^2\delta^2 g^2 \Delta D_{per}\right)\int_0^1 \exp\left[-\gamma^2\delta^2 g^2 \Delta\left(D_{per}\right)x^2\right]dx \qquad (16)$$

Avec un système de dimension 1, comme pour une diffusion canalisée dans des tuyaux, alors la diffusion dans le sens du mouvement est majoritaire et le signal s'exprime alors par l'équation suivante :

$$S = \int_0^1 \exp\left[-\gamma^2\delta^2 g^2 \Delta D_{par} x^2\right]dx \qquad (17)$$

Ainsi, en fonction de l'allure de la droite d'atténuation de l'écho, il est possible de déterminer le type de diffusion dans des milieux anisotropes.

2.2.2.2. L'écho stimulé (STE)

L'écho stimulé (*stimulated echo*, STE) représenté sur la Figure 2 a été introduit par Tanner [29] pour étudier les systèmes dans lesquels la relaxation spin-réseau est largement supérieure à la relaxation transversale ($T_1 > T_2$). Dans de tels systèmes, Hahn [30] a montré que l'utilisation de l'écho de spin n'était pas appropriée et que trois impulsions à 90° étaient optimales. Cette situation se retrouve classiquement dans des milieux visqueux, lorsqu'il existe un couplage quadripolaire, ou lors de l'étude d'échantillons présentant un rapport surface par volume élevé. Tanner [29] avait précisé que cette séquence n'était pas forcément supérieure à l'écho de spin, mais plutôt complémentaire.

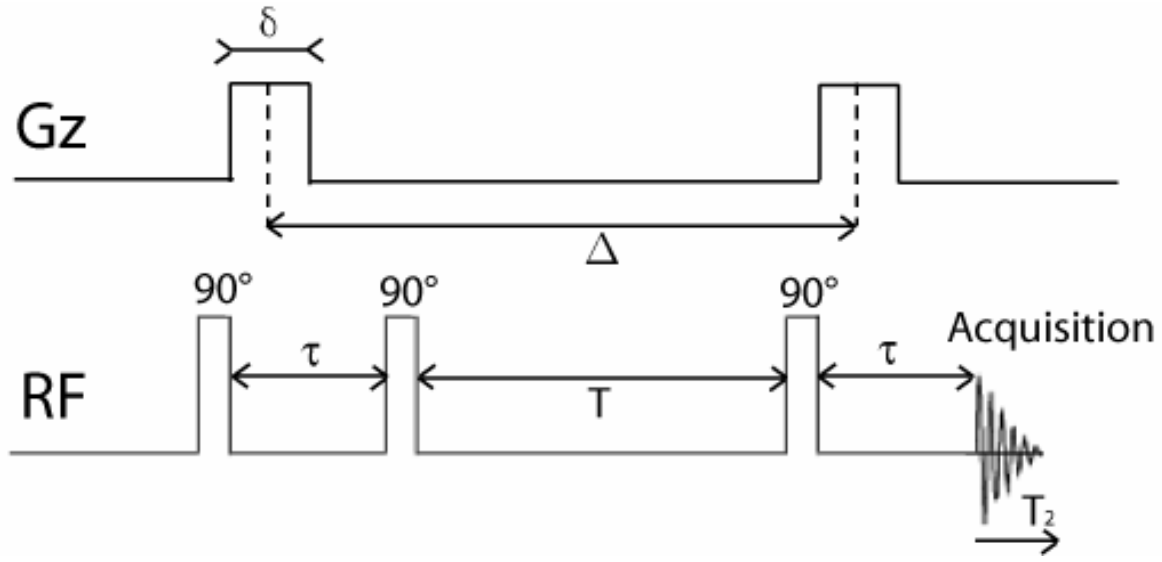

Figure 2 : Séquence de l'écho stimulé d'après Tanner [29].

Dans cette séquence, l'atténuation du signal RMN peut s'écrire :

$$S(T+2\tau)=\left(\frac{M_0}{2}\right)\exp\left[\left(-\frac{2\tau}{T_2}\right)-\left(\frac{T}{T_1}\right)\right]\exp\left[-Dq^2\left(\Delta-\frac{\delta}{3}\right)\right] \qquad (18)$$

L'amplitude du signal enregistré est divisée par un facteur deux. En effet, lors de la deuxième impulsion à 90°, seule la composante y de l'aimantation est basculée sur l'axe z. L'autre partie du signal est détruite par des gradients appropriés, ou un cyclage de phase adéquat. Une perte de sensibilité est donc attendue dans cette séquence. En réalité, si la condition $2\tau << T$ est vérifiée, alors l'aimantation est principalement longitudinale durant la séquence d'impulsions et la relaxation est majoritairement de la relaxation spin-réseau T_1 ; ce qui compense largement la perte de 50 % du signal enregistré [12]. Cette séquence présente un inconvénient majeur. Le fait d'enregistrer le signal rapidement après la dernière impulsion de gradient entraîne une distorsion du début de la FID, à cause de l'inhomogénéité du champ magnétique et par conséquent, des déformations spectrales dans le domaine des fréquences. Comme l'amplitude de l'écho en absence de gradient dépend des déplacements chimiques, il s'avère nécessaire d'éliminer cette valeur lors du traitement des données [31].

2.2.2.3. Gradients bipolaires et suppression des courants de Foucault

A l'heure actuelle, cette séquence est certainement la plus utilisée dans le cadre de l'étude du déplacement des molécules. La séquence initiale a été proposée par Wu [32] et appelée *bipolar pulse longitudinal eddy current delay* (BPP-LED). Son principe repose sur les échos stimulés auxquels sont ajoutés des gradients bipolaires et un délai d'élimination des courants de Foucault dans le but d'éliminer les artéfacts provenant des impulsions de gradients.

Le meilleur moyen d'éviter la formation des courants de Foucault est d'éviter de les produire. Pour cela, des moyens technologiques peuvent être mis en œuvre, comme le blindage actif qui consiste à enrouler des bobines de gradients autour des bobines créant l'inhomogénéité du champ magnétique, mais en sens contraire de manière à engendrer un champ magnétique dans la direction opposée au premier. La forme du gradient a également une forte influence sur la production de courants parasites. En effet, l'allumage et l'extinction rapide des bobines créent des courants relativement importants. Pour amoindrir leur intensité, l'utilisation de gradient avec une forme sinusoïdale est optimale, mais présente toutefois l'inconvénient de diminuer l'aire et donc la force des gradients.

En complément, des astuces peuvent également être apportées à la séquence d'impulsion. Deux impulsions de durée $\frac{\delta}{2}$, séparée par une impulsion radiofréquence (RF) de 180°,

peuvent remplacer une impulsion de gradient de longueur δ. L'impulsion RF permet de retourner l'ordre de cohérence des spins et de leur faire ainsi ressentir la somme des deux impulsions de gradients, tout en compensant les courants de Foucault créés par chacune des impulsions [33]. Un délai peut également être ajouté pour supprimer les courants parasites à la fin de la séquence, en ajoutant deux impulsions à 90°. La première impulsion sert à conserver l'aimantation selon l'axe z, pendant que les courants de Foucault se dissipent ; la seconde permet de repositionner l'aimantation dans l'axe xy, pour pouvoir détecter le signal. Gibbs et Johnson [34] ont été les premiers à expérimenter cette technique.

Wu [32] a combiné l'utilisation de gradients bipolaires (*bipolar pulse*, BPP) et l'ajout d'un délai à la fin de la séquence (*longitudinal eddy current delai*, LED) dans une séquence. Dans la séquence utilisée (Figure 3), deux impulsions de gradients supplémentaires (*homospoil gradients*) sont ajoutées lorsque l'aimantation du signal se trouve suivant l'axe z, pour éliminer toute aimantation transversale résiduelle, due à des imperfections des impulsions.

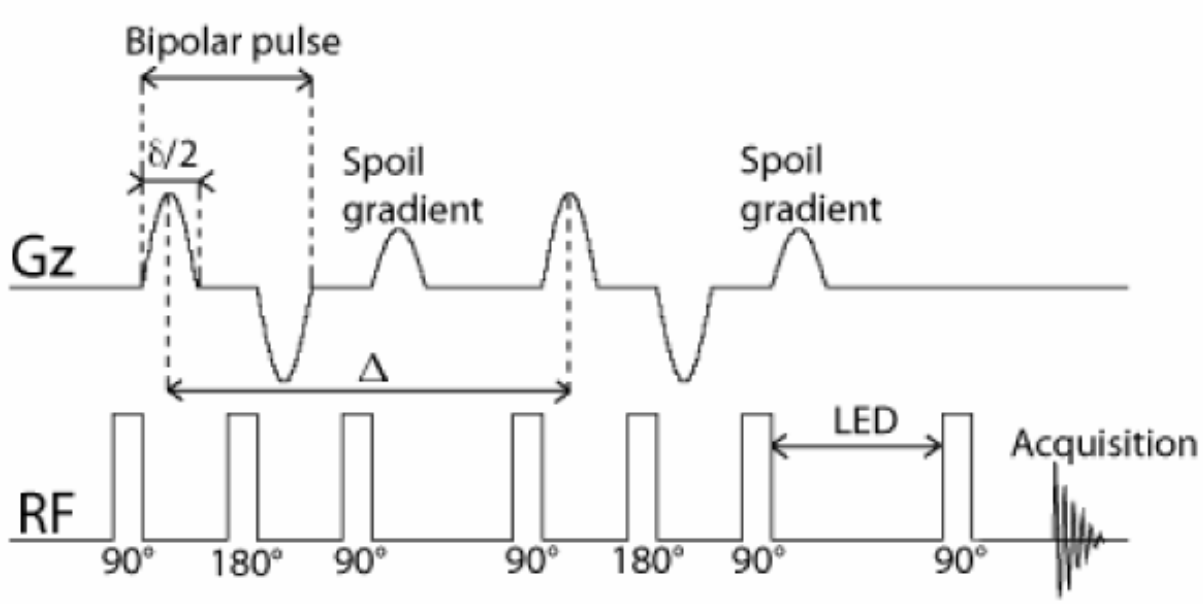

Figure 3 : Séquence combinant des impulsions de gradients sinusoïdaux bipolaires avec un délai avant l'enregistrement du signal et deux impulsions de gradient pour favoriser la suppression des courants de Foucault. Séquence BPP-LED [32].

2.2.3. Traitement des données

La manière usuelle de traiter les données d'expériences PGSE est d'employer la méthode connue sous le terme de *diffusion-ordered spectroscopy* (DOSY), mise au point par Johnson [12]. Cette méthode a connu un tel engouement, qu'aujourd'hui il n'est pas rare d'employer

abusivement le terme DOSY (qui n'est qu'un traitement des données) à la place de PGSE (qui est l'expérience en elle-même) pour désigner la mesure de la diffusion.

Dans les études en RMN 2D de routine, un hamiltonien de spin est représenté dans chacune des dimensions permettant ainsi de mettre en évidence les corrélations entre les noyaux. Pour analyser des mélanges, une représentation à deux dimensions avec dans l'une d'elle une grandeur caractéristique d'une molécule permettrait d'obtenir alors le spectre RMN 1D, pour chaque espèce contenue dans le mélange. La combinaison d'une séquence d'impulsion permettant de mesurer la diffusion suivie du traitement des données DOSY conduit à l'obtention de cette carte 2D avec, dans une dimension, les déplacements chimiques et dans la seconde, les coefficients de diffusion.

2.2.3.1. Diffusion-ordered spectroscopy

L'expérience PGSE permet d'enregistrer une série de spectre RMN avec des valeurs d'intensité de gradient spécifiques et connues. La difficulté du traitement réside dans une inversion adaptée des données. Morris et Johnson [35] ont décrit les données enregistrées par l'équation suivante :

$$I\left(q, v_m\right) = \sum_n A_n\left(v_m\right) \exp\left[-D_n \Delta' q^2\right] \tag{19}$$

où $A_n\left(v_m\right)$ est l'intensité du spectre RMN 1D de la nième espèce diffusant lorsque le gradient est faible, mais différent de zéro [31], D_n est le coefficient de diffusion associé et Δ' est le temps de diffusion réduit défini selon :

$$\Delta' = \Delta - \varepsilon_c \tag{20}$$

avec Δ le temps de diffusion et ε_c un facteur de correction dépendant de la forme des impulsions de gradients.

Nous pouvons considérer deux types d'échantillons : soit le système est décrit par un petit nombre de valeur de n (cas discret), soit il est caractérisé par des valeurs continues du coefficient de diffusion (cas continu).

Dans le cas d'un échantillon discret, l'analyse DOSY permet de calculer une liste de fonctions gaussiennes normalisées avec des positions au centre et des intensités égales, respectivement aux coefficients de diffusion et aux amplitudes des espèces :

$$F(D, v) = \sum_{j=1}^{N_\lambda} A_j\left(v\right) G_j\left(D\right) \tag{21}$$

avec : $$G_j = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_j^2}} \exp\left[-\frac{\left(D - D_j\right)^2}{2\sigma_j^2} \right] \quad (22)$$

où σ_j est l'écart type donné par le programme de traitement. Cette méthode est acceptée pour la construction des cartes DOSY et les fabricants de spectromètres incluent dans leurs logiciels ce type de programme de traitement des données.

Pour les échantillons continus, comme des polymères, l'atténuation d'une fréquence n'est plus décrite par l'équation (19) mais par la suivante :

$$I(s) = \int_0^\infty a(\lambda) \exp(-\lambda s)\, d\lambda \quad (23)$$

dans laquelle le changement de variable ci-dessous a été réalisé :

$$\lambda = D(\Delta - \delta\varepsilon) \text{ et } s = q^2 \quad (24)$$

Plus généralement, l'équation (23) donne :

$$I(q, v_m) = \int R(T_1, T_2) a(D, v_m) \exp\left[-D\Delta' q^2\right] dD \quad (25)$$

où $R(T_1, T_2)$ prend en considération la relaxation du spin pendant les intervalles dans la séquence de pulsation et $a(D)$ est la distribution de masse des coefficients de diffusion D. Si les temps de relaxation ne sont pas corrélés avec la diffusion, alors le terme $R(T_1, T_2)$ peut être remplacé par une constante et la distribution de la diffusion enregistrée. Le programme CONTIN [36] a été le premier mis au point pour l'analyse des échantillons présentant une distribution de diffusion.

2.2.3.2. Autres méthodes d'exploitation des résultats

Il existe d'autres méthodes pour appréhender la transformée de Laplace et notamment *via* l'entropie maximale. Cette approche a été exploitée par Delsuc et Mallivian [37] dans le logiciel GIFA.

Stilbs [38] a proposé un traitement simultané de toutes les lignes de la matrice à deux dimensions de l'expérience PGSE, connu sous l'abréviation CORE (*component resolved NMR*). Le programme cherche à optimiser le coefficient de diffusion, et ce tout en traitant l'intensité des composantes dans le domaine des fréquences.

Antalek [39] a appliqué le schéma de Kubista [40] permettant le traitement des données corrélées à la mesure de la diffusion par RMN. Cette approche connue sous l'acronyme DECRA (*direct exponential component resolution algorithm*) est utilisée pour étudier des mélanges complexes [41], des polymères [42], ainsi que pour réaliser de l'imagerie [43].

Les travaux récents de Mandelshtam [44] ont permis d'augmenter la résolution dans la dimension de la diffusion à l'aide d'un algorithme basée sur l'*inverse regularized resolve transform* (iRRT). Cette technique est en pleine expansion aujourd'hui [45].
Dans le domaine de l'analyse de données d'autres méthodes existent, comme celle basée sur la diagonalisation de Hankel [46], développée par Mouro [47] ; mais elles sont beaucoup moins utilisées. Pour plus de détails, il convient de consulter la revue de Huo [48] ou la thèse de doctorat de Pierre Thureau [49] consacrée, en partie, à la comparaison de différentes méthodes de traitement du signal, à leurs avantages ainsi qu'à leurs inconvénients.

Le problème lors de l'étude d'un échantillon hétérogène, et plus particulièrement en présence de phase chromatographique, réside dans l'élargissement des pics RMN du à l'anisotropie du milieu. L'étude des noyaux ^{1}H demande alors l'utilisation d'une sonde combinant les technologies de la RMN du liquide et de la RMN du solide. Dans le chapitre suivant, nous présenterons les aspects théoriques, technologiques et les applications pratiques développés avec un appareillage de HRMAS.

3. La RMN d'échantillons hétérogènes

La mise au point et le développement de la RMN HRMAS a permis d'étendre les domaines d'applications de la RMN aux échantillons hétérogènes. Il est alors devenu possible d'étudier des matrices complexes comme des molécules synthétisées sur supports, des phases mouillées, des cellules biologiques, des produits agroalimentaires bruts…
En RMN du liquide, les interactions anisotropes présentes dans un échantillon hétérogène ne permettent pas d'obtenir une bonne résolution dans le spectre ^{1}H (à cause de l'élargissement de la largeur des raies) et il est donc difficile de caractériser de tels mélanges. D'autre part, en RMN du solide, la MAS ne suffit pas pour obtenir la résolution spectrale escomptée, à cause d'interactions de couplages dipolaires trop importantes. L'utilisation d'une sonde conçue spécifiquement permet l'étude des gels. Ce cas couvre le domaine de la RMN HRMAS, dont la qualité des résolutions approche celle obtenue en RMN du liquide.
Dans les paragraphes qui suivent, nous nous intéresserons dans un premier temps aux différentes interactions induisant l'augmentation de la largeur des raies lorsque les échantillons ne sont pas à l'état liquide. Ensuite, nous décrirons les spécificités d'une sonde

HRMAS et les problèmes engendrés par la MAS. Pour terminer, nous donnerons quelques exemples d'applications de cette technique.

3.1. Interactions magnétiques en milieu anisotrope

L'isotropie est définie pour une espèce comme l'invariance de ses propriétés dans toutes les directions de l'espace. En RMN, cette définition s'applique aux interactions observées, c'est-à-dire subies par les spins nucléaires. Une espèce isotrope doit répondre aux deux conditions suivantes. Les mouvements moléculaires doivent être rapides par rapport aux variations de toutes les interactions ressenties par les spins nucléaires lors de la réorientation et la même probabilité d'orientation des spins doit exister.

Ces deux conditions sont réunies généralement à l'état liquide. A l'inverse, si une des deux conditions n'est pas remplie, il s'agit d'un cas d'anisotropie qui concerne les matrices suivantes :

- Les solides, car ils ne présentent généralement ni des mouvements moléculaires rapides, ni la même probabilité d'orientation.
- Les espèces présentant une orientation spécifique (comme les cristaux liquides) ou une orientation privilégiée (comme les cellules).
- Les mélanges hétérogènes qui ne satisfont pas la première condition.

L'anisotropie du milieu se traduit par un élargissement de la largeur des raies dans le spectre RMN entrainant une perte de résolution, mais également d'informations. Les interactions subies par un système de spin dans un champ magnétique intense sont de deux types : les interactions Zeeman, dépendant du champ magnétique externe et les interactions de spins internes dues à l'échantillon (interactions dipôle-dipôle, de déplacement chimique, de couplage…). Elles s'expriment sous la forme d'un Hamiltonien total qui est la somme des Hamiltoniens de toutes les interactions :

$$\widehat{H} = \widehat{H_Z} + \widehat{H_D} + \widehat{H_{CS}} + \widehat{H_J} + \widehat{H_Q} \qquad (26)$$

où $\widehat{H}$ est l'Hamiltonien total, $\widehat{H_Z}$ l'Hamiltonien de Zeeman, $\widehat{H_D}$ l'Hamiltonien dipolaire, $\widehat{H_{CS}}$ l'Hamiltonien de déplacement chimique, $\widehat{H_J}$ l'Hamiltonien de couplage J et $\widehat{H_Q}$ l'Hamiltonien quadripolaire.

Les deux dernières interactions ne participent que très faiblement à l'élargissement de la largeur des raies spectrales, à la différence des interactions Zeeman, de couplage dipolaire et de l'anisotropie de déplacement chimique.

3.1.1. Susceptibilité magnétique et échantillons hétérogènes

L'aimantation $\overrightarrow{M}$ ressentie par une substance isotrope non ferromagnétique dans un champ magnétique $\overrightarrow{H_0}$ uniforme dépend de sa susceptibilité magnétique χ :

$$\overrightarrow{M} = \chi \overrightarrow{H_0} \tag{27}$$

Il devient alors possible d'exprimer l'induction du champ magnétique $\overrightarrow{B_0}$ à l'intérieur d'un échantillon en fonction de la susceptibilité magnétique :

$$\overrightarrow{B_0} = \left(\overrightarrow{M} + \overrightarrow{H_0}\right)\mu_0 = (1+\chi)\,\mu_0 \overrightarrow{H_0} \tag{28}$$

avec μ_0 la perméabilité de l'air. Il apparaît que la valeur du champ magnétique principal est fonction de la susceptibilité magnétique de l'échantillon. Dans l'analyse de mélanges hétérogènes, cette valeur n'est pas uniforme et constante. Le produit analysé peut être assimilé à des distributions différentes des géométries, des volumes et des domaines. La contribution au champ magnétique ressentie provenant de la susceptibilité magnétique est donc :

$$\Delta H = \left(\frac{4\pi}{3} - \alpha_c\right)\chi_v H_0 \tag{29}$$

où χ_v représente la susceptibilité magnétique de volume et α_c est un facteur numérique dépendant de la forme de l'échantillon.

La variation de susceptibilité magnétique induit des déplacements dans les fréquences de résonance des noyaux, d'où une distribution dans les déplacements chimiques, se traduisant par un élargissement des largeurs de raies. Nous pouvons estimer cette variation, dans le cas d'un échantillon isotrope en rotation par la relation proposée par Wooten :

$$\Delta\chi = \frac{\Delta H}{H_0} = \left[-\frac{4\pi\chi_v\left(3k_g - 1\right)}{3}\right]\left[\frac{3\cos^2\theta - 1}{2}\right] \tag{30}$$

où k_g est un facteur géométrique et θ l'angle entre le champ magnétique principal et l'axe de rotation de l'échantillon.

3.1.2. L'interaction dipolaire

A l'échelle atomique, la séparation des noyaux dans la matière condensée est importante. Malgré ce, le moment magnétique associé à chaque dipôle exerce une influence importante sur le moment magnétique du noyau voisin ; ce sont les interactions dipolaires. Elles peuvent s'exprimer pour un ensemble de paires de noyaux par l'Hamiltonien suivant :

$$\widehat{H_D} = \frac{\mu_0}{4\pi}\sum_{i<j}\gamma_i\gamma_j\hbar r_{ij}^{-3}\left[\hat{\mathrm{I}}_i \bullet \hat{\mathrm{I}}_j - 3\left(\hat{\mathrm{I}}_i \bullet r_{ij}\right)\left(\hat{\mathrm{I}}_j \bullet r_{ij}\right)r_{ij}^{-2}\right] \tag{31}$$

dans lequel r est la distance entre les deux noyaux i et j tandis que I représente le vecteur opérateur donné par :

$$\hat{\mathrm{I}} = \hat{I}_x i + \hat{I}_y j + \hat{I}_z k \tag{32}$$

L'ensemble de la somme doit être écrite de telle sorte que chaque paire de spins ne soit en interaction qu'une seule fois. En simplifiant le problème à l'étude d'une seule paire i et j, l'équation (32) peut s'écrire :

$$\widehat{H_{D_{ij}}} = \hat{\mathrm{I}}_i \bullet \hat{\hat{\mathrm{D}}} \bullet \hat{\mathrm{I}}_j = \begin{bmatrix} \hat{I}_{ix} & \hat{I}_{iy} & \hat{I}_{iz} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} D_{xx} & D_{xy} & D_{xz} \\ D_{yx} & D_{yy} & D_{yz} \\ D_{zx} & D_{zy} & D_{zz} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \hat{I}_{jx} \\ \hat{I}_{jy} \\ \hat{I}_{jz} \end{bmatrix} \tag{33}$$

La matrice $\hat{\hat{\mathrm{D}}}$ est un tenseur de rang deux. Cet Hamiltonien a une forte influence dans les systèmes de spins nucléaires et, pour des protons, la force d'interaction est aux environs des 100 kHz en considérant une distance d'approximativement 1,5 Å entre les deux noyaux.

Dans un champ magnétique fort, nous pouvons négliger la partie non séculaire du couplage et écrire l'Hamiltonien dipolaire pour des noyaux homonucléaire i et j :

$$\widehat{H_D^{ij}} = -2\pi\hbar d_{ij} \left(\frac{3\cos^2\beta - 1}{2} \right) \left(3\hat{I}_{iz}\hat{I}_{jz} - \hat{I}_i \bullet \hat{I}_k \right) \tag{34}$$

où β est l'angle entre le vecteur rejoignant les deux noyaux et le champ magnétique statique $\overrightarrow{B_0}$ et où d_{ij} représente le couplage direct dipolaire qui s'écrit selon le formalisme :

$$d_{ij} = \frac{\mu_0 \gamma_i \gamma_j \hbar}{8\pi^2 r_{ij}^3} \tag{35}$$

Les interactions dipolaires dépendent donc de la distance entre les noyaux et de l'orientation des spins par rapport au champ magnétique.

3.1.3. L'anisotropie de déplacement chimique

L'application d'un champ magnétique $\overrightarrow{B_0}$ n'est pas perçue de la même manière par tous les noyaux. Cet effet est connu sous le nom de déplacement chimique causé par des précessions de Larmor légèrement différentes dans la matière et caractéristiques de l'environnement chimique du spin. L'échelle des déplacements chimiques dépend du noyau étudié et est de l'ordre de quelques dizaines de ppm pour le ^{1}H, tandis quelle peut atteindre quelques centaines de ppm en ^{13}C ou ^{29}Si. Dans des environnements anisotropes, l'effet de blindage des électrons peut avoir un caractère tensoriel, qui reflète la possibilité de la génération d'un

champ magnétique local, du à un mouvement rotationnel des orbitales moléculaires selon un axe différent de celui de $\overrightarrow{B_0}$. L'Hamiltonien de spin s'écrit alors :

$$\widehat{H_{CS}} = -\hat{I} \bullet \hat{\hat{S}} \bullet \overrightarrow{B_0} \tag{36}$$

où $\hat{\hat{S}}$ est le tenseur d'écran d'ordre deux suivant :

$$S = \gamma \begin{bmatrix} \sigma_{xx} & \sigma_{xy} & \sigma_{xz} \\ \sigma_{yx} & \sigma_{yy} & \sigma_{yz} \\ \sigma_{zx} & \sigma_{zy} & \sigma_{zz} \end{bmatrix} \tag{37}$$

Lorsque la rotation est isotrope, il reste un Hamiltonien de déplacement chimique résiduel qui est :

$$\widehat{H_{CS}} = -\sigma_i \omega_0 \widehat{I_z} \tag{38}$$

avec σ_i le déplacement chimique isotrope donné par la somme de la diagonale du tenseur d'écran $\frac{1}{3}\left(\sigma_{xx} + \sigma_{yy} + \sigma_{zz}\right)$. Dans le cas d'un solide, la partie séculaire de l'Hamiltonien de déplacement chimique affecte les différents niveaux d'énergie et nous avons la relation suivante :

$$\widehat{H_{CS}} = -\sigma_i \omega_0 \widehat{I_Z} - \frac{1}{2}\left(3\cos^2\beta - 1\right)\left(\sigma_{ZZ} - \sigma_i\right)\omega_0 \widehat{I_z} \tag{39}$$

où β est l'angle entre l'axe du champ magnétique principal B_0 et le système d'axes principal du tenseur d'écran. Le terme additionnel dans l'équation (39) représente l'anisotropie de déplacement chimique.

3.1.4. La rotation à l'angle magique

Dans le cas où l'échantillon est placé en rotation autour d'un angle θ par rapport au champ magnétique statique B_0 et en se plaçant dans le cas idéal d'une vitesse infinie permettant de ne conserver que la partie indépendante du temps dans les expressions des Hamiltoniens, les différentes interactions présentées ci-avant vont s'exprimer pour la susceptibilité magnétique par l'équation (30), pour l'Hamiltonien d'interaction dipolaire par l'équation ci-dessous :

$$\widehat{H_D^{ij}} = -2\pi\hbar d_{ij}\left(\frac{3\cos^2\beta - 1}{2}\right)\left(3\widehat{I_{iz}}\widehat{I_{jz}} - \widehat{I_i} \bullet \widehat{I_k}\right)\left(\frac{3\cos^2\theta - 1}{2}\right) \tag{40}$$

et pour l'Hamiltonien de déplacement chimique :

$$\widehat{H_{CS}} = -\sigma_i \omega_0 \widehat{I_Z} - \frac{1}{2}\left(3\cos^2\beta - 1\right)\left(\sigma_{ZZ} - \sigma_i\right)\left(\frac{3\cos^2\theta - 1}{2}\right)\omega_0 \widehat{I_z} \tag{41}$$

Les Hamiltoniens exprimés par les équations (30), (40) et (41) ont le facteur $\left(3\cos^2\theta - 1\right)$ en commun. Aussi, un choix astucieux de la valeur de θ associée à une vitesse de rotation

suffisante permettra de moyenner à zéro ces interactions et de réduire l'élargissement des raies spectrales. Une rotation autour d'un angle de 54°44' (soit 54,7°), par rapport au champ magnétique statique B_0 (Figure 4) va annuler le terme $\left(3\cos^2\theta - 1\right)$ et donc l'anisotropie pour les principales interactions responsables de l'augmentation de la largeur spectrale. Les premiers résultats obtenus en RMN MAS ont été présentés en 1960 au congrès de Pise par E. Raymond Andrew. Les qualités spectrales obtenues étaient tellement inattendues que le scientifique C.J. Gorter a parlé des propriétés magiques de cet angle, ce qui fut à l'origine de son nom d'« angle magique ».

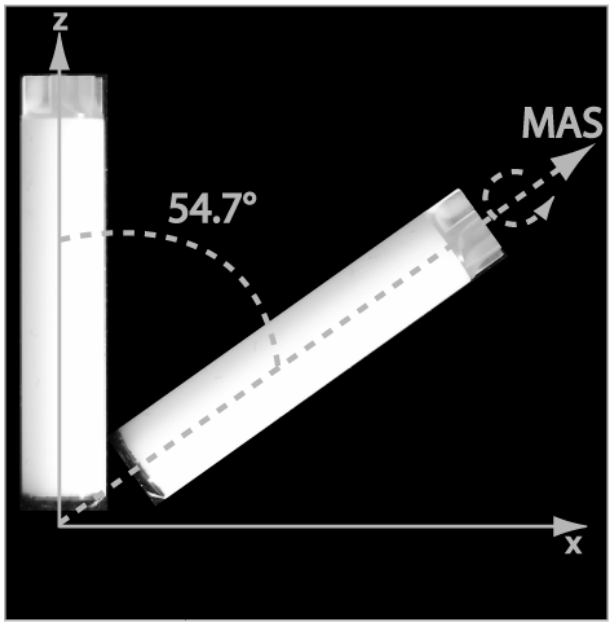

Figure 4 : Représentation d'un rotor à l'angle magique (MAS) sur le plan xz lorsque le champ magnétique statique est aligné sur l'axe z.

3.2. Les spécificités de la sonde HRMAS

Bien que la rotation à l'angle magique permette d'augmenter la résolution spectrale, elle ne suffit pas pour obtenir une résolution suffisante pour le noyau ^{1}H [50]. Les constructeurs ont donc été obligés de créer des sondes spécifiques pour l'étude des gels. Un tel matériel permet alors d'avoisiner une qualité de spectre obtenue en RMN liquide. Différentes innovations technologiques ont été apportées à la sonde HRMAS pour augmenter ses performances.

3.2.1. Les technologies des fournisseurs :

Varian a été le premier à proposer une sonde haute résolution avec MAS : la Nanoprobe [51]. L'échantillon est placé dans un capillaire pour limiter les variations de susceptibilité magnétique, puis il est mis en rotation à l'angle magique. L'avantage de cette technique réside dans le faible coût des tubes (à la différence de celui d'un rotor), ainsi que dans la possibilité d'un examen visuel de l'échantillon.

Doty Scientific [52, 53] a proposé une sonde tournant à l'angle magique capable d'étudier aussi bien des solides, que des gels. Cette sonde n'est donc pas dédiée à l'étude RMN d'échantillons hétérogènes. De plus, l'échantillon est placé dans une cellule qui doit être introduite dans le rotor. Ainsi, le nombre de rotors est limité, ce qui est un avantage non négligeable compte tenu de leur prix.

Bruker Biospin a développé une sonde dédiée à la HRMAS qui a été utilisée au cours de ces travaux. Les échantillons sont introduits dans un rotor de 4 mm identique à ceux utilisés en RMN du solide. Le rotor est introduit dans la sonde *via* le stator qui, sous une impulsion d'air comprimé, va basculer à l'angle magique. Cet angle peut être réglé par l'utilisateur et il convient donc de le vérifier périodiquement. La bobine de RF (émission et réception) est elle aussi située sur le stator ce qui la rend mobile en même temps que l'échantillon. L'avantage réside dans le fait que l'échantillon reste toujours parallèle à cette bobine, même si les expériences ne sont pas réalisées parfaitement à l'angle magique (à cause d'un déréglage au cours du temps, par exemple). Les fortes contraintes subies par la bobine à cause des nombreux basculements et de la rotation de l'échantillon nécessitent qu'elle ait une forme de solénoïde. Ce type de bobine est moins sensible et présente une moins bonne homogénéité que les bobines d'Helmontz, utilisée en RMN haute résolution des liquides, mais elle est mécaniquement plus résistante. La sonde possède trois canaux de RF pour étudier les noyaux ^{1}H, ^{2}H et ^{13}C. Le canal ^{2}H est généralement utilisé pour réaliser le verrouillage champ/fréquence, stabilisant le champ magnétique au cours du temps. La sonde contient également une bobine pour réaliser des gradients de champ magnétique (paragraphe 3.2.3), ainsi qu'un thermocouple pour mesurer la température et une résistance pour chauffer l'échantillon dans la sonde.

3.2.2. L'homogénéité du champ magnétique

Tout comme en liquide, l'homogénéité du champ magnétique lors des expériences en HRMAS conditionne la résolution et la forme du pic. Des bobines annexes (ou *shims*) sont présentes dans le spectromètre et l'intensité du champ magnétique qu'elles produisent est

réglable par l'utilisateur. Toutefois, la disposition spatiale et l'orientation des bobines sont optimisées pour la RMN à l'état liquide. Le réglage, ainsi que la sensibilité de chaque *shim* sont spécifiques à chacune des deux techniques. Des travaux [54] ont été réalisés pour exprimer l'influence de chaque bobine, lorsque l'échantillon est orienté à l'angle magique.

Le Tableau 2 présente les correspondances entre les *shims* orientés le long de l'angle magique (B^{MAS}) si le stator est positionné dans le plan xz, et ceux dans le repère du laboratoire (B^{LAB}), qui, pratiquement, sont ceux réglables directement à l'aide d'une console. Les inhomogénéités du champ statique B_0 peuvent être corrigées jusqu'au troisième ordre. De plus, les inhomogénéités isométriques (ou radiales) par rapport à l'axe de rotation n'ont pas besoin d'être corrigées, car elles sont moyennées à zéro par la rotation. En considérant le faible volume du rotor, le réglage de l'homogénéité du champ ne devrait être réalisé qu'à partir des *shims* $B_{Z^1}^{MAS}$, $B_{Z^2}^{MAS}$ et $B_{Z^3}^{MAS}$. Ce n'est pas le cas en pratique et un réglage spécifique des bobines $B_{\left(X^2-Y^2\right)}^{LAB}$, $B_{Z^3}^{LAB}$ et $B_{Z\left(X^2-Y^2\right)}^{LAB}$ est indispensable pour corriger des perturbations externes et obtenir ainsi une forme de raie gaussienne.

Le réglage de l'homogénéité du champ magnétique prend en compte de nombreux paramètres. Piotto [55] a récemment montré que le volume de liquide dans le rotor, la position de l'insert, et la nature du matériau du rotor influençaient la qualité du réglage.

Premier ordre	$B_Z^{MAS} = \frac{1}{\sqrt{3}} B_Z^{LAB} - \frac{\sqrt{2}}{\sqrt{3}} B_X^{LAB}$
	$B_X^{MAS} = \frac{1}{\sqrt{3}} B_X^{LAB} - \frac{\sqrt{2}}{\sqrt{3}} B_Z^{LAB}$
	$B_Y^{MAS} = B_Y^{LAB}$
Deuxième ordre	$B_{Z^2}^{MAS} = B_{(X^2-Y^2)}^{LAB} - 2\sqrt{2} B_{ZX}^{LAB}$
	$B_{ZX}^{MAS} = -\frac{1}{3} B_{ZX}^{LAB} + \frac{\sqrt{2}}{6} B_{Z^2}^{LAB} - \frac{\sqrt{2}}{6} B_{(X^2-Y^2)}^{LAB}$
	$B_{ZY}^{MAS} = \frac{1}{\sqrt{3}} B_{ZY}^{LAB} - \frac{\sqrt{2}}{\sqrt{3}} B_{XY}^{LAB}$
	$B_{(X^2-Y^2)}^{MAS} = \frac{2\sqrt{2}}{3} B_{ZX}^{LAB} + \frac{1}{3} B_{Z^2}^{LAB} + \frac{2}{3} B_{(X^2-Y^2)}^{LAB}$
	$B_{XY}^{MAS} = \frac{1}{\sqrt{3}} B_{XY}^{LAB} + \frac{\sqrt{2}}{\sqrt{3}} B_{ZY}^{LAB}$
Troisième ordre	$B_{Z^3}^{MAS} = -\frac{2}{3\sqrt{3}} B_{Z^3}^{LAB} - \frac{1}{\sqrt{6}} B_{Z^2X}^{LAB} + \frac{5}{\sqrt{3}} B_{Z(X^2-Y^2)}^{LAB} - \frac{5}{3\sqrt{6}} B_{X^3}^{LAB}$
	$B_{Z^2X}^{MAS} = \frac{\sqrt{2}}{3\sqrt{3}} B_{Z^3}^{LAB} - \frac{\sqrt{3}}{2} B_{Z^2X}^{LAB} + \frac{5}{6\sqrt{3}} B_{X^3}^{LAB}$
	$B_{Z^2Y}^{MAS} = -\frac{10\sqrt{2}}{3} B_{XYZ}^{LAB} + \frac{1}{6} B_{Z^2Y}^{LAB} + \frac{5}{6} B_{Y^3}^{LAB}$
	$B_{Z(X^2-Y^2)}^{MAS} = \frac{1}{3\sqrt{3}} B_{Z^3}^{LAB} - \frac{\sqrt{2}}{3\sqrt{3}} B_{X^3}^{LAB}$
	$B_{XYZ}^{MAS} = -\frac{1}{3} B_{XYZ}^{LAB} + \frac{\sqrt{2}}{12} B_{Z^2Y}^{LAB} - \frac{\sqrt{2}}{12} B_{Y^3}^{LAB}$
	$B_{X^3}^{MAS} = \frac{\sqrt{2}}{3\sqrt{3}} B_{Z^3}^{LAB} + \frac{1}{2\sqrt{3}} B_{Z^2X}^{LAB} + \frac{2\sqrt{2}}{\sqrt{3}} B_{Z(X^2-Y^2)}^{LAB} + \frac{5}{6\sqrt{3}} B_{X^3}^{LAB}$
	$B_{Y^3}^{MAS} = 2\sqrt{2} B_{XYZ}^{LAB} + \frac{1}{2} B_{Z^2Y}^{LAB} + \frac{1}{2} B_{Y^3}^{LAB}$

Tableau 2 : Correspondance entre les *shims* HRMAS et ceux en RMN à l'état liquide lorsque le stator est dans le plan XZ .

Des réglages appropriés de l'homogénéité du champ magnétique, la conception d'une sonde spéciale pour l'étude haute résolution d'échantillons hétérogènes et la rotation à l'angle magique permettent d'obtenir des spectres présentant une résolution proche de celle obtenue avec des liquides (Figure 5)

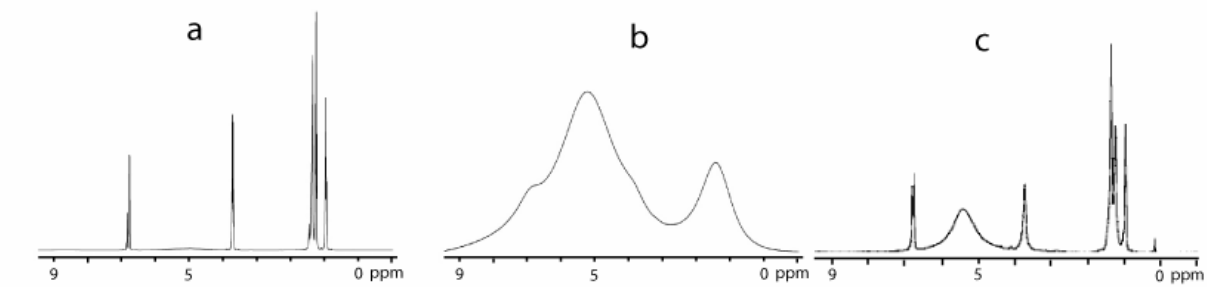

Figure 5 : Spectre RMN d'un mélange de 3,5-dichlorophénol, n-heptane et d'éthanol (a) en RMN liquide, puis en présence de silice (b) avec une sonde RMN liquide et (c) en ^{1}H HRMAS RMN. Le pic large du spectre (c) est du aux silanols non mobile de la phase stationnaire.

3.2.3. Les gradients de champ magnétique

L'ajout d'une bobine de gradient sur la sonde HRMAS est indispensable pour réaliser les mesures de diffusion, mais également et principalement pour sélectionner les chemins de cohérence et diminuer ainsi la durée des expériences. L'ajout de cette bobine permet d'effectuer les mêmes expériences qu'en RMN du liquide et d'avoir, donc, la même portée pour la détermination structurale.

L'utilisation des impulsions de gradients pour mesurer le coefficient de diffusion a été décrite dans des paragraphes précédents, en considérant des conditions où les bobines produisaient un gradient de champ magnétique uniquement selon l'axe z, parallèle au champ magnétique statique B_0. L'application d'un tel gradient à un rotor tournant selon l'angle magique induit le déplacement des spins à travers divers plans d'intensité de gradients, car l'axe de rotation n'est plus parallèle à l'orientation des gradients (Figure 6). Les spins nucléaires vont ressentir une moyenne du champ de gradient. Il faut alors synchroniser les gradients avec la vitesse de rotation, ce qui est impossible à réaliser, à cause des oscillations périodiques des gradients de champ magnétique.

La solution technologique proposée par Bruker Biospin pour pouvoir employer des gradients, tout en faisant tourner l'échantillon, consiste à fixer la bobine sur le stator, obligeant celle-ci à pivoter simultanément lors du basculement de l'échantillon à l'angle magique. Ainsi, les isoplans du gradient deviennent perpendiculaires à l'axe de rotation, et les impulsions de gradients de champ magnétique ressenties par les spins ne sont plus modulées en fonction du temps et dépendent uniquement de la position du spin dans le rotor [56]. En fait, les gradients sont basculés dans le repère de l'axe de rotation.

Ainsi, la sonde utilisée présente une bobine de gradient qui bascule simultanément avec le rotor, permettant ainsi d'exploiter tout le panel des séquences proposées en RMN du liquide.

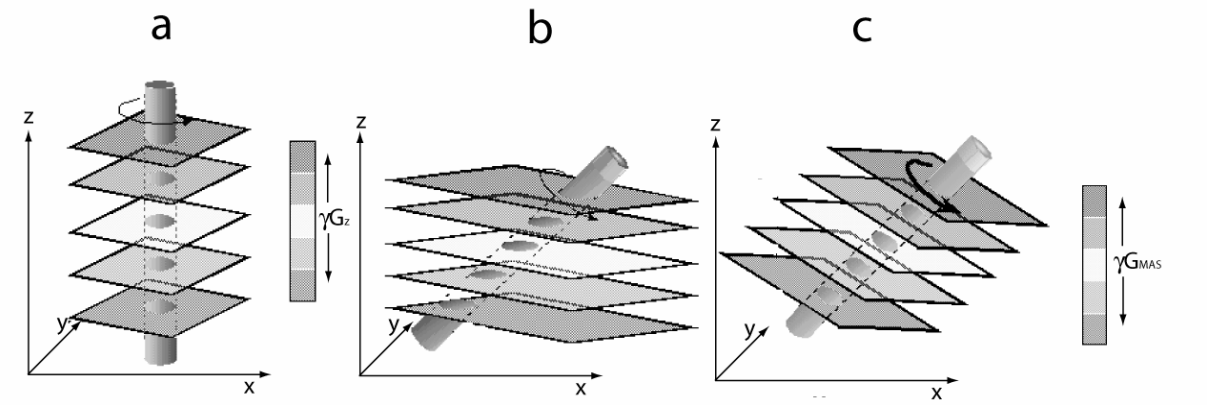

Figure 6 : Gradients ressenties par les spins lorsque (a) la bobine de gradient et l'échantillon sont parallèles à l'axe z , (b) l'échantillon est en rotation à l'angle magique et la bobine de gradient est parallèle à l'axe z et (c) la bobine et l'échantillon sont orientés à l'angle magique.

Une autre alternative existe pour réaliser des expériences RMN PGSE avec une sonde MAS. Elle consiste en l'utilisation d'un système de gradients de micro-imagerie, externes à la sonde [57], permettant d'obtenir des gradients plus élevés et donc, de mesurer des coefficients de diffusion plus faibles. Cette technique présenterait des avantages par rapport à l'utilisation de bobines classiques enroulées autour du stator. Elle minimiserait les artéfacts sur les propriétés de la bobine de RF. Il est également possible d'ajouter un système de refroidissement permettant de générer des gradients plus importants, tout en conservant la linéarité des aires des gradients. De plus, aucune force de torsion ne serait causée par les courants élevés introduits dans la bobine des gradients. Cependant, ce système a été mis en place dans un seul laboratoire et n'est pas commercialisé, notamment à cause de son coût prohibitif, rendant son utilisation anecdotique.

3.3. Quelques exemples d'applications de la RMN HRMAS

La RMN HRMAS est aujourd'hui utilisée dans des domaines aussi divers que la synthèse sur support, l'agroalimentaire, la biologie ou encore la caractérisation d'interactions entre un support solide et un liquide. Les paragraphes qui suivent traitent d'une présentation, non exhaustive, des applications développées. Les travaux combinant la RMN HRMAS avec une phase chromatographique seront abordés ultérieurement.

3.3.1. La synthèse sur support solide

Le concept de la synthèse sur support solide introduit par Merrifield [58] est couramment utilisé pour la production de bio-polymères, de petites molécules organiques ou en chimie combinatoire. L'étape consommatrice de temps dans cette approche est la caractérisation du

produit synthétisé, car l'analyse en continue de la réaction est impossible. Ainsi, les techniques de suivi des synthèses classiques comme la chromatographie sur couche mince (CCM) ou la RMN ne sont pas utilisables. C'est pour répondre à ce besoin que les premières études en RMN haute résolution du ^{1}H avec la MAS ont été réalisées en 1994 [51]. La sonde spécialement conçue pour ce type d'échantillon hétérogène a permis d'obtenir une largeur de raie de 8 Hz. Keifer [59] a montré que l'élargissement des raies spectrales était principalement du à la structure du support (une résine en l'occurrence) et plus particulièrement à la mobilité des groupements fixés dessus.

La RMN HRMAS, permettant un gain de temps considérable dans cette approche de la synthèse, a été largement utilisée pour caractériser les produits des réactions sur support. La littérature est abondante sur ce sujet et plusieurs revues [60-63] couvrent l'ensemble des travaux réalisés.

3.3.2. Le domaine biomédical

Les règnes animal et végétal sont des milieux hétérogènes combinant des structures solides « mouillées » par un liquide, comme par exemple les cellules. Il est donc possible, en utilisant une vitesse de rotation modérée, pour éviter tout effet de centrifugation, d'étudier des tissus sans les dégrader, et ce sans nécessiter une étape préalable de traitement de l'échantillon.

Dès le développement de la RMN ^{1}H HRMAS, la compréhension du vivant a été appréhendée à partir de l'étude des mouvements de peptides dans la bicouche locale [64]. Le nombre d'études RMN appliquées à la biologie a explosé depuis le début du vingt et unième siècle. Nous pouvons citer des travaux sur les muscles [65] ou la lentille de l'œil [66] du lapin ; sur le profil biochimique des testicules [67] de rats mais aussi sur le rein [68, 69], le foie [70-74], le cœur [75], le plasma [71], l'urine [72], les intestins [76], la lentille de l'œil [77] ou le cerveau [78] de cet animal et sur des tissus bovin [79].

Cette approche permet également de s'intéresser aux pathologies humaines. Ainsi, Cheng [80] a caractérisé les cellules du cerveau humain dans le cas de la maladie d'Alzheimer. D'autres études ont consisté à étudier les adipocytes [81, 82], la prostate [83-85], les cellules sanguines [86], ou le foie [87]. L'inconvénient majeur de cette technique réside dans son domaine d'application *ex vivo*. Il est donc nécessaire de prélever les tissus avant de les analyser, opération délicate et pouvant être douloureuse.

Les applications abordées ci-avant s'intéressaient principalement à la caractérisation et à la mise en évidence des molécules contenues dans l'échantillon. Deux nouveaux axes de recherche ont été récemment développés selon une approche dynamique, ouvrant ainsi de

nombreux champs d'applications. Tout d'abord, Lucas [88] a utilisé la HRMAS pour étudier la variation de la concentration d'acide benzoïque administrée à un rat, dans le cadre de l'étude de la biodisponibilité de ce principe actif et de sa distribution dans les tissus. Il est également possible de s'intéresser aux cancers en caractérisant des tumeurs mélanomes [84, 89-91], ou le type et la quantité d'acides gras contenus dans des cellules malignes [92]. Griffin [93] a ainsi prouvé qu'il était possible d'utiliser la RMN HRMAS pour étudier le processus biologique qui entraine une forte augmentation des acides gras polyinsaturés dans certaines tumeurs cancéreuses.

3.3.3. L'agroalimentaire

Depuis quelques années, un petit nombre d'équipes s'intéresse à l'analyse de produits alimentaires par RMN HRMAS. Ce type de matrice contient aussi bien des parties solides, que des phases liquides. L'analyse d'une portion d'un produit alimentaire permet de caractériser le lot et de prouver une éventuelle dégradation ou une fraude sur la marchandise. L'avantage de la RMN réside dans la préparation de l'échantillon, qui ne demande que l'ajout d'un solvant deutérié au produit brut, évitant ainsi tout risque de pollution et l'utilisation de protocoles complexes. A l'heure actuelle, le nombre d'exemples dans la littérature est faible.

Le changement de la composition de la pulpe de mangue au cours de son vieillissement [94, 95] a pu être étudié grâce à cette technique, ainsi que la composition de la pulpe de tomates suivant la variété [96], ou la réticulation de la cutine dans ce même fruit [97]. L'attribution des signaux RMN dans la gélatine [98] a permis de prouver la présence de dix neuf acides aminés. L'équipe italienne de Sacco a caractérisé des produits comme le blé [99], la farine [100] et le pain [100].

Il convient également de citer les travaux réalisé au sein de notre laboratoire par Laetitia Shintu, qui, au cours de sa thèse de doctorat [101], a attribué les signaux RMN du *Parmigiano Reggiano* [102]. A l'aide d'une approche chimiométrique des marqueurs caractérisant la durée d'affinage du fromage [103] ont pu être mis en évidence. Cette méthode a été également appliquée à de l'emmental et à de la viande séchée pour en déterminer la région de fabrication [101].

3.3.4. Mesure de la diffusion avec une sonde HRMAS

La mobilité d'espèces peut être mesurée avec un telle sonde toutefois, cette technique n'a encore été que très peu utilisée. Les exemples dans la littérature scientifique sont peu nombreux et limités à la mesure de diffusion dans des tissus. Les premiers travaux ont été

réalisés par l'équipe de Cory [104], qui a exprimé des ADC de métabolites dans certaines cellules. Par la suite, il a été possible de différencier l'eau intra- et extracellulaire dans les testicules de rats, par la mesure de coefficients de diffusion [73]. Dans cette même publication, les acides gras produits par des rats, suite à l'ingestion d'une alimentation à base d'acide orotique, ont été mis en évidence en s'aidant des mesures de diffusion. Les travaux de Pampel [105] ont montré que la mobilité d'un anticancéreux dans une phase cristal-liquide cubique mimait correctement la cinétique de libération d'un principe actif. En 2003, deux équipes ont publié sur la faisabilité de mesurer une diffusion pour des molécules situés aux environs d'une membrane [106, 107]. Enfin, la RMN PGSE peut également permettre de confirmer des hypothèses émises à partir d'autres résultats RMN, et particulièrement de la *nuclear overhauser effect spectroscopy* (NOESY). Il a en effet été possible de confirmer la pénétration des flavonoïdes dans un lipide, plutôt que des interactions avec la surface de celui-ci [108].

La RMN HRMAS est utilisée principalement dans deux domaines : la recherche biomédicale et la chimie sur support. Les applications dans le domaine de l'agroalimentaire sont en cours de développement. L'application de gradients sur les sondes a surtout été utilisée pour diminuer le temps d'acquisition des expériences, en favorisant un chemin de cohérence et en diminuant le bruit T_1, cependant la mesure d'ADC reste très peu décrite.
Un autre type d'échantillon poly-phasique d'intérêt en RMN HRMAS est le mélange d'une phase stationnaire chromatographique avec des solutés. Il devient alors possible de caractériser les interactions support/soluté. La RMN Chromatographique utilise la rotation à l'angle magique pour obtenir des spectres RMN exploitables et la mesure de coefficients de diffusion pour étudier les interactions entre les analytes et les différentes phases en présence au sein du rotor.

4. L'utilisation de la RMN pour appréhender la chromatographie

Depuis l'apparition de la CLHP à la fin des années soixante-dix, cette technique a connu un essor incroyable, au point de devenir aujourd'hui, très certainement, la technique la plus utilisée en routine dans les laboratoires. Malgré ce fort développement, la compréhension des interactions entre le soluté et la phase stationnaire en RPLC reste l'objet de controverse.

Les supports chromatographiques sont caractérisés par des analyses structurales grâce à la spectroscopie infrarouge, Raman, fluorescence des rayons X par exemple. En complément, des tests chromatographiques, réalisés avec des solutés et des phases mobiles précises, permettent alors d'appréhender les propriétés du support, c'est-à-dire ses capacités de séparation.

L'apparition de la RMN à l'état solide a permis d'obtenir des informations structurales précises sur la phase sèche comme la variété et la quantité des espèces présentes sur le support après un greffage, tandis que la RMN HRMAS, qui utilise de la phase en suspension, est appropriée à l'étude de la dynamique des ligands. Nous proposons, dans les paragraphes ci-après, un état de l'art et de montrer, comment la RMN permet, à la fois de caractériser les phases stationnaires, mais aussi d'observer une partie des interactions gouvernant la rétention en CLHP.

4.1. La caractérisation de phase par RMN du solide

La caractérisation des phases chromatographiques greffées est réalisée par RMN du solide. Cet outil permet d'observer la structure de la phase synthétisée (aspect qualitatif), mais également, dans certains cas, de pouvoir quantifier le greffage. Les noyaux étudiés classiquement sont le ^{13}C, qui apporte les informations sur la chaine organique et le ^{29}Si, qui permet de connaitre l'organisation de la silice greffée. En raison de l'anisotropie magnétique de l'échantillon du à son état solide, il est nécessaire de travailler avec une MAS pour augmenter la résolution spectrale. De plus, étant donné la faible abondance isotopique des noyaux étudiés (respectivement aux alentours de 1 et 5%), il est nécessaire de transférer l'aimantation des ^{1}H, qui ont une très forte abondance naturelle, vers les noyaux d'intérêts, pour obtenir un rapport signal sur bruit élevé, et ce pour une durée d'expérience limitée. Il s'agit de la polarisation croisée (*cross polarisation*, CP). Les premiers travaux de caractérisation de phases chromatographiques ont été réalisés par Maciel et Sindorf [109, 110] au début des années quatre-vingt. L'étude des déplacements chimiques permet de déterminer ou de confirmer les structures présentes dans les différents noyaux étudiés (Figure 7). La mesure de grandeurs de temps (comme la durée de la constante de CP) caractérise la dynamique du support. Ainsi, en RMN du ^{29}Si, il est possible d'estimer le taux de greffage, le niveau de polymérisation, la stabilité des silanols du support stationnaire. La notation utilisée pour les noyaux de ^{29}Si dépend de son degré de fonctionnalisation. Un silane mono-fonctionnalisé sera noté M, un di-fonctionnalisé D… les notations M, D, T et Q sont accompagnées d'un indice se rapporte au nombre de liaisons Si-O-Si.

La RMN du ^{13}C, en plus d'apporter de l'information sur la nature de la phase greffée, peut estimer la mobilité, l'organisation, ou l'homogénéité des chaines fixées sur la silice. L'utilisation de séquences 2D permet de révéler, également, des informations sur le comportement dynamique de chacune des conformations du greffon [111].

Cependant, la RMN à l'état solide de phases chromatographiques a été beaucoup plus utilisée pour confirmer le greffage et obtenir ainsi des informations structurales sur la phase créée, que pour étudier la dynamique du système. L'inconvénient majeur dans cette dernière application est sa limitation à une phase solide, en absence de solvant et il est donc impossible de reproduire des conditions expérimentales voisines de celles de la CLHP.

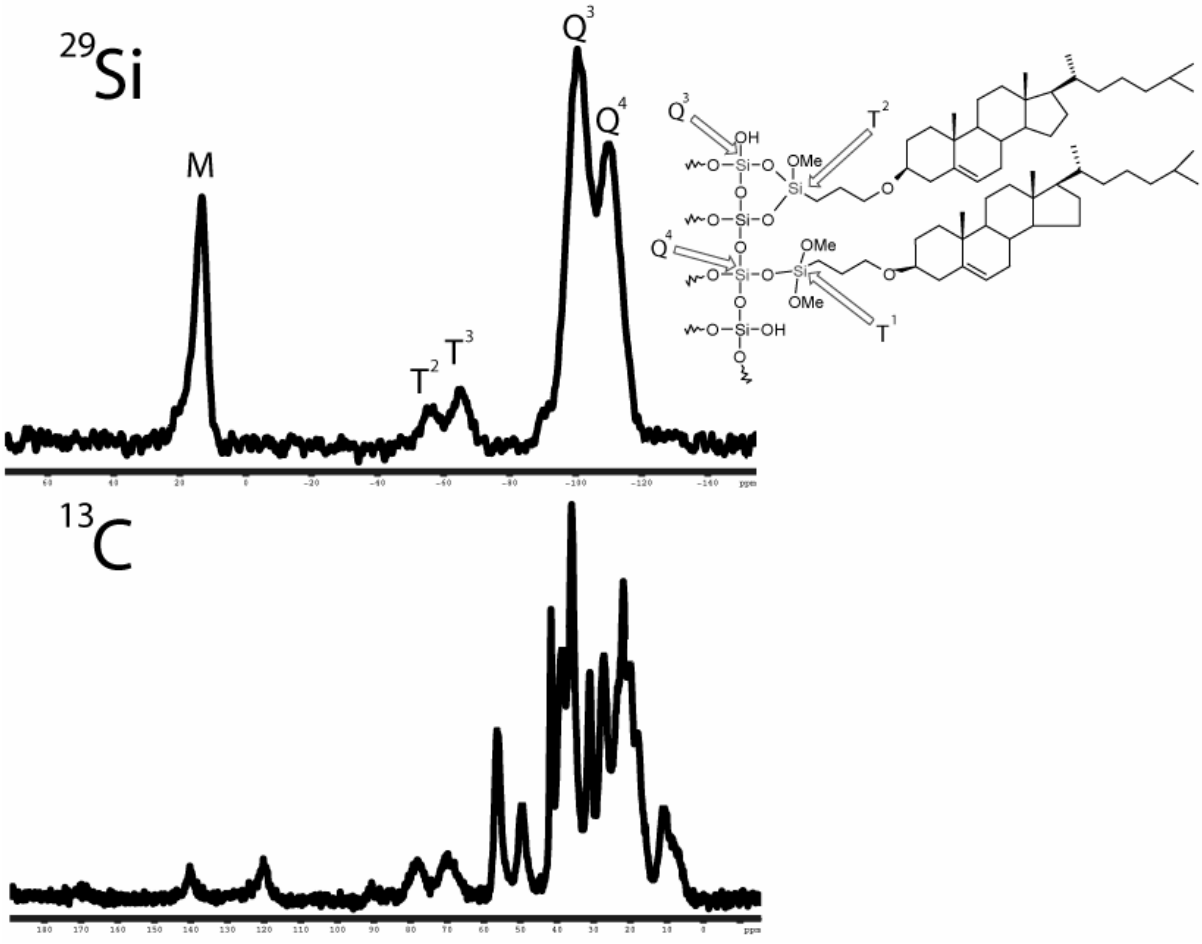

Figure 7 : Spectres RMN CP/MAS des noyaux ^{29}Si et ^{13}C d'une phase greffée par un éther de cholestérol (travail interne au laboratoire, non publié).

4.2. La HRMAS pour une mise en évidence des interactions

Les sondes classiques utilisées en RMN du solide ne permettent pas l'étude des ^{1}H d'autant plus que les séquences à mettre en œuvre nécessitent des réglages complexes et précis pour un

gain faible. A la fin des années quatre-vingt-dix, aucun résultat significatif n'avait été obtenu sur des phases chromatographiques en RMN ^{1}H, comme le souligne Albert [111] dans sa revue de littérature.

Lors de l'étude en HRMAS, l'expérience est réalisée en présence d'un solvant ; la phase est donc en suspension dans le liquide, reproduisant alors des conditions chromatographiques : soit une phase mouillée par un solvant et ainsi, la possibilité d'observer une variation dans l'organisation des greffons selon la nature de la phase. La première attribution spectrale des signaux des ^{1}H d'une phase chromatographique en suspension dans un solvant deutérié, ainsi que les valeurs de couplages, a été réalisée en 2000, à l'aide de séquences 2D classiques [112]. Au cours de ces travaux, ces auteurs ont mis en exergue les avantages des mesures d'un support en suspension et l'utilisation possible de toutes les méthodes provenant de la RMN liquide, ouvrant ainsi un large domaine d'exploitation pour l'étude des phases chromatographiques. Malgré cet optimisme, les travaux sont restés peu nombreux. Les interactions existant entre une phase octadecylsylilée (ODS) provenant d'une cartouche d'extraction sur phase solide (*solid phase extraction*, SPE) et l'eau ont été étudiées [113]. Les auteurs, à partir de l'aspect du spectre ^{1}H, de la largeur des raies et de la mesure des temps de relaxation, ont montré la coexistence : de molécules d'eau « libre » caractérisées par une faible largeur de raie, de molécules d'eau associées aux silanols résiduels du support avec une largeur de raie de l'ordre de 45 Hz et enfin, de l'eau piégée plus fortement par la phase, c'est-à-dire se déplaçant entre les greffons. Lors de travaux plus récents, ces mêmes auteurs ont étudié les interactions entre une silice greffée de type SPE et un analyte modèle adsorbé : le p-xylène [114].

Albert [115-117] a caractérisé les interactions entre des phases chirales en suspension et des énantiomères et prédit leur pouvoir de séparation en utilisant la HRMAS. Des mesures NOESY ont permis de mettre en évidence des interactions entre ^{1}H proches ou des interactions de type ligand-récepteur. Ainsi, une molécule de faible poids moléculaire aura un effet NOE (*Nuclear Overhauser Effect*) positif, tandis que l'effet NOE d'une macromolécule sera négatif. Lorsqu'il existe des interactions entre le soluté et la phase (macromolécule), le temps de corrélation du soluté va devenir identique à celui de la macromolécule et par conséquent, négatif. Cet effet est transféré aux pics croisés NOE associés à la molécule, d'où l'appellation usuelle de transfert d'effet NOE (trNOE). Cet effet est détectable même en présence d'un fort excès de phase solide et dépend de la distance entre le soluté et le support, permettant d'obtenir des informations sur la géométrie de la liaison. Ces travaux traitent de l'étude de différents sélecteurs asymétriques pour discriminer des énantiomères et ce, avec

des solvants de différentes compositions. Les principaux résultats montrent que la force des interactions dépend du solvant utilisé ; l'eau donne des contacts plus forts que l'acétonitrile (ACN) tandis qu'un mélange ACN/Eau, 90/10, v/v va minimiser les interactions qui existent pour les deux énantiomères, mais qui sont plus fortes pour l'un des deux, d'après l'intensité du signal NOE négatif. La CLHP confirme la force des interactions observées en RMN. L'énantiomère interagissant le plus fortement avec la phase en RMN sera le dernier élué en chromatographie.

Un dernier travail référencé est celui présenté par Ihara [118], qui a comparé en fonction de la température le comportement de trois phases stationnaires : deux supports greffées ODS mono- ou dimériques et une polyoctadécylacrylate. La mesure des intensités des pics du méthyle permet, après une normalisation des valeurs, de déterminer le pourcentage de groupement ODS avec une mobilité proche de celle mesurée à l'état liquide. Ce pourcentage varie considérablement en fonction de la température pour la phase à base d'acrylate, tandis qu'il reste quasiment constant pour les deux autres phases stationnaires. Il est donc possible de distinguer le type de mobilité des greffons comme étant proche d'un solide ou proche d'un liquide.

4.3. Des impulsions de gradients et des mesures de diffusions pour caractériser les interactions support/liquide

Les impulsions de gradients permettent de pouvoir encoder le déplacement des molécules pour ensuite calculer soit des ADC, soit des probabilités de déplacements moyens. De nombreuses études ont été réalisées sur des matériaux poreux. Dans le cadre de l'analyse des résultats obtenus lors de l'étude de matériaux chromatographiques, il nous a semblé pertinent de regrouper les travaux en fonction de la représentation des résultats : une image du déplacement, des longueurs de déplacements ou des coefficients de diffusion.

4.3.1. L'imagerie du processus chromatographique

Le principe de la technique consiste à appliquer des gradients de champ magnétique permettant d'obtenir des fréquences de Larmor proportionnelles à la force du gradient et à la dimension de l'objet. La dérivation du signal enregistré permet alors d'obtenir la distribution de la densité structurale de l'objet qui correspond, ici, à une densité locale des spins nucléaires. La direction des gradients permet de choisir la dimension à imager.

Une phase chromatographique, tassée dans un contenant non magnétique, est introduite à l'intérieur d'un champ magnétique. L'appareillage est capable de produire des gradients selon

les trois axes orthogonaux pour produire des images dans chacune des dimensions. Pour diminuer le temps de relaxation des ^{1}H et pouvoir ainsi enregistrer une image, il est nécessaire d'ajouter un agent de contraste, le plus souvent, un complexe de Gadolidium.

Les premières études ont été réalisées à la fin des années quatre-vingt [119, 120] où notamment, l'influence du pH sur la forme des bandes fut montrée [121]. En CLHP, le composé est injecté ponctuellement et le soluté se présente alors dans la colonne comme une bande de largeur variable. Au cours de l'analyse, la dilution de ces molécules dans la phase mobile entraine l'augmentation de la largeur de cette bande. Sur une colonne ODS, à un pH de 6, les bandes observées sur l'image sont compactes, de forme constante le long de la colonne et légèrement incurvées. A l'inverse, à un pH de 7, une forte trainée est observée suivie d'un partage incomplet du ligand, une partie de la bande restant fixée sur la colonne. Une bande idéale aurait la forme d'un disque uniforme caractéristique d'une diffusion homogène sur toute la section de la colonne. Des paramètres inhérents à la conception de la colonne et aux conditions opératoires (tassement de la phase, gradients de température…) rendent l'observation de telles bandes impossibles. Toutefois, les conditions idéales sont approchées au pH le plus faible.

En 1995, Guiochon et Albert [122, 123] ont publié d'importants travaux traitant de l'application de cette technique à l'investigation des phénomènes liés à l'introduction d'une bande d'échantillon au sein de la colonne. Il a ainsi été possible d'observer, *in situ* et en temps réel, la migration de la bande tout au long de la colonne. En réalisant les expériences dans des conditions chromatographiques non optimales (fritté partiellement bouché, injection problématique…), ces auteurs ont ainsi pu montrer que le garnissage de la colonne était homogène, ce qui n'était pas le cas avec d'autres techniques, mais aussi l'influence de la qualité de la séparation sur le profil de la bande. L'obstruction du fritté en tête de colonne ne permet pas au soluté de pénétrer de la même manière dans la colonne en fonction de sa position sur la section d'entrée. Les auteurs soulignent également l'importance de filtrer toutes les solutions et phases mobiles avant qu'elles ne soient utilisées en CLHP. De plus, la direction du flux ne peut pas être inversée dans une colonne. En effet, la consolidation du tassement est un processus lent qui aboutit à une densité plus importante à l'entrée, qu'en sortie de colonne et un sens contraire de débit peut entrainer la formation de trou, ou de zones locales, où la perméabilité varie. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) a permis de montrer que la séparation au cœur de la colonne était de bien meilleure qualité que ne le reflétait l'enregistrement réalisé à l'aide d'un détecteur en sortie de colonne. Il est important de noter que la fixation d'ion Gd^{3+} à la surface de la silice entraine un double mécanisme de

rétention des ions se chélatant au métal, avec une rétention plus importante sur la phase saturée en métal (interactions électrostatiques), que sur de la silice classique. Il a été possible de désaturer cette phase en créant un flux contenant un chélatant formant un complexe moins retenu sur la phase que le métal seul.

Plus récemment, des travaux ont été menés en étudiant des complexes de gadolidium par IRM couplé à une détection par un détecteur à barrette de diodes [124]. Ainsi, l'imagerie a été combinée avec des grandeurs chromatographiques dans des conditions isocratiques, mais aussi de gradient de concentration de l'éluant permettant d'obtenir l'image du déplacement de l'analyte au cours du temps.

La nécessité d'utiliser un agent de contraste, inhérent à cette méthode, pour diminuer le temps de relaxation des ^{1}H, présente deux inconvénients. Cet agent est généralement un complexe à base de gadolinium, dont le ligand organique est retenu selon un mécanisme chromatographique à phase inverse de paire d'ions, différent de la RPLC classique. En outre, d'un point de vue expérimental, se pose le problème de la variation non linéaire du signal, qui n'est pas proportionnel à la concentration en gadolinium. Au-delà d'une concentration d'environ 1 mM, cette réponse diminue quand la concentration en gadolinium augmente et au-delà de 6 mM elle est plus faible qu'en l'absence de gadolinium. La seule possibilité pour pallier ce problème consiste à minimiser les quantités d'échantillons injectées.

4.3.2. La distribution de déplacement moléculaire moyen

Le traitement des données des expériences de RMN PGSE peut également être réalisé selon une approche probabilistique. Les résultats sont alors exprimés en fonction de la probabilité du déplacement moyen effectué par les molécules durant le temps de diffusion Δ. Ce type d'exploitation des résultats a été utilisé pour appréhender par RMN le déplacement de solutés à l'intérieur d'une colonne chromatographique.

4.3.2.1. Principes

Le propagateur moyen $\overline{P}(\mathrm{R},\Delta)$ obtenu par les impulsions de gradients en RMN donne la probabilité pour n'importe quelle molécule du fluide, indépendamment de sa position initiale r_0, de subir un déplacement dynamique le long de l'axe selon lequel sont appliqués les gradients de $\mathrm{R} = r - r_0$, pendant une durée Δ. Ce propagateur $\overline{P}(\mathrm{R},\Delta)$ est la moyenne

spatiale de $P(r/r_0,\Delta)$, qui représente la probabilité conditionnelle qu'une molécule, initialement localisée à r_0, migre au point r durant le temps Δ :

$$\overline{P}(\mathrm{R},\Delta) = \int \rho(r_0) P(r/r_0,\Delta)\, dr_0 \qquad (42)$$

où $\rho(r_0)$ est la densité normalisée des positions initiales des spins. L'application d'impulsions de gradients dans une direction permet de déterminer le propagateur moyen selon cet axe. Pour cela, la relation de Fourier avec l'amplitude normalisée d'écho $E(g,\delta,\Delta)$ est utilisée dans le cas d'une expérience idéale, avec une impulsion de gradient d'amplitude g, de durée δ. Cette amplitude est associée au propagateur $\overline{P}(\mathrm{R},\Delta)$ selon :

$$E(g,\delta,\Delta) = \frac{S(g,\delta,\Delta)}{S(0,\delta,\Delta)} = \int \overline{P}(\mathrm{R},\Delta) \exp(i\gamma\delta g \bullet \mathrm{R})\, d\,\mathrm{R} \qquad (43)$$

avec $S(0,\delta,\Delta)$ l'écho en absence d'impulsion de gradient. Le vecteur d'espace q est défini par l'aire des gradients (équation (13)). Ce formalisme représente la réciprocité de l'espace de déplacement dynamique R . L'équation (43) peut alors s'écrire :

$$E(q,\Delta) = \frac{S(q,\Delta)}{S(0,\Delta)} = \int \overline{P}(\mathrm{R},\Delta) \exp(i2\pi q \bullet \mathrm{R})\, d\,\mathrm{R} \qquad (44)$$

Dans le cas d'études portant sur une colonne chromatographique, la dispersion des particules de fluide dans un cylindre peut être estimée, à partir d'une distribution du propagateur moyen, sous la forme d'une gaussienne qui est fortement reliée à la dispersion axiale ou radiale durant le temps Δ :

$$\overline{P}(\mathrm{R},\Delta) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \exp\left(\frac{-\mathrm{R}^2}{2\sigma^2}\right) \qquad (45)$$

$$\sigma^2 = 2Disp_{app}\Delta \qquad (46)$$

où σ^2 est la moyenne au carré des déplacements des spins durant l'intervalle Δ dans la direction des impulsions de gradients et $Disp_{app}$ le coefficient de dispersion apparent, cette notation permettant d'éviter la confusion avec le coefficient de diffusion D.

En appliquant un débit dans un tube, et donc une vitesse moyenne $\bar{u}$ qui se rajoute à la dispersion, nous avons :

$$\overline{P}(\mathrm{R},\Delta) = \frac{1}{\sqrt{4\pi Disp_{app}\Delta}} \exp\left(\frac{-\left(\mathrm{R}-\bar{u}\Delta\right)^2}{4Disp_{app}\Delta}\right) \qquad (47)$$

Dans ces conditions, $E(q,\Delta)$ prend la forme d'une fonction oscillatoire de q dépendant de l'orientation du gradient g, de la direction du flux $\bar{u}$ modulée par la décroissance de

l'enveloppe gaussienne. La transformée de Fourier de l'espace complexe q $F\{E(q,\Delta)\}$ correspond à une gaussienne centrée sur $\bar{u}$ et à un écart type de $\sqrt{2Disp_{app}\Delta}$.

$$E(q,\Delta) = \exp\left[-4\pi q^2 Disp_{app}\Delta + i2\pi q\bar{u}\Delta\right] \quad (48)$$

$$F\left|E(q,\Delta)\right| = \frac{1}{\sqrt{4\pi Disp_{app}\Delta}}\exp\left(\frac{-\mathrm{R}^2}{4Disp_{app}\Delta}\right)\otimes\delta_D\left(\mathrm{R}-\bar{u}\Delta\right) \quad (49)$$

Finalement, la convolution avec la fonction de Dirac δ_D (notée ainsi pour éviter une confusion avec δ, la durée des impulsions de gradients) détermine la position de la gaussienne le long de l'axe selon lequel les gradients sont appliqués. Il est alors possible d'extraire $\bar{u}$ et $Disp_{app}$ du profil du pic. Dans le cas de gradients perpendiculaires à l'axe du flux, la distribution de probabilité de déplacement est centrée autour d'un déplacement nul, tandis que pour des gradients parallèles, la distribution est déplacée d'une valeur finie en concordance avec le paramètre $\bar{u}\Delta$.

4.3.2.2. Exploitation de la méthode

En 1995, les premiers travaux ont montré qu'il était possible de déterminer rapidement les coefficients de dispersions axiale et radiale dans une colonne chromatographique par RMN [125] et de suivre leurs variations en fonction de la vitesse réduite. Par la suite, les études [126, 127] ont exploité le calcul et la représentation du propagateur $\overline{P}(\mathrm{R},\Delta)$ en fonction de la distance de déplacement R ; la courbe ainsi obtenue caractérise la population des molécules qui se sont éloignées d'une distance R par rapport à leur point initial, selon l'axe d'application des gradients. Des gradients dans l'axe du flux vont permettre d'obtenir une dispersion longitudinale, tandis que des impulsions perpendiculaires au débit engendrent une dispersion radiale.

L'étude de la dispersion longitudinale montre une répartition selon deux courbes gaussiennes. En l'absence de débit, une seule courbe est observée, dont le déplacement est centré sur zéro, indiquant la stagnation de l'ensemble des molécules dans la colonne. Lorsque le débit augmente, deux populations se distinguent : l'une centrée sur un déplacement nul et l'autre avec une valeur différente de zéro, représentant les molécules entraînées par le flux. L'aire de la phase stagnante diminue progressivement lorsque le débit augmente, tandis que l'aire des molécules se déplaçant augmente et présente une forte largeur soit, une dispersion importante. Le ratio des aires de chacune des populations permet de mesurer le pourcentage des molécules dans la phase stagnante pendant la durée d'observation Δ. Pour une même colonne, si Δ

augmente, la fraction éluée par la phase mobile sera modifiée pour atteindre une valeur plus importante. De la même manière, si Δ reste constant et que seul le diamètre des particules est augmenté, alors la fraction stagnante devient plus importante. En augmentant le produit $\bar{u}\Delta$, par augmentation du débit et diminution du diamètre de la colonne, il est possible d'arriver à séparer totalement les deux fonctions gaussiennes. Il semblerait que la discrimination des populations à partir de leurs déplacements augmente lorsque le débit devient important.

Dans le cas de gradients perpendiculaires à l'axe de la colonne, la représentation graphique est toujours centrée sur zéro, quelle que soit la valeur de Δ. Seule la dispersion du pic augmente avec Δ ce qui montre que le déplacement perpendiculairement au débit devient plus important. Ce coefficient de dispersion radiale est d'un ordre de grandeur plus faible que celui mesuré parallèlement au débit.

La mesure de l'écart type de la fonction permet d'obtenir le coefficient de dispersion dans les espaces extra- et intraparticulaires pour respectivement les molécules se déplaçant et les molécules stagnantes. D'autre part, la mesure, ou le calcul par équation du coefficient de diffusion du liquide, permet d'estimer le facteur de tortuosité et la porosité totale du système à l'aide de l'équation (50) :

$$\Delta_e = \frac{\tau_{intra}}{2D_m}\left[\frac{d_p}{2}\right]^2 \qquad \text{avec } \left(\sqrt{\left\langle \mathrm{R}^2_{intra}\right\rangle}\right)_{\Delta=\Delta_e} = \frac{d_p}{2} \tag{50}$$

Le temps caractéristique d'échange Δ_e pour qu'une molécule quitte la particule poreuse de diamètre moyen d_p peut être estimé [128] en supposant un déplacement d'une distance de $\frac{d_p}{2}$ du milieu du pore jusqu'à la surface de la particule, à partir du facteur de tortuosité intraparticulaire τ_{intra} et de la taille moyenne, et ce pour des particules de forme sphérique.

Dans le cas où le temps d'observation Δ est inférieur au temps d'échange Δ_e, alors le coefficient de diffusion intraparticulaire peut être estimé par :

$$\left(\sqrt{\left\langle \mathrm{R}^2_{intra}\right\rangle}\right)_{\Delta<\Delta_e} = \sqrt{\left(2D_{intra}\Delta\right)} \tag{51}$$

La valeur mesurée est indépendante de Δ. Tallarek et collaborateurs ont également montré que le facteur de tortuosité dans un réseau intraparticulaire non organisé est plus élevé que dans des particules organisées. Dans des réseaux mésoporeux, la convection forcée intraparticulaire, ainsi que la diffusion intraparticulaire, participent au transport du fluide. Dans ce dernier cas, nous pouvons parler de « chromatographie de perfusion » comme définie par Liapis et McCoy [129], car la vitesse à l'intérieur des particules n'est pas nulle.

La disparition du déplacement centré sur zéro observée lorsque Δ augmente, permet d'assimiler ce problème à la diffusion d'un soluté de l'extérieur vers l'intérieur d'une particule poreuse sphérique, la sphère étant tantôt remplie et tantôt vide. Ainsi, il devient possible de modéliser les données de transfert de matière à partir de l'équation suivante, dans le cas d'une colonne chromatographique avec une distribution de taille de particule finie [128] :

$$\frac{A_{intra}(\Delta)}{A_{intra}(0)} = \frac{6}{\sigma_p \pi^2 \sqrt{2\pi}} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \int_{r_p=0}^{\infty} \exp\left[-\left(\frac{r_p - \mu_p}{\sigma_p \sqrt{2}} \right)^2 - n^2 \pi^2 \frac{D_{intra} \Delta}{r_p^2} \right] dr_p \quad (52)$$

où A_{intra} est la quantité moyenne de substance diffusante immobile dans la sphère au temps choisi, μ_p et σ_p sont respectivement la moyenne et l'écart type du rayon des particules (selon une répartition gaussienne) et r_p le rayon de la sphère. De plus, l'épaisseur de la couche stagnante à la surface des particules δ_{film} peut être estimée à partir du nombre de Peclet (pour des valeurs supérieures à 50) Pe et de Ω une fonction de la porosité extraparticulaire d'après l'équation suivante :

$$\delta_{film} = \frac{d_p}{\Omega Pe^{1/3}} \quad (53)$$

Ainsi, il a été montré que l'épaisseur de la couche immobile de solvant diminue lorsque le débit augmente.

Une autre représentation originale des résultats, à partir des coefficients de dispersion, est de calculer la hauteur réduite d'un plateau axial ou radial [130], comme en CLHP, à partir des relations suivantes :

$$h_a = \frac{1}{d_p} \frac{\partial \sigma_a^2}{\partial z} \text{ et } h_t = \frac{1}{d_p} \frac{\partial \sigma_t^2}{\partial z} \quad (54)$$

dans lesquelles h_a et h_t représente respectivement la hauteur réduite d'un plateau théorique le long de la colonne et perpendiculairement à la direction du flux. Ces grandeurs sont insensibles à la distribution locale de la vitesse de l'éluant, car les mesures sont effectuées sur une courte période de temps. Les auteurs ont alors comparé les équations (de Knox, de Giddings, de Giddings généralisée, de van Deemter, d'Huber et d'Horváth) utilisées en CLHP pour calculer ces hauteurs de plateaux et déterminer quelles expressions décrivaient le mieux les phénomènes observés obtenues en RMN PGSE en fonction de la gamme de vitesse réduite étudiée.

Cette approche permet d'estimer quantitativement des résistances au transfert de matière dans une colonne chromatographique tassée, entre la phase stagnante et le flux de phase mobile, ainsi que le processus d'échange entre les deux phases. Enfin, en combinant les impulsions de gradients avec des méthodes d'imagerie, la colonne pourrait être représentée par ses coefficients de dispersions axiale ou radiale, durant le processus séparatif.

4.3.3. La diffusion en HRMAS

La dernière approche des phénomènes chromatographiques concerne l'utilisation de la HRMAS avec la mesure de coefficients de diffusion.

Lors des travaux mettant en évidence les interactions entre une phase SPE et le p-xylène [114] après une procédure d'activation du support par le méthanol et l'eau, la mesure des ADC a permis de confirmer l'attribution spectrale. Ainsi, le xylène « libre » a un coefficient de diffusion presque deux fois plus élevé que le xylène présentant des interactions avec la phase et donc un mouvement de translation plus restreint que la forme « libre ». L'ADC de l'eau a un caractère biexponentiel signifiant la présence de deux types d'eau. La première diffusion est proche de la valeur obtenue en absence de phase et pourrait donc être de l'eau non retenue par le support, tandis que la seconde, cinq fois plus lente, serait de l'eau piégée par la phase chromatographique. A partir des données utilisées pour mesurer l'ADC, la proportion de chaque type d'eau est estimée : 85% pour l'eau interagissant peu et 15% pour l'eau retenue par le support.

Le premier exemple de séparation d'un mélange en RMN PGSE à l'aide d'une phase chromatographique a été réalisé au laboratoire. La diffusion de mélanges en présence et en absence de phase a été comparée [131]. Ainsi, les solutés (naphtalène, éthanol et dec-1-ène) contenus dans une solution d'éthanol deutérié ne sont pas séparés par leur ADC, comme l'illustre la représentation DOSY des résultats (Figure 8a). A l'inverse, en présence d'une phase chromatographique ODS, le naphtalène est fortement retenu, le dec-1-ène un peu moins, tandis que l'éthanol possède la diffusion la plus rapide (Figure 8b). Des résultats similaires sont obtenus avec un autre mélange et en présence de silice. Cette étude a montré qu'il était possible de ralentir sélectivement, à l'aide d'une phase chromatographique, des molécules diffusant avec un même ordre de grandeur.

Dans ces deux approches, le mélange hétérogène de la phase stationnaire et du liquide implique l'utilisation d'une sonde ^{1}H HRMAS, pour augmenter la résolution du spectre ^{1}H en moyennant à zéro l'anisotropie de l'échantillon grâce à la rotation à l'angle magique.

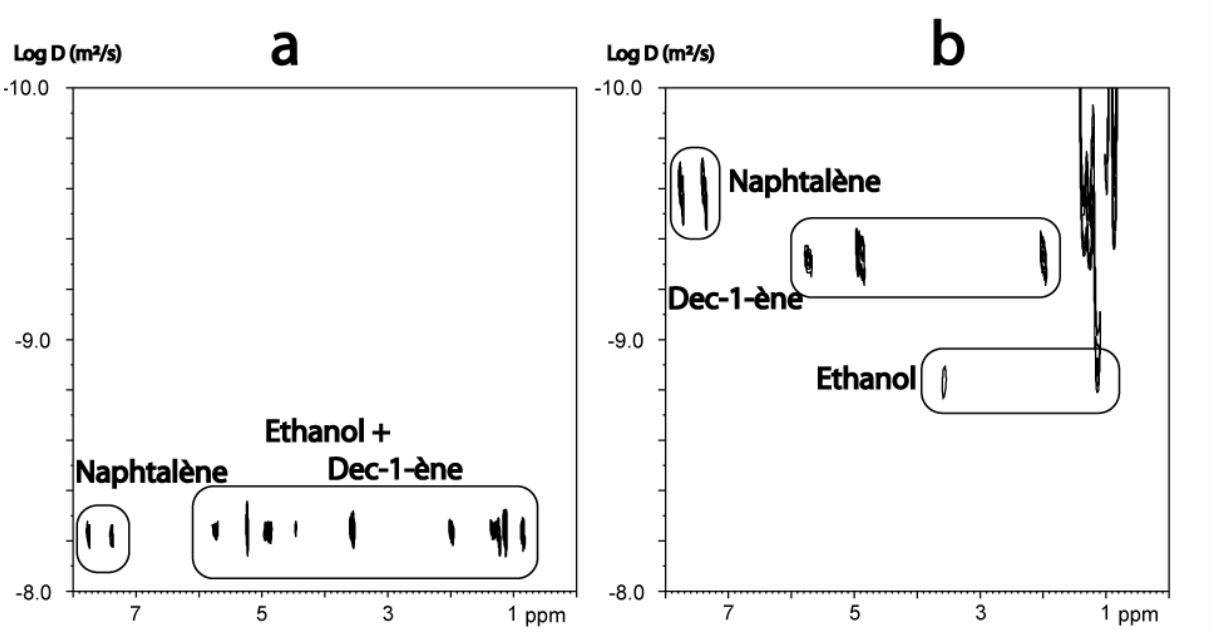

Figure 8 : Cartes DOSY d'un mélange naphtalène, éthanol et dec-1-ène (a) sans phase chromatographique et (b) en présence d'une phase greffée ODS.

Les travaux réalisées en RMN pour appréhender les interactions entre un support chromatographique et les solutés ne sont pas nombreux et sont principalement le fruit du travail d'une ou deux équipes uniquement.

Les études, développées au cours de ce travail de thèse, nécessitent une connaissance des différentes théories développées en CLHP pour expliciter les différents mécanismes mis en jeu.

5. Les moments pour une compréhension de la chromatographie liquide haute performance à polarité de phase inversée

La littérature est prolixe en études portant sur la compréhension des mécanismes de rétention par CLHP. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'approche développée par Guiochon et Miyabe reposant sur l'analyse des moments. En effet, cette approche tient compte des différents types de diffusion impliqués dans le phénomène de la rétention. De plus, ces travaux sont riches en données expérimentales qui peuvent être reliées aux phénomènes décrits dans cette thèse.

5.1. La théorie

Le premier moment d'un pic chromatographique est caractéristique de sa position sur le chromatogramme et est relatif à la thermodynamique de l'équilibre de la phase. Il s'exprime par l'équation ci-dessous [132] :

$$\mu_1 = \frac{\int C(t)\,t\,dt}{\int C(t)\,dt} = \frac{l}{u_0}\delta_0 \tag{55}$$

avec

$$\delta_0 = \varepsilon + (1-\varepsilon)\left(\varepsilon_p + \rho_p K\right) \tag{56}$$

où $C(t)$ est la fonction d'élution ou le profil de concentration du soluté dans la colonne en fonction du temps t, l est la longueur de la colonne chromatographique, u_0 est la vitesse linéaire de la phase mobile, ε est la porosité externe, ε_p et ρ_p sont respectivement la porosité intraparticulaire et la densité du matériau poreux, tandis que K est la constante d'équilibre d'adsorption. En combinant les équations (55) et (56), il est possible d'obtenir la valeur de la constante K

$$\frac{\mu_1 - t_0}{1-\varepsilon} = \frac{l}{u_0}\rho_p K \tag{57}$$

$$t_0 = \frac{l}{u_0}\left[\varepsilon + (1-\varepsilon)\varepsilon_p\right] \tag{58}$$

La variation de $\frac{\mu_1 - t_0}{1-\varepsilon}$ en fonction de $\frac{l}{u_0}$ est une droite, à partir de laquelle il est possible de déduire la valeur de K.

Le second moment caractérise la largeur de la distribution de concentration. Il est donc représentatif de la dispersion, ainsi que des cinétiques de transfert de matière entre les deux phases. Il est défini comme suit :

$$\mu_2^{'} = \frac{\int_0^\infty C(t)\left(t-\mu_1\right)^2 dt}{\int_0^\infty C(t)\,dt} = \frac{2z}{u_0}\left(\delta_{ax} + \delta_f + \delta_d\right) \tag{59}$$

avec

$$\delta_{ax} = \frac{Disp_a}{u_0^2}\delta_0^2 \tag{60}$$

$$\delta_f = (1-\varepsilon)\frac{r_p}{3k_f}\left(\varepsilon_p + \rho_p K\right)^2 \tag{61}$$

$$\delta_d = (1-\varepsilon)\frac{r_p^2}{15D_e}\left(\varepsilon_p + \rho_p K\right)^2 \tag{62}$$

et $Disp_a$ le coefficient de dispersion axiale, r_p le rayon moyen de la particule de silice, k_f est le coefficient de transfert de matière du fluide vers la particule, D_e est la diffusion intraparticulaire et δ_0 est obtenue à partir de l'équation (56).

Il est possible d'extraire la diffusion de surface D_s, qui représente la migration des molécules à la surface de la phase stationnaire, à partir de l'équation (61). Cette contribution est calculée à partir du moment du second ordre, en soustrayant les contributions des autres processus de transfert de matière se déroulant en CLHP. Comme les autres sources de transfert de matière sont de moindre importance que la diffusion de surface, une perte importante de précision sur la mesure est constatée. Guiochon défini la grandeur H' par :

$$H' = \frac{\mu_2'}{\mu_1^2}\frac{z}{2u_0} = \frac{Disp_a}{u_0^2} + H_0' \tag{63}$$

où H_0' est

$$H_0' = \frac{\delta_f}{\delta_0^2} + \frac{\delta_d}{\delta_0^2} \tag{64}$$

La dispersion longitudinale peut être déduite de la pente de la droite $H' = f\left(\frac{1}{u_0}\right)$, alors que la valeur de la diffusion intraparticulaire est obtenue à partir des équations (59) à (62) en éliminant la contribution du transfert de matière du fluide vers la particule à la largeur du pic, grâce à l'expression de H_0'. Dans l'équation (61), k_f est estimé en utilisant l'équation de Wilson et Geankoplis [133], incluant les nombres adimensionnels de Reynolds, Schmidt et Sherwood. Pour exprimer la diffusion moléculaire D_m, c'est-à-dire la diffusion des solutés dans la phase liquide, qui intervient dans les deux nombres adimensionnels de Schmidt et Sherwood, il existe différentes équations en fonction du mélange de solvants utilisé. L'équation de Wilke-Chang [134] est appliquée pour des mélanges à base de méthanol ou d'éthanol et d'eau, celle de Perkins-Geankoplis [135] est adaptée aux mélanges d'ACN et d'eau et celle de Hayduk-Laudie [136] lorsque le soluté est dissous dans de l'eau.

La diffusion dans le pore D_p, soit la diffusion moléculaire dans la solution stagnante remplissant le pore, peut être estimée à partir de D_m, de la porosité intraparticulaire ε_p et de k le facteur de tortuosité :

$$D_p = \frac{\varepsilon_p}{k^2} D_m \tag{65}$$

La valeur de D_s peut être extraite à partir de la relation suivante :

$$D_e = D_p + \rho_p K D_s \tag{66}$$

De plus, la relation entre D_s et la température T est classiquement exprimée par une équation d'Arrhenius, permettant alors d'exprimer l'énergie d'activation E_s :

$$D_s = D_{s0} \exp\left(\frac{-E_s}{RT}\right) \tag{67}$$

où D_{s0} est un terme constant appelé le facteur de fréquence et R est la constante des gaz parfaits. Cette énergie est souvent corrélée à la chaleur d'adsorption du soluté sur la phase stationnaire Q_{st} et un paramètre empirique α_e classiquement inférieur à 1 :

$$E_s = \alpha_e \left(-Q_{st}\right) \tag{68}$$

$$D_s = D_{s0} \exp\left[\frac{-\alpha_e \left(-Q_{st}\right)}{RT}\right] \tag{69}$$

Les molécules adsorbées ont besoin d'acquérir une certaine énergie (E_s) pour migrer et franchir ainsi la barrière énergétique qui existe entre deux sites d'adsorption. Cette valeur peut être inférieure à la chaleur d'adsorption ($-Q_{st}$), car les molécules n'ont pas besoin d'être totalement désorbées de la surface pour migrer, d'où la valeur inférieure à 1 du facteur α. La diffusion de surface se déroule donc dans le champ potentiel d'adsorption du support.

De plus, à partir de l'approche des moments, il est possible d'appréhender la valeur du nombre de plateaux théoriques, le coefficient de dispersion axiale… Pour une revue de littérature complète sur la mesure des moments et les grandeurs mesurables par cette approche, il convient de se reporter à la référence [137].

5.2. Les résultats

La diffusion de surface est un processus de transfert de matière des molécules adsorbées, alors qu'elles restent dans cet état adsorbé. Au sein des matériaux poreux, le transfert de matière est une contribution à la fois du transfert de matière dans le pore et de la diffusion de surface. Les résultats ci-après sont un condensé des travaux essentiellement réalisés par Miyabe et Guiochon [138-143].

Il existe une relation linéaire entre le facteur de fréquence D_{s0} et l'énergie d'activation de la diffusion de surface E_s, prouvant ainsi qu'il y a un effet de compensation enthalpie-entropie dans les conditions expérimentales de la RPLC. De plus, la relation entre D_s et la constante d'équilibre d'adsorption K est linéaire. Ces observations suggèrent un mécanisme de diffusion à la surface du support identique dans différentes conditions chromatographiques. La nature du mécanisme semble indépendante de la force de rétention, car les données sont

toujours linéaires, et ce indépendamment de la nature chimique du soluté, du modifiant ou de la composition de la phase mobile, de la longueur ou de la densité des greffons à la surface de la phase stationnaire. Les valeurs de la rétention et de la diffusion dépendent des conditions chromatographiques, mais leurs influences sur les paramètres d'équilibre et de cinétique sont corrélées linéairement, quel que soit le système chromatographique étudié. Le facteur K augmente pour une série homologue lorsque la longueur de la chaine carbonée augmente. L'incrément est plus important lorsque le support présente une chaine greffée longue, ou que la densité du greffage est plus grande. Les différences dans les interactions stériques, comme le suggère Tchapla [144, 145], serait à l'origine du phénomène. En présence d'une phase greffée méthyle, il ne peut exister que des interactions planaires, alors qu'avec une chaine carbonée plus longue, les molécules peuvent pénétrer dans le maillage des greffons.

La diffusion dans le pore D_p est environ un ordre de grandeur plus faible que la diffusion intraparticulaire. La migration s'effectue donc principalement dans une zone proche des greffons par un mécanisme de diffusion de surface à partir de l'équation (66). Le mouvement des molécules adsorbées dans les pores est limité par des effets hydrodynamiques et par l'adsorption des molécules à la surface.

Le processus entrainant la diffusion de surface peut être subdivisé en plusieurs étapes élémentaires. Tout d'abord, il y a formation d'une cavité dans la couche adsorbée de solvant par désorption de molécules d'éluant. La taille de cette lacune doit représenter le tiers ou la moitié de la taille du soluté en adsorption. La création de cette lacune est un processus très énergétique. Dans un second temps, se produit le transfert de la molécule à analyser de son site d'adsorption vers celui qui vient d'être créé. Deux types d'interactions peuvent se produire à cet instant : la solvatation de l'échantillon par le solvant ou l'adsorption de l'échantillon sur la phase stationnaire. Enfin, l'espace laissé vacant est à son tour comblé par la phase éluante. Ainsi, il est possible d'exprimer l'énergie de diffusion de surface à partir de la décomposition des étapes :

$$E_s = E_h^s + E_j^s \tag{70}$$

avec E_h^s et E_j^s les énergies nécessaires respectivement pour créer la lacune et générer le déplacement d'un site à l'autre. La valeur de E_h^s est d'environ un ordre de grandeur supérieur à celle de E_j^s. Les paramètres influençant la formation de la cavité à la surface de l'adsorbant sont l'hydrophobie des ligands et la taille des solutés, tandis que le processus de saut est influencé par l'aire hydrophobe de la surface du support (qui diminue lors de l'adsorption), mais également par la taille du soluté.

Suite à l'observation de la dépendance de la diffusion de surface à la température, qui est identique à celle de la diffusion moléculaire à la température, les auteurs ont voulu relier les deux phénomènes. Lorsque la chaleur d'adsorption est nulle, la diffusion de surface s'approche de la diffusion moléculaire. La diffusion à la surface peut alors être considérée comme une diffusion dans le liquide, restreinte par les interactions d'adsorption ; c'est-à-dire une diffusion se déroulant dans le champ potentiel d'adsorption du support. Ainsi, D_s peut s'exprimer sous la forme :

$$D_s = D_m \exp\left(\frac{-\beta_c\left(-Q_{st}\right)}{RT}\right) \tag{71}$$

où β_c est une grandeur inférieure à 1. Cette approche permet d'expliquer deux aberrations dont principalement, la corrélation entre D_s et D_m pour des solutés faiblement retenus. En effet, dans ce cas là, l'énergie de formation des lacunes ne peut pas être négligée et la diffusion de surface doit être exprimée de la manière suivante pour obtenir des valeurs numériques comparables des différentes diffusions :

$$D_s = D_{s0} \exp\left[\frac{-E_h - \beta_c\left(-Q_{st}\right)}{RT}\right] \tag{72}$$

Cette théorie met en exergue la présence de trois contributions à l'énergie d'activation : la désorption partielle, la fabrication de la cavité et le saut d'un site à l'autre. Les deux premiers processus sont importants et doivent être pris en compte lors de la discussion d'un mécanisme de diffusion de surface d'un point de vue thermodynamique.

Dans cette revue de littérature, nous avons décrit l'ensemble des moyens technologiques qui vont être mis en œuvre pour réaliser les expériences de RMN Chromatographique ainsi que les techniques qui ont été développées pour appréhender les interactions entre une phase stationnaire chromatographique et la phase liquide.

La méthode utilisée dans ce mémoire consiste à ajouter un support chromatographique à un mélange liquide pour diminuer sélectivement le coefficient de diffusion de chaque soluté. L'ajout de la phase solide est responsable de l'anisotropie et donc d'une dégradation de la qualité spectrale. Pour résoudre ce problème, l'échantillon a été mis en rotation à un angle précis et connu par rapport au champ magnétique statique : l'angle magique. Comme la RMN Chromatographique a été utilisée pour appréhender les interactions à proximité du support stationnaire, nous avons décrit les travaux réalisés en RMN qui avait cette même finalité.

Nous nous sommes également intéressés à l'approche des moments en CLHP pour mesurer des coefficients de diffusion dans différents états adsorbés des solutés.

L'ensemble des chapitres précédents avait pour finalité d'introduire la RMN Chromatographique en tant qu'outil pour comprendre une partie des interactions entre un support chromatographique et une phase liquide.

MATERIELS ET METHODES

1. Matériels

1.1. RMN HRMAS

Le spectromètre utilisé dans le cadre des travaux exposés dans cette thèse est commercialisé par Bruker Biospin (Wissembourg, France) et possède une fréquence de résonance de 400 MHz pour les noyaux ^{1}H. L'appareillage est un modèle Avance 400. La sonde HRMAS possède trois canaux permettant d'étudier les noyaux ^{1}H et ^{13}C tandis que le canal du ^{2}H sert à verrouiller le champ/fréquence (*lock*). Elle est équipée d'un thermocouple pour mesurer la température, ainsi que d'une résistance chauffante. Pour réaliser les mesures de diffusion, la sonde comporte une bobine de gradient capable de produire des gradients de 55 $G.cm^{-1}$ au maximum, alignés selon l'axe de l'angle magique. Les rotors utilisés ont un diamètre de 4 mm et un volume de 12 ou 50 µL. Le rotor est fermé à chaque extrémité par un insert hémisphérique, celui du haut possèdant un orifice de faible diamètre pour libérer le surplus d'échantillon. Cet orifice est ensuite fermé à l'aide d'une vis et un bouchon à ailette est ajouté permettant ainsi la rotation du rotor à partir d'un flux d'air comprimé (Figure 9). Les expériences, sauf indication contraire dans le texte, sont réalisées avec un rotor de 50 µL, à une vitesse de rotation de 4000 Hz et une température de 303°K.

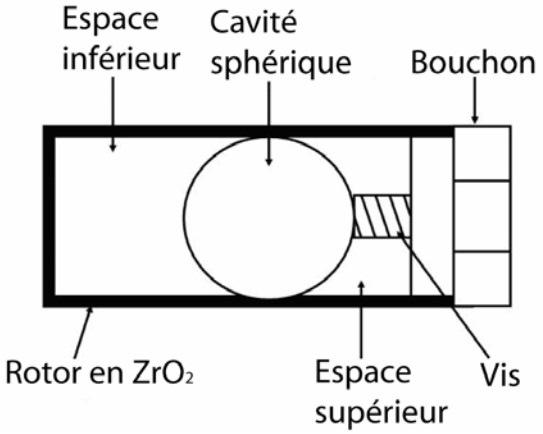

Figure 9 : Schéma d'un rotor.

Le traitement des données est réalisé à partir d'une console *Silicon Graphics* et à l'aide du logiciel fourni par le constructeur : *XWinNMR v3.2*.

1.2. Chromatographie

L'appareillage utilisé est composé d'une pompe L-6000 (Merck), d'un détecteur UV-visible Jasco UV-975 et d'un intégrateur D-2500 (Merck). La vanne d'injection (Rhéodyne 772i) est

équipée d'une boucle d'injection de 10 µL. Les colonnes utilisées sont une Lichrospher100® C18 250*4 mm (5 µm) et une Lichrocart60® Si 250*4 mm (5 µm) fabriquées par Merck (Darmstadt, Allemagne). Le débit a été fixé à 1,0 $mL.min^{-1}$. Les composés aromatiques sont détectés à une longueur d'onde de 254 nm, avec une sensibilité de 0,01.

1.3. Phases chromatographiques, solvants et solutés

Pour les études en RMN, les supports stationnaires utilisés sont conditionnés en vrac. Les phases chromatographiques poreuses utilisées proviennent de chez Merck. Il s'agit de support Lichrospher100® Si (5 µm), Lichrospher300® Si (10 µm), Lichrospher100® C18 (5 µm) et de Lichrospher100® C18e (5 µm) —post-greffé—. Les phases non poreuses (vierge et greffée) ont été gracieusement fournies par le Docteur Frank Steiner et ont été fabriquées par Micra. Les principales caractéristiques physico-chimiques de ces supports sont résumées dans le Tableau 3

Nom	Phase 100Å ODS	Phase 100Å ODS post-greffé	Phase non poreuse ODS	Support de silice 100Å	Support de silice 300Å	Suport de silice non poreux
Fournisseur	Merck	Merck	MICRA	Merck	Merck	MICRA
Phase	ODS	ODSe	ODS	Silice	Silice	Silice
Taille des particules (µm)	5	5	1,5	5	10	1,5
Taille du pore (Å)[1]	100	100	S.O.	100	300	S.O.
Surface spécifique ($m^2.g^{-1}$)	350	350	2	400	80	2
Surface à l'intérieur du rotor (m^2)	8,75	8,75	0,10	10,00	2,00	0,10

Tableau 3 : Propriétés physico-chimiques des phases chromatographiques utilisées.
[1] S.O. est pour Sans Objet.

Les solvants deutériés proviennent de chez Eurisotope (Saint-Aubin, France). Tous les autres produits ont été fournis par VWR International (Fontenay sous-bois, France). Les solvants sont de qualité pour la CLHP.

Pour les expériences en RMN, le mélange composé de naphtalène d'éthanol et de dec-1-ène dans de l'éthanol-d6 est préparé à partir de 6,5 mg de naphtalène, mélangés à 20 µL de dec-1-ène, 10 µL d'éthanol et 200 µL d'éthanol-d6.

La série homologue des aromatiques est composée d'un mélange de benzène (90,0 $g.L^{-1}$), de naphtalène (9,0 $g.L^{-1}$) et d'anthracène (1,6 $g.L^{-1}$) dans des solvants protonés ou deutériés, en proportions variables.

Les études avec la série homologue des cétones sont réalisées en étudiant les solutés un par un dans le rotor. La superposition des pics en RMN rend impossible l'étude en mélange de ces trois cétones. Chaque échantillon est préparé en prélevant 10 µL de la cétone auxquels 100 µL du mélange de solvants deutériés de composition précise sont ajoutés.

Lors de l'étude de l'influence de la rotation sur le coefficient de diffusion en absence de phase, l'échantillon utilisé contenait 2 mM de sulfate de cuivre dans de l'eau lourde pour diminuer le temps de relaxation des ^1H de l'eau résiduelle.

Concernant les expériences en CLHP, seule la série des aromatiques a été étudiée. Les concentrations ont été diminuées et l'échantillon est composé de benzène (770.10^{-3} $g.L^{-1}$), de naphtalène (90.10^{-3} $g.L^{-1}$) et d'anthracène (5.10^{-3} $g.L^{-1}$), dissous dans la phase mobile constituée d'un mélange ACN/eau.

2. Méthodes

2.1. Préparation de l'échantillon RMN

En absence de phase chromatographique, 55 µL du mélange à étudier sont introduits dans le rotor qui est ensuite obturé par l'insert. Le surplus de liquide est éliminé à l'aide d'un papier absorbant, puis le rotor est fermé à l'aide de la vis et du bouchon.

Pour les mesures en présence de phase chromatographique, la phase est introduite dans le rotor, puis tassée jusqu'à environ la moitié du volume du rotor. Ensuite, 10 µL de mélange sont ajoutés, puis le volume du rotor est complété avec de la phase, sans la tasser. La mise en place de l'insert permet de compacter la phase, sur la partie supérieure. L'excès de solide est éliminé, avec précaution, à l'aide d'un jet d'air comprimé, puis le rotor est fermé. Les rotors peuvent contenir environ 25 mg de support poreux et environ 50 mg de support non poreux.

2.2. Réalisation d'une expérience RMN PGSE

Avant de procéder à l'expérience de la mesure du coefficient de diffusion, la force des gradients, caractérisée par la durée de l'impulsion δ et le temps de diffusion Δ, est calibrée. Les données sont exploitables pour une atténuation du signal comprise entre 1 et 10 %, entre

l'expérience réalisée avec le gradient le plus faible et celle effectuée avec le gradient le plus important. Deux expériences sont donc mises en œuvre au préalable : l'une avec le pourcentage de gradient le plus faible (généralement 2 % de la puissance maximale) et l'autre avec celui le plus intense (95 %), dans le but de déterminer les valeurs optimales de δ et Δ. Pour limiter les courants de Foucault, toutes les impulsions de gradients ont une forme sinusoïdale. L'ordre de grandeur des différents délais et impulsions utilisés est donnée dans le Tableau 4. La séquence d'impulsion utilisée est la BPP-LED représentée sur la Figure 3.

La mesure du coefficient de diffusion est effectuée à partir d'une série de spectres obtenue dans des conditions où seule l'intensité des gradients varie. Cette intensité est exprimée en pourcentage de la puissance maximale des gradients. Chaque valeur du pourcentage est déterminée à partir d'une liste créée avant l'expérience. Nous avons utilisés des variations logarithmiques lorsque la décroissance du signal était rapide, une liste quadratique pour étudier des points avec des valeurs élevées d'inhomogénéité de champ magnétique et une rampe linéaire dans tous les autres cas. Classiquement, nos expériences comprenaient 16 pourcentages différents de gradients (parfois 32) et pour chaque intensité, 16 ou 32 acquisitions ont été réalisées.

Catégorie des paramètres		Description des paramètres	Notation constructeur[1]	Ordre de grandeur[2]
Impulsions radiofréquences		Puissance de la RF	pl1	1 dB
		Impulsion 90°	p1	5 µs
		Impulsion 180°	p2	10 µs
Grandeurs permettant d'augmenter la qualité des spectres		Durée de la LED	d21	5 ms
		Impulsion des *spoil gradients*	p19	1 ms
		Intensité *spoil gradients*	gpz7	-13,17%
			gpz8	-17,13%
Diffusion	Diffusion rapide (Benzène, cétones, solvants) $\sim 10^{-8}$ m².s^{-1}	Impulsion des gradients	p30	500 µs
		Durée de diffusion	d20	50 ms
	Diffusion modérée (Naphtalène) $\sim 10^{-9}$ m².s^{-1}	Impulsion des gradients	p30	1200 µs
		Durée de diffusion	d20	200 ms
	Diffusion lente (Anthracène, greffons) $\sim 10^{-11}$ m².s^{-1}	Impulsion des gradients	p30	2200 µs
		Durée de diffusion	d20	800 ms

Tableau 4 : Ordre de grandeur des impulsions et des délais utilisés dans la séquence BPP-LED.
[1] la notation p est utilisée pour des impulsions tandis que d représente des délais, [2] les impulsions sont exprimées en µs et les délais en ms

2.3. Traitement des données

Une fois le spectre acquis, la TF et la correction de la phase réalisée, tous les pics correspondant à des entités dont la diffusion sera mesurée sont marqués et intégrés. Il est alors possible de représenter l'intensité ou l'aire des pics, en fonction de l'aire des impulsions de gradients. Nous obtenons un graphe avec 16 (ou 32) points qu'il est possible d'interpoler à partir de l'équation suivante, si, et seulement si, un seul coefficient de diffusion correspond au pic étudié :

$$I = I_0 \exp\left[-D\left(\delta g \gamma\right)^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)\right] \qquad (73)$$

Dans cette équation, I est l'intensité ou l'aire mesurée pour chaque valeur de gradient, I_0 est l'intensité ou l'aire en absence de gradient. Tous les autres termes, à l'exception de D le coefficient de diffusion, sont des paramètres connus qui dépendent soit de l'expérience (δ, Δ et g), soit des propriétés du spin (γ). Ainsi, la régression passant par tous les points de la représentation $\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = f\left(g^2\right)$ permet d'obtenir l'ADC à partir de la pente de la droite (Figure 10).

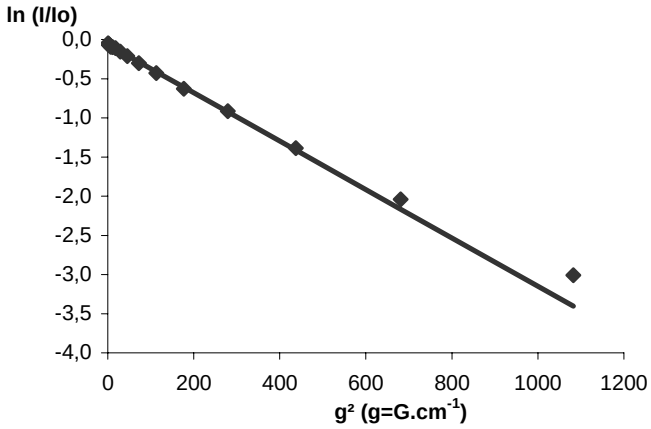

Figure 10 : Exemple de représentation de la droite $\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = f\left(g^2\right)$ obtenu à partir du pic de la butanone dans un mélange de solvant deutérié ACN/Eau, 90/10, v/v. Les points représentent les valeurs expérimentales et la droite est obtenue à partir de la meilleure régression mono-exponentielle (en n'estimant la présence d'une seule diffusion dans la décroissance).

Pour tracer une carte DOSY (Figure 11), le nombre de points dans la dimension de la diffusion est augmenté à 128, puis le calcul selon le modèle présenté dans l'étude

bibliographique (paragraphe 2.2.3.1) est réalisé. La durée du calcul varie de l'ordre de quelques secondes à la minute.

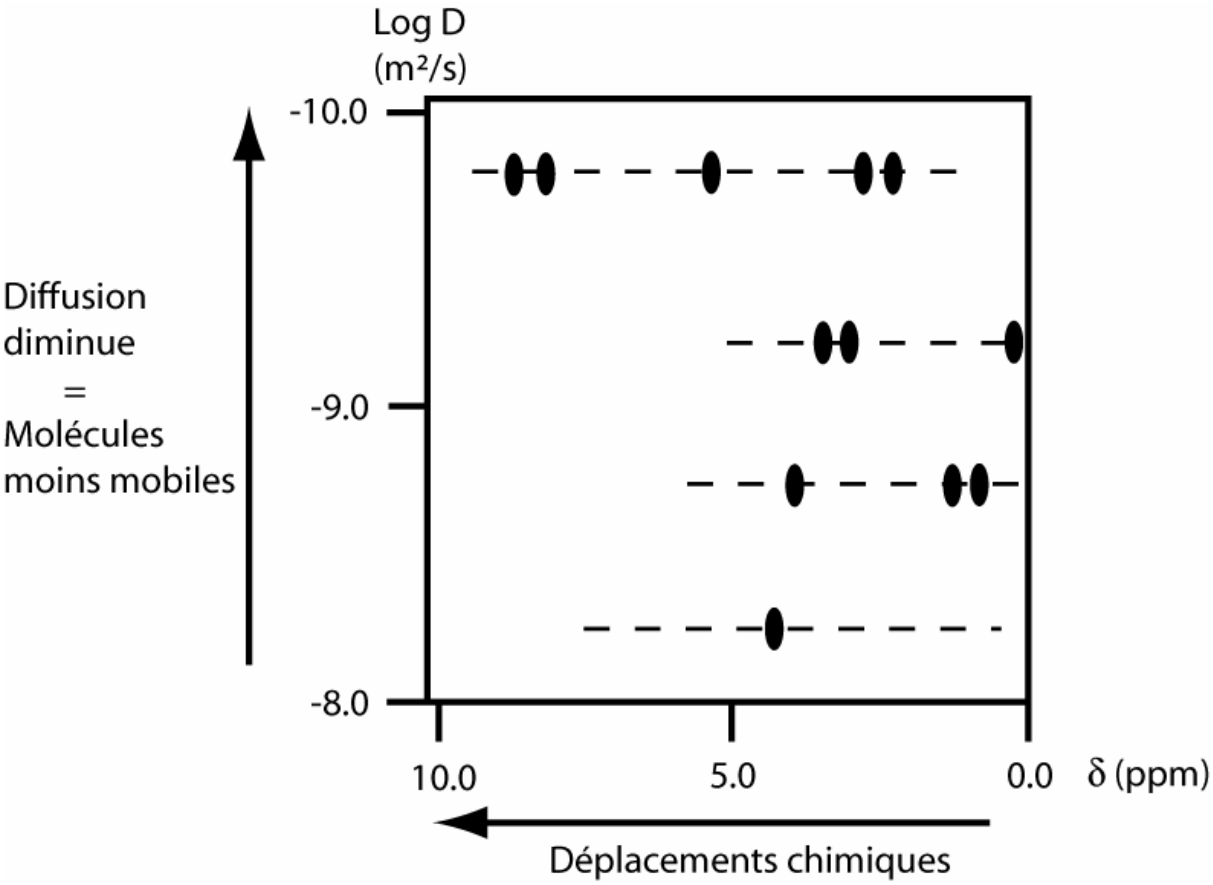

Figure 11 : Formalisme utilisé dans le présent manuscrit pour les représentations DOSY. Sur la Figure, quatre molécules sont contenues dans le mélange.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Introduction

Le mécanisme de rétention en RPLC fait toujours l'objet de polémique et diverses théories ont été développées. Horvath [9], dans une revue de littérature, a détaillé les différents principes de rétention supposés et les méthodes d'interactions entre les solutés et le support chromatographique. La RMN est une alternative de choix pour étudier les interactions entre une phase stationnaire chromatographique et des solutés. En effet, le développement de la RMN des gels et de l'imagerie a permis des études dynamiques des phénomènes de rétention et d'approcher ainsi, les conditions expérimentales de la CLHP.

Une technique non exploitée dans ce domaine est la mesure du coefficient de diffusion et l'étude du ralentissement sélectif des solutés en présence de phase chromatographique. Le laboratoire a profité des avancées technologiques de la RMN permettant l'utilisation d'aimants à haut champ magnétique, d'une sonde ^{1}H HRMAS, ainsi que d'impulsions de gradients pour mesurer des coefficients de diffusion dans un milieu hétérogène. La banalisation du traitement des données d'une expérience de diffusion et sa représentation par une carte 2D ont contribué à l'avancement de ces travaux de recherche.

L'objectif de cette thèse a consisté à exploiter la méthode mise au point au laboratoire [131] pour mettre en évidence les interactions se produisant dans le rotor et à comparer les résultats obtenus en HRMAS à ceux issus de la chromatographie, et ce dans le but d'appréhender la compréhension des interactions à l'interphase entre le solide et le liquide, au niveau des supports de CLHP disponible commercialement. Cette étude se place dans la continuité de travaux qui impliquent la RMN pour explorer la rétention chromatographique, et ce tout en développant une méthodologie originale, qui consiste à mélanger de la phase stationnaire avec des solutés et à étudier la variation des coefficients de diffusion apparents, créée par l'ajout du support.

2. Optimisation des conditions opératoires

A cause de l'originalité de la technique utilisée au cours des travaux présentés dans ce manuscrit, il s'est avéré nécessaire, dans un premier temps, d'optimiser le traitement de l'échantillon pour déterminer les meilleures conditions expérimentales. De plus, comme peu de travaux ont été réalisés en combinant la MAS et la mesure de diffusion, il était opportun d'étudier l'influence de certains paramètres, comme notamment la vitesse de rotation, sur la mesure de la diffusion.

2.1. Préparation de l'échantillon

La maîtrise de la préparation de l'échantillon conditionne la répétabilité des résultats. Une étude précise des facteurs pouvant modifier le processus de diffusion est nécessaire. Nous avons donc envisagé d'étudier l'influence de tous les paramètres intervenant au cours du traitement de l'échantillon en terme de répétabilité des mesures des ADC.

2.1.1. Volume de liquide dans le rotor

Le rotor est rempli d'un mélange de phase stationnaire solide, avec une phase liquide. En première approximation, le ralentissement des solutés, dans des conditions d'équilibre, devrait dépendre du ratio liquide/solide. Nous avons donc étudié l'évolution de la qualité de la séparation en fonction de la quantité du mélange liquide en présence de phase stationnaire ODS poreuse. Ce travail à été le premier réalisé. Le mélange choisi comporte du naphtalène, du dec-1-ène et de l'éthanol. C'est ainsi qu'avait été décrit le premier exemple de séparation de composés à l'aide de cette technique [131]. Les cartes DOSY, en fonction du volume de liquide dans le rotor, sont présentées sur la Figure 12.

Il apparaît clairement qu'un volume de liquide trop important nuit à la résolution, dans la dimension de la diffusion. Lorsque le volume de solution introduit dans le rotor augmente, le nombre de contacts entre le naphtalène et la phase diminue, ce qui se traduit par une augmentation de l'ADC, soit une tache se déplaçant vers le bas de la carte DOSY. L'éthanol, qui est le soluté le plus rapide, présente un ADC qui ralentit quand le ratio liquide/solide est augmenté. Cette observation peut s'expliquer par un changement de rhéologie de l'échantillon, dont la texture devient pâteuse.

Nous avons choisi d'introduire dans le rotor un volume de 10 µL de phase liquide. En effet, c'est pour ce volume que la résolution dans la dimension de la diffusion est la meilleure, tout en conservant un rapport signal/bruit élevé, pour un faible nombre d'acquisition (seize acquisitions pour chaque spectre ^{1}H).

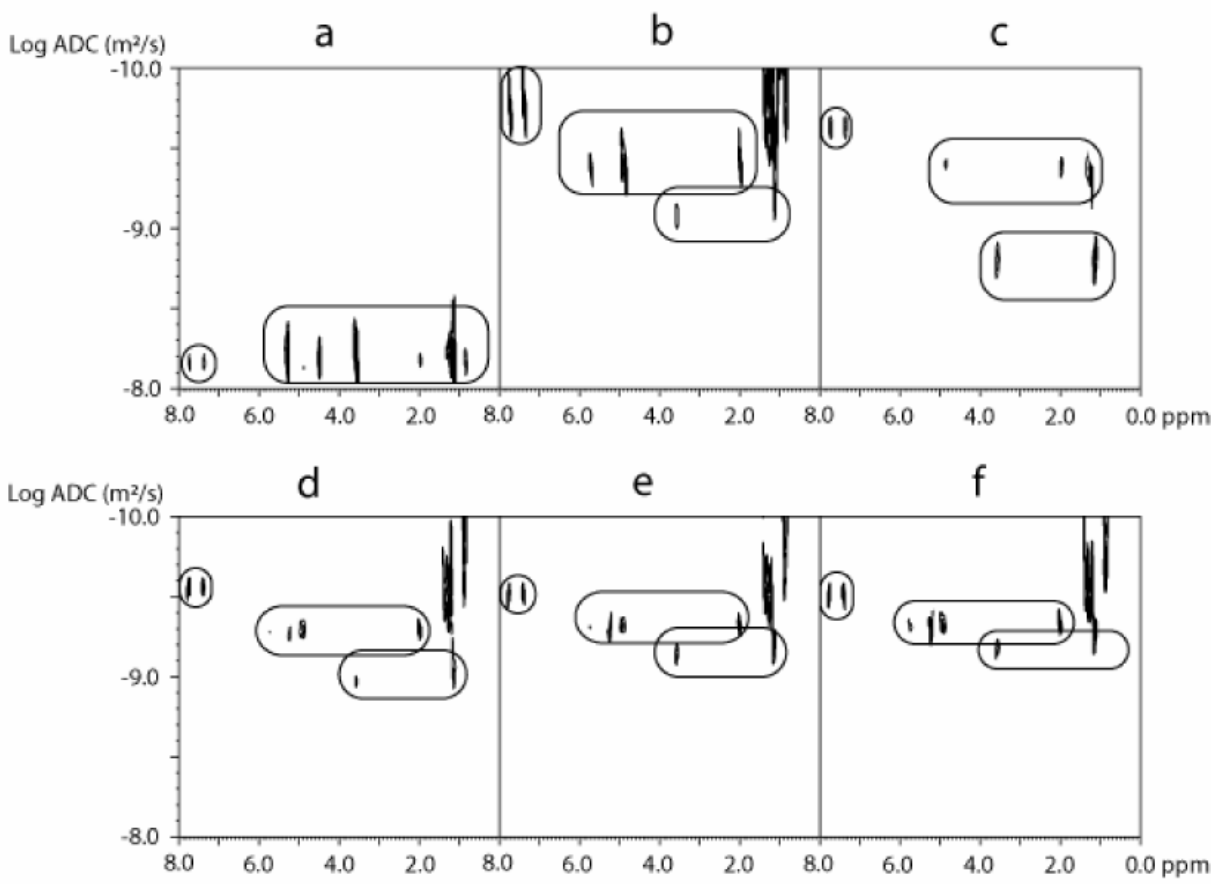

Figure 12 : Influence du volume de liquide sur la résolution dans la dimension de la diffusion. Mélange de naphtalène, dec-1-ène et d'éthanol dans de l'éthanol-d6 (a) sans phase stationnaire, en présence de support ODS et de (b) 5 µL, (c) 10 µL, (d) 15 µL, (e) 20 µL et (f) 25 µL de liquide.

2.1.2. Durée entre la préparation de l'échantillon et la mesure

En CLHP, il est préconisé de laisser s'équilibrer le système chromatographique pour obtenir une séparation optimale et répétable. Ce temps est nécessaire pour obtenir une bonne organisation du support sur toute la longueur de la colonne. Cette durée dépend du type de phase stationnaire, de l'éluant et du débit. Pour nous affranchir d'une éventuelle influence de l'intervalle de temps entre la préparation de l'échantillon et la mesure de l'ADC, la diffusion pour une même préparation a été mesurée sur une période couvrant plusieurs heures. Les résultats obtenus sont présentés pour deux compositions du mélange ACN/Eau, 100/0 et 80/20, v/v (Figure 13). L'ADC du benzène et du naphtalène, représentant ainsi une diffusion sur des échelles différant entre elles d'un ordre de grandeur, est constant au cours du temps. Les variations observées sont dues à l'erreur sur la mesure de la diffusion. A la différence de la CLHP, il n'est donc pas nécessaire de laisser « équilibrer » le mélange en RMN. Le temps consacré à la préparation de l'échantillon et de la mesure de l'ADC, soit la mise en rotation, suivie du réglage de l'homogénéité du champ et des différentes durées d'impulsions, n'influence pas la répétabilité des mesures.

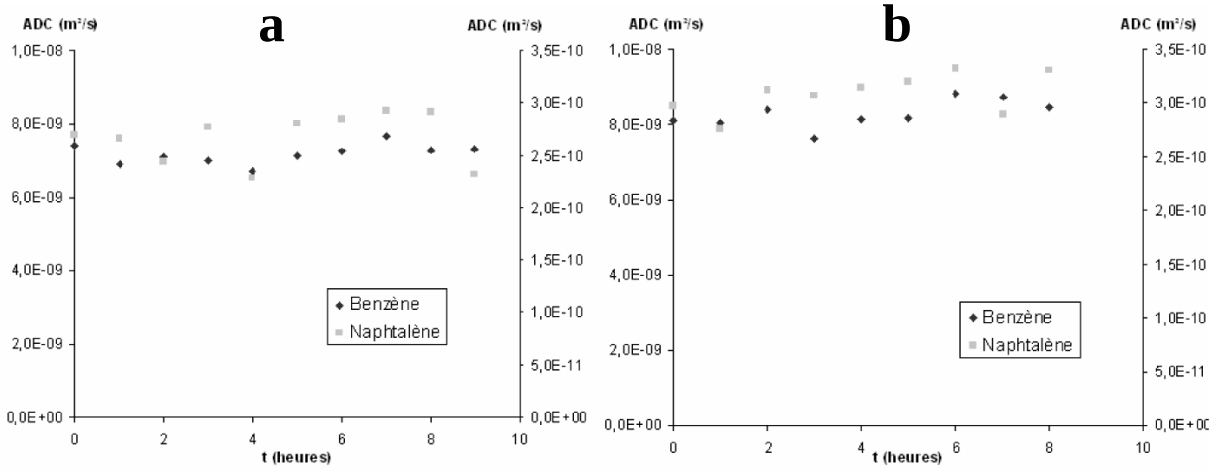

Figure 13 : Influence de la durée de préparation sur la mesure de l'ADC des solutés de la série homologue aromatique en présence de la phase stationnaire ODS. (a) avec de l'ACN et (b) avec un mélange ACN/Eau, 80/20, v/v. Les valeurs des ADC du benzène se réfèrent à l'échelle de gauche et ceux du naphtalène à celle de droite.

2.1.3. Concentration des solutés

Pour des raisons de solubilité, les analytes n'ont pas pu être étudiés dans les mêmes concentrations. Dans le cas des composés aromatiques, le benzène est 45 fois plus concentré que l'anthracène. Pour mettre en évidence un éventuel effet de la concentration sur l'ADC, nous avons étudié la diffusion du benzène dans un mélange de solvant deutérié ACN/Eau, 80/20, v/v (Figure 14). La valeur moyenne de l'ADC du benzène est de $8{,}43.10^{-9} m^2.s^{-1}$, tandis que le coefficient de variation, estimé sur l'ensemble des concentrations, est de 10 %. La variation de la diffusion de ce soluté sur la gamme de concentration étudiée n'est pas significative. Cette palette de concentrations couvre une gamme s'étendant sur deux ordres de grandeurs, représentative des mélanges étudiés. Il est donc raisonnable de négliger l'influence de la concentration sur la mesure de la diffusion des analytes dans les conditions décrites.

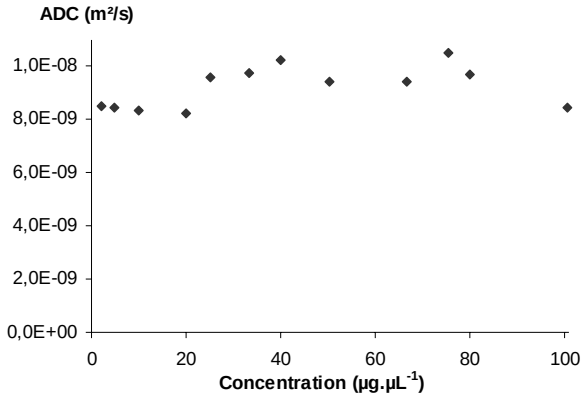

Figure 14 : Etude de la variation de l'ADC du benzène en fonction de sa concentration dans un mélange deutérié d'ACN/Eau, 80/20, v/v avec un support poreux ODS.

Des études ont également été réalisées sur deux supports de silice non greffés qui diffèrent par le diamètre moyen de pores : 100 ou 300Å. Nous avons comparé la diffusion du benzène à la même concentration que le naphtalène et inversement (Figure 15). Pour pouvoir dissoudre la quantité nécessaire de naphtalène, le cyclohexane a été utilisé comme solvant. Dans ce cas, les conditions expérimentales sont proches de celles de la chromatographique liquide en phase normale (*normal phase liquid chromatography,* NPLC).

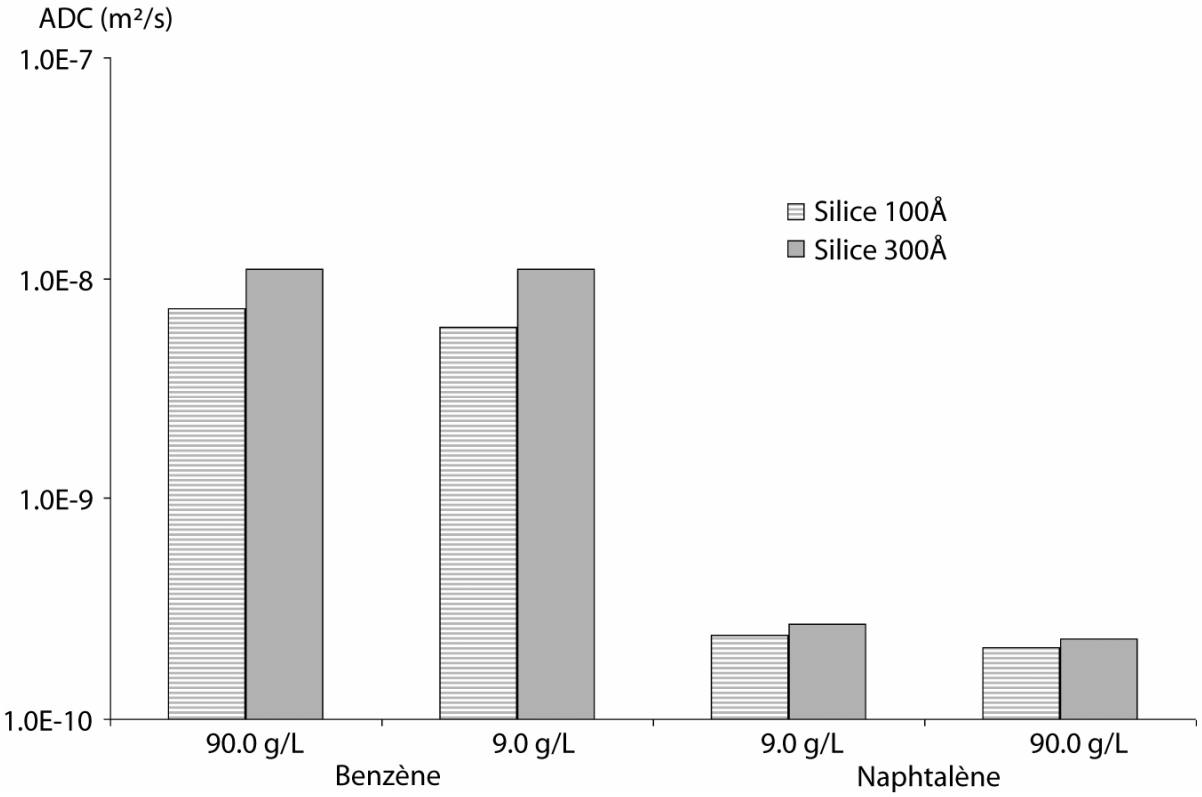

Figure 15 : Mesures des ADC du benzène et du naphtalène dans le cyclohexane à 90,0 ou 9,0 g.L^{-1} sur de la silice de diamètre moyen de pores de 100 et 300Å.

Que ce soit pour le benzène ou pour le naphtalène, et pour les deux concentrations auxquelles nous avons réalisés l'expérience, l'ADC n'est pas modifié. Il n'est pas sensible à un changement de concentration d'un facteur 10 dans les conditions choisies.

Ces résultats confirment qu'il n'y a aucun effet notoire de la concentration sur la diffusion, sur une gamme de concentrations pouvant s'étendre sur deux ordres de grandeurs environ en RMN Chromatographique.

2.1.4. Nature du solvant

En RMN, il est d'usage d'employer des solvants deutériés. L'absence de ^{1}H dans le solvant permet de s'affranchir du signal de cette espèce et d'éviter ainsi la présence d'un pic large et

intense. Toutefois, en CLHP, les solvants deutériés ne sont pas utilisés en raison de leurs coûts prohibitifs. Dans le cadre du développement du couplage CLHP/RMN, de nouvelles méthodes d'acquisition RMN ont été mises au point et il est maintenant possible d'employer des solvants protonés lors du couplage de ces deux techniques.

Il a été montré [146, 147] que la RPLC permettait de séparer des isotopomères et que la différence des temps de rétentions mesurée provenait d'une variation des interactions intermoléculaires entre la phase stationnaire et les solutés. Toutefois, à notre connaissance, cette différence de force dans les interactions n'a jamais été attribuée et n'est toujours pas expliquée. Le rôle de la nature de l'isotope de l'hydrogène du solvant sur le processus séparatif a été investigué. Nous avons ainsi mesuré l'ADC des solutés suivant que le solvant était protoné ou deutérié. La Figure 16 montre les résultats obtenus sur la série homologue aromatique pour trois compositions de solvants différentes. Quel que soit l'isotope du solvant, l'ADC des solutés demeure identique, ce qui confirme qu'en RMN Chromatographique, la nature de la phase mobile n'influe pas sur les interactions entre la phase stationnaire et les analytes. La même approche sera décrite ultérieurement (paragraphe 3.1.2 de ce chapitre) pour évaluer l'influence de chaque isotope non radioactif de l'hydrogène sur le comportement des greffons.

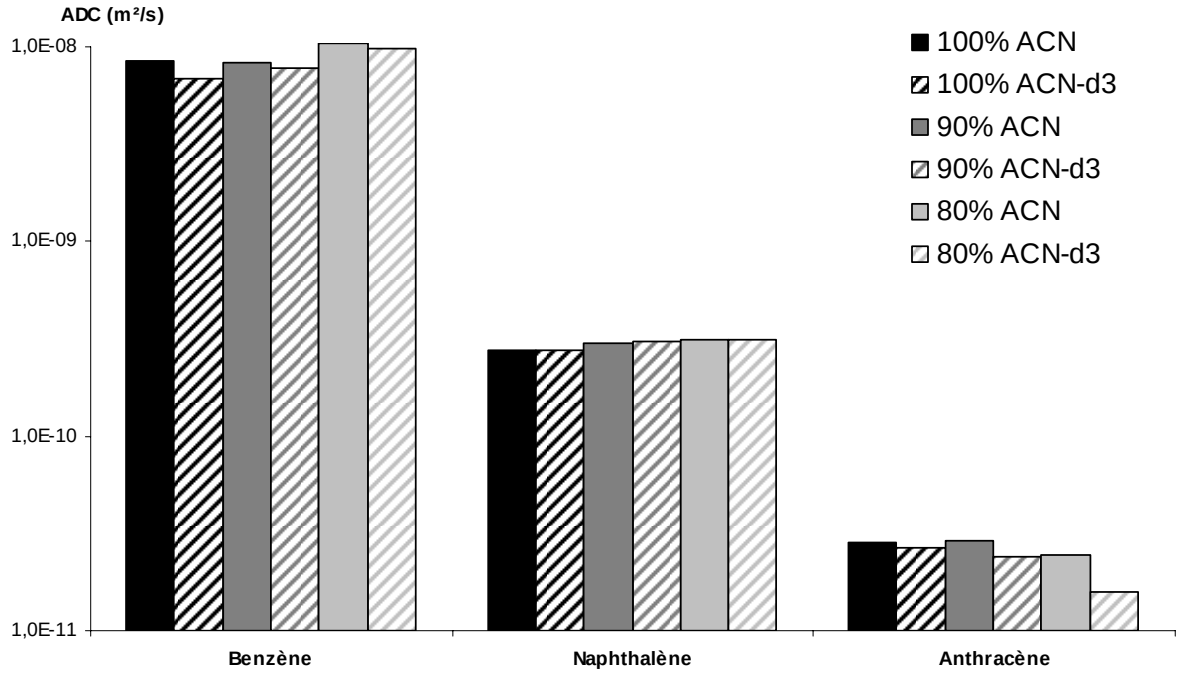

Figure 16 : Influence de l'isotope du solvant sur l'ADC des solutés. Trois compositions de solvants ont été étudiées. L'échelle de l'ADC est logarithmique.

2.2. Influence des paramètres MAS

Le peu d'études réalisées en combinant une MAS et une mesure de coefficient de diffusion n'aborde pas l'influence des paramètres due à la rotation. Pour s'affranchir d'éventuelles erreurs d'interprétation à cause de cette rotation, nous avons étudié l'influence de deux paramètres propres à l'utilisation de la sonde HRMAS : la vitesse de rotation de l'échantillon et le volume du rotor.

2.2.1. Vitesse de rotation

Pour pouvoir exploiter les spectres RMN des mélanges chromatographiques, nous avons montré qu'il était nécessaire que l'échantillon tourne suivant un angle de 54,7° par rapport au champ magnétique statique. Cependant, cette rotation peut entraîner un effet de centrifugation de l'échantillon et avoir une incidence sur les mesures de diffusion enregistrée.

La Figure 17 représente l'ADC à différentes vitesses de rotation, lorsque le rotor contient la série homologue aromatique (benzène, naphtalène et anthracène), avec une phase liquide composé d'ACN/eau, 80/20, v/v et en présence de phase chromatographique ODS. De 2000 à 5000 Hz, l'ADC ne varie pas et la valeur mesurée est constante, aussi bien pour le benzène (avec une valeur moyenne de $5{,}7.10^{-9} m^2.s^{-1}$ et un coefficient de variation de moins de 5 %) que pour l'eau qui présente une diffusion de $1{,}7.10^{-9} m^2.s^{-1}$. La valeur à 1000 Hz est légèrement plus élevée et semble se démarquer des autres mesures. Cependant, à cette vitesse de rotation, la résolution spectrale est faible et la présence de bandes de rotation complique l'analyse. Les pics du benzène et du naphtalène se recouvrent en partie, rendant la mesure incertaine. Comme l'ADC ne varie pas sur l'ensemble des vitesses étudiées, le choix d'une fréquence de 4000 Hz s'est imposé, car elle permet d'obtenir la plus faible largeur des raies et d'éviter ainsi la présence de bandes de rotation dans le spectre RMN 1D. Des résultats similaires ont été obtenus avec les autres analytes.

Les mêmes expériences ont été réalisées en absence de phase. Le travail originel consistant à quantifier la puissance maximale des gradients en fonction de la vitesse de rotation, l'échantillon utilisé est de l'eau contenant du sulfate de cuivre, à une concentration de 2 mM, afin de diminuer le temps de relaxation des ^1H du solvant. Pour des vitesses de rotation variant de 1000 à 5000 Hz, le coefficient de diffusion moyen de l'eau est de $2{,}1.10^{-9}\ m^2.s^{-1}$ (avec un coefficient de variation, établi sur l'ensemble des vitesses, de 6 %). Nous pouvons considérer, sur la gamme de vitesse de rotation étudiée, que la fréquence de rotation du rotor n'a pas d'influence sur l'ADC mesuré en présence ou en absence de phase. Comme nous

souhaitons comparer ces données avec celles obtenues en présence de phase, l'échantillon liquide sera mis en rotation à la même vitesse que l'échantillon hétérogène soit 4000 Hz.

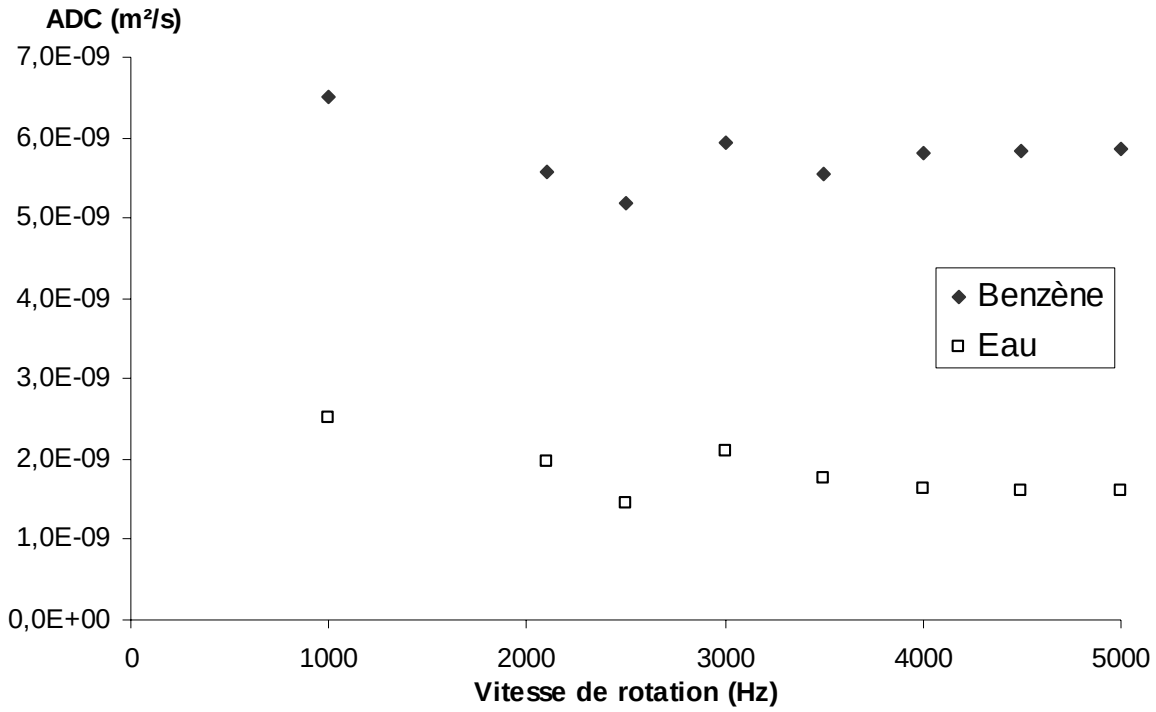

Figure 17 : Influence de la vitesse de rotation sur l'ADC mesuré en présence de phase chromatographique. Le mélange étudié est composé de la série homologue aromatique dans un solvant ACN/Eau, 80/20, v/v.

2.2.2. Volume du rotor

Les rotors utilisés en HRMAS se caractérisent par des volumes spécifiques. Il est nécessaire de remplir totalement le rotor et d'éviter la présence de bulles d'air qui pourraient engendrer une susceptibilité du champ magnétique, dégradant alors la résolution spectrale. Nous disposons au laboratoire de rotors de 12 ou 50 µL. Ceux de 12 µL ont une capacité insuffisante pour les études en présence de phase chromatographique. En effet, le volume de liquide qui pourrait être introduit est trop faible pour qu'un signal puisse être enregistré. En revanche, pour étudier la diffusion des solutés dans le liquide seul, les deux volumes de rotors conviennent. Il est donc nécessaire de mesurer l'ADC des espèces en fonction du volume du rotor. Les différents essais mis en œuvre sont décrits dans le Tableau 5.

La diffusion est de trois à douze fois plus lente avec un rotor de 12 µL, qu'avec le rotor de 50 µL. A la suite de cette constatation, nous avons décidé, pour pouvoir comparer tous les résultats, d'employer uniquement des rotors de 50 µL. Aucune investigation n'a été menée pour déterminer les causes de cette différence, mais nous pouvons émettre quelques hypothèses. Tout d'abord, le volume actif du rotor étant plus faible, il est possible que

l'homogénéité des gradients le long du rotor ne soit pas parfaite, entrainant une erreur sur les mesures. Cette hypothèse est peu réaliste, car les décroissances sont exploitables et la régression des points présente un facteur de corrélation élevé. L'hypothèse la plus probable consiste en une différenciation dans les forces centrifuges s'exerçant au niveau du rotor, se traduisant alors par un impact sur l'ADC.

Mélange étudié		ADC ($m^2.s^{-1}$) selon le volume du rotor	
		12 µL	50 µL
10 µL de benzène dans	Benzène	$4{,}4.10^{-9}$	$15{,}2.10^{-9}$
100 µL d'ACN	Acétonitrile	$5{,}5.10^{-9}$	$17{,}8.10^{-9}$
10 µL de benzène dans	Benzène	$1{,}2.10^{-9}$	$8{,}3.10^{-9}$
100 µL d'hexadécane	Hexadécane	$0{,}6.10^{-9}$	$7{,}2.10^{-9}$

Tableau 5 : Influence du volume du rotor sur les ADC du mélange.

L'étude des conditions opératoires et l'influence de certains paramètres nous ont amené à établir un protocole strict de préparation des échantillons, de manière à obtenir des résultats reproductibles et à pouvoir comparer les données obtenues dans les différentes études. Ainsi, toutes les expériences ont été réalisées avec un rotor de 50 µL, en rotation à 4000 Hz. Les échantillons hétérogènes contiennent 10 µL de phase liquide. De plus, comme la température a une influence sur la diffusion (équation (2)), toutes les expériences ont été réalisées à 303°K.

3. Influence des propriétés du mélange liquide

En CLHP, la qualité de la séparation dépend du support chromatographique et de l'éluant choisi pour réaliser la séparation. Dans les paragraphes qui suivent, nous nous sommes intéressés principalement à l'influence des paramètres liés à la phase liquide introduite dans le rotor sur la valeur des ADC. Nous avons choisi pour réaliser cette étude, un support conventionnel très répandu en RPLC : un support de silice greffé ODS présentant un diamètre de pore moyen de 100Å.

3.1. Etude des greffons

Le greffage d'une chaine carbonée sur la silice permet de modifier le mécanisme de rétention et de procéder en RPLC. Le modifiant organique et la phase mobile dans son ensemble

participe à l'organisation du greffon. La phase peut être comparée [7] à une barrière de piquets lorsqu'elle est déployée verticalement sans molécule liquide à l'intérieur du support, à une organisation de type broussaille lorsque le soluté s'insère dans les greffons et à une meule de foin lorsque les molécules sont immergées dans le support. Une combinaison de ces trois représentations est également envisageable, quand les chaînes ne sont pas totalement rigides et interagissent avec les solutés et le solvant.

Les greffons jouent un rôle important dans le processus de rétention en CLHP. Nous nous sommes donc intéressés à la variation de leur ADC dans différents mélanges de solvants pour mettre en évidence leur mobilité et l'évolution de la structure de la phase stationnaire. Dans les paragraphes qui suivent, les ADC des greffons ont été mesurés soit uniquement en présence de solvant, soit avec la série homologue aromatique.

3.1.1. Etude du spectre RMN 1D

La phase greffée employée se caractérise par deux signaux aux environ de 1 ppm (Figure 18), qui correspondent aux protons des groupements méthylènes du greffon pour le signal le plus déblindé et au méthyle terminal pour le signal avec la fréquence la plus élevée. La largeur de raie spectrale est plus importante pour le support que pour les solutés. En effet, comme les greffons sont moins mobiles que les solutés, la largeur des raies, proportionnelle au temps de relaxation T_2, est initialement plus importante pour cette espèce. Le moyennage des interactions anisotropes est par conséquent, moins performant pour la phase que pour les analytes.

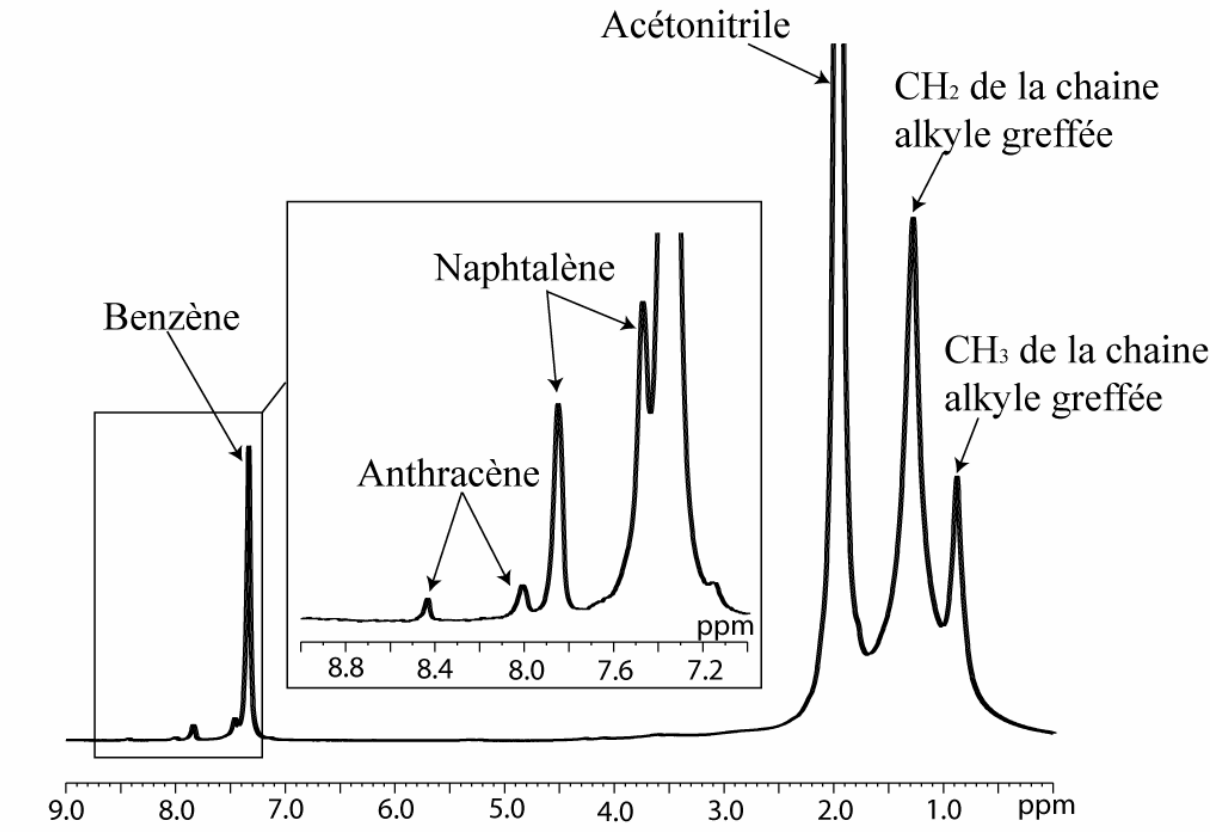

Figure 18 : Spectre RMN ^{1}H HRMAS de la phase chromatographique ODS poreuse et des solutés de la série homologue aromatique dissout dans de l'ACN.

La mesure de l'ADC de la phase présente une décroissance multiexponentielle du signal (Figure 19) caractéristique de l'existence de plusieurs coefficients de diffusion. La meilleure correspondance entre les données expérimentales et l'équation (73) est obtenue lorsque les données sont traitées comme une décroissance biexponentielle. La présence de deux ADC est observée pour les deux signaux du support. Le pourcentage de chaque diffusion est déterminé à l'aide de la droite de régression. Pour la phase stationnaire, la composante rapide est majoritaire en contribuant pour plus de 80 % à la régression.

L'explication de cette multi-exponentialité est relativement complexe. Dans un premier temps, nous avons supposé que la diffusion rapide était due à des greffons « mouillés » et la diffusion lente à des greffons peu mobiles sur un support totalement sec. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé de la silice ODS, préalablement séchée plusieurs jours à l'étuve à 150°C et de la phase greffée fortement mouillée par l'ajout d'une quantité importante de solvant. Les décroissances enregistrées pour les chaines alkyles auraient du être mono-exponentielles ou se caractériser par des pourcentages pour chaque composante variant significativement par rapport aux conditions optimales de préparation de l'échantillon. En pratique, quel que soit le traitement du support, l'allure des décroissances reste inchangée. Les

différentes diffusions mesurées pourraient alors représenter la mobilité des greffons extra- et intraparticulaires. Nous reviendrons ultérieurement sur cette hypothèse (paragraphe 4.2.2).

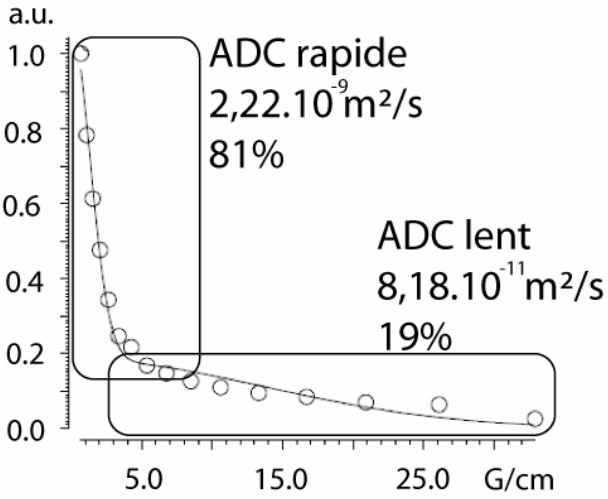

Figure 19 : Décroissance du signal RMN de la phase stationnaire en fonction de l'aire des gradients en présence d'un mélange composé d'ACN/Eau, 90/10, v/v. La décroissance est multi-exponentielle.

3.1.2. Isotope du solvant

Nous avons montré précédemment (paragraphe 2.1.4 de ce chapitre) qu'il était possible d'utiliser indifféremment des solvants protonés ou deutériés pour étudier la diffusion des solutés. Nous avons supposé que l'organisation de la phase stationnaire chromatographique et plus particulièrement celle des greffons, est identique quelque soit l'isotopomère utilisé. Nous avons donc estimé la mobilité des greffons avec les deux types de solvants, à différentes compositions. En utilisant de l'ACN deutérié, les ADC mesurés sont de $1{,}2.10^{-11}$ $m^2.s^{-1}$ et de $2{,}3.10^{-10}$ $m^2.s^{-1}$, respectivement pour la partie non mobile et mobile des chaines alkyles. Dans le cas de l'ACN protoné, l'ADC est environ huit fois plus important pour la composante lente ($9{,}5.10^{-11}$ $m^2.s^{-1}$), alors que les greffons les plus mobiles sont seize fois plus rapides qu'avec les solvants deutériés ($3{,}7.10^{-9}$ $m^2.s^{-1}$).

Contrairement à ce que nous attendions, les mesures des ADC varient significativement d'un isotope à l'autre. Deux organisations différentes du support coexisteraient probablement à cause d'une variation de la solvatation des greffons. Cette différentiation dans l'organisation du support n'a pas d'incidence sur l'ADC des solutés.

Récemment, Tchapla [148] a étudié la rétention de solutés en RPLC en fonction des isotopes utilisés comme phase mobile. Il a montré que le facteur de rétention augmentait, indépendamment du modifiant organique, lorsque l'eau était substitué par de l'eau lourde, mais que la sélectivité restait constante. Ces travaux montrent qu'il existe un effet isotopique

secondaire. En RMN, cet effet isotopique ne semble pas intervenir dans le ralentissement des ADC des analytes, comme leur coefficient de diffusion reste constant, quel que soit l'isotope utilisé. En revanche, cet effet est mis en évidence au niveau de la caractérisation de l'organisation du support stationnaire.

La mobilité des greffons n'intervient donc pas dans le processus séparatif de la RMN Chromatographique et il est possible d'utiliser indifféremment des solvants deutériés ou protonés.

3.1.3. Composition du solvant

Pour étudier la gamme complète des compositions du mélange de solvant (de 100/0 à 0/100, ACN/eau, v/v), aucun soluté n'est introduit dans le mélange. La Figure 20 représente les ADC rapide et lent en fonction de la composition volumique en ACN dans le mélange liquide.

L'ADC est mesuré pour les deux pics de la phase chromatographique, correspondant aux ^{1}H des CH_2 à 1,2 ppm et des CH_3 à 0,8 ppm, et la régression réalisée est biexponentielle pour chacun des pics. Que ce soit pour le signal à 1,2 ppm ou pour celui à 0,8 ppm, les valeurs des ADC mesurées sont voisines. Concernant la diffusion rapide, les ADC diminuent lorsque le pourcentage en eau augmente. Cette décroissance s'effectue par palier. Lorsque le solvant est riche en ACN, la mobilité des greffons diminue jusqu'à une composition de 80 % de modifiant organique, puis reste stable jusqu'à 60 % d'ACN. Si le mélange contient au moins 50 % d'eau, la mobilité de la chaine est constante et légèrement inférieure à celle mesurée avec 60 % d'ACN. Le pourcentage des espèces diffusant rapidement, lorsque les résultats sont traités en imposant deux ADC, est constant pour toutes les compositions de la phase liquide. Pour la diffusion lente des greffons, la mobilité n'évolue pas, qu'il s'agisse d'ACN pur, ou d'un mélange comportant une fraction volumique de plus de 40 % d'ACN. Pour des pourcentages de modifiant organique inférieur, la mobilité augmente fortement, lorsque la teneur en eau augmente. Alors que sur la gamme couvrant 60 % du domaine de composition de la phase liquide, aucune variation de la mobilité des greffons n'a été observée en terme de mesures de l'ADC. Suite à l'augmentation de 70 à 100 % de la fraction volumique en eau, l'ADC varie de plus de 140 %. Les variations des deux diffusions, rapide et lente, sont antagonistes : l'ADC rapide diminue lorsque la composition de la phase liquide est enrichie en eau et l'ADC lent augmente, lorsque la teneur en eau est élevée.

En se référant aux données de la diffusion rapide, nous pouvons supposer suivre l'évolution du déploiement des greffons, en fonction de la composition du liquide. Une composition riche en modifiant organique va entrainer une vaste surface de contact des chaines alkyles avec le

liquide, alors que l'ajout d'eau est responsable du repliement des greffons sur eux-mêmes, diminuant ainsi leur mobilité et les surfaces de contact : les greffons s'effondrent. Cependant, le caractère opposé des deux diffusions n'est pour l'instant pas explicable, tout comme l'évolution de la mobilité de la partie lente, lorsque le pourcentage d'eau augmente.

De plus, nous pouvons estimer, lors de la mesure de l'ADC, le pourcentage de chaque diffusion. Toutes les décroissances de la phase ont été traitées avec deux diffusions (Figure 20c). Il apparaît que, quel que soit la composition du solvant, le pourcentage de la composante rapide reste constant aux alentours de 80 %. Cette absence de variation s'explique par l'existence de deux types de greffons à la surface du support, dont la proportion ne varie pas en fonction des conditions expérimentales.

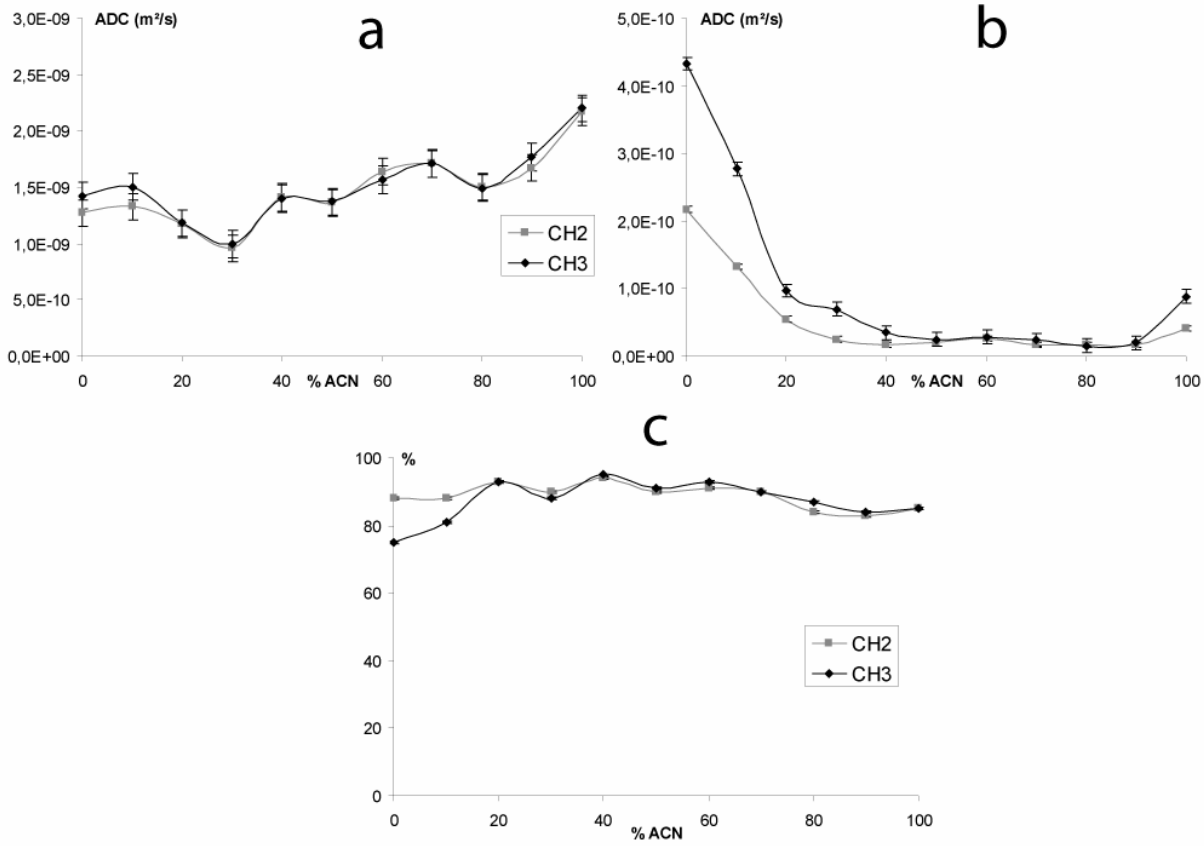

Figure 20 : ADC des chaines greffées en fonction de la teneur en modifiant organique. (a) partie la plus mobile, (b) faibles coefficients de diffusion et (c) représente le pourcentage de la composante rapide de l'ADC dans la décroissance.

3.1.4. Modifiant organique

Un vaste choix de modifiants organiques est offert au chromatographiste en RPLC, en fonction de la force éluante désirée. Classiquement, l'analyste utilise soit l'ACN, soit le méthanol (MeOH). L'organisation de la phase stationnaire n'est pas similaire pour des fractions volumiques identiques suivant le modifiant organique. L'ACN a été substitué par du

MeOH, pour comparer les mobilités des greffons, en fonction du modifiant organique et de sa proportion dans la phase liquide. La Figure 21 présente l'évolution des ADC en fonction de la composition de la phase liquide, avec l'alcool comme modifiant organique.

La diffusion rapide diminue avec l'augmentation d'eau en présence de MeOH, jusqu'à une composition d'environ 50 %. Dès que l'échantillon est composé d'eau pour plus de sa moitié, la mobilité des greffons n'évolue pas. Nous obtenons un profil global, ainsi qu'une échelle de diffusion semblables à ceux obtenus avec de l'ACN. A l'inverse, le comportement des chaines peu mobiles ne peut pas être comparé avec les résultats obtenus précédemment. En effet, jusqu'à une composition de 60 % en modifiant organique, la diffusion reste faible et constante, mais à 50 % une forte augmentation de la mobilité survient, pour diminuer très lentement et rester à un niveau élevé. Avec le MeOH, la variation est plus brusque que pour l'ACN, mais moins importante.

Le pourcentage de la composante rapide de l'ADC dans la régression des données (Figure 21c) présente un léger saut lorsque la phase mobile est composé pour moitié d'eau. Cependant, nous sommes toujours dans le même ordre de grandeur de pourcentage, supérieur à 75 %.

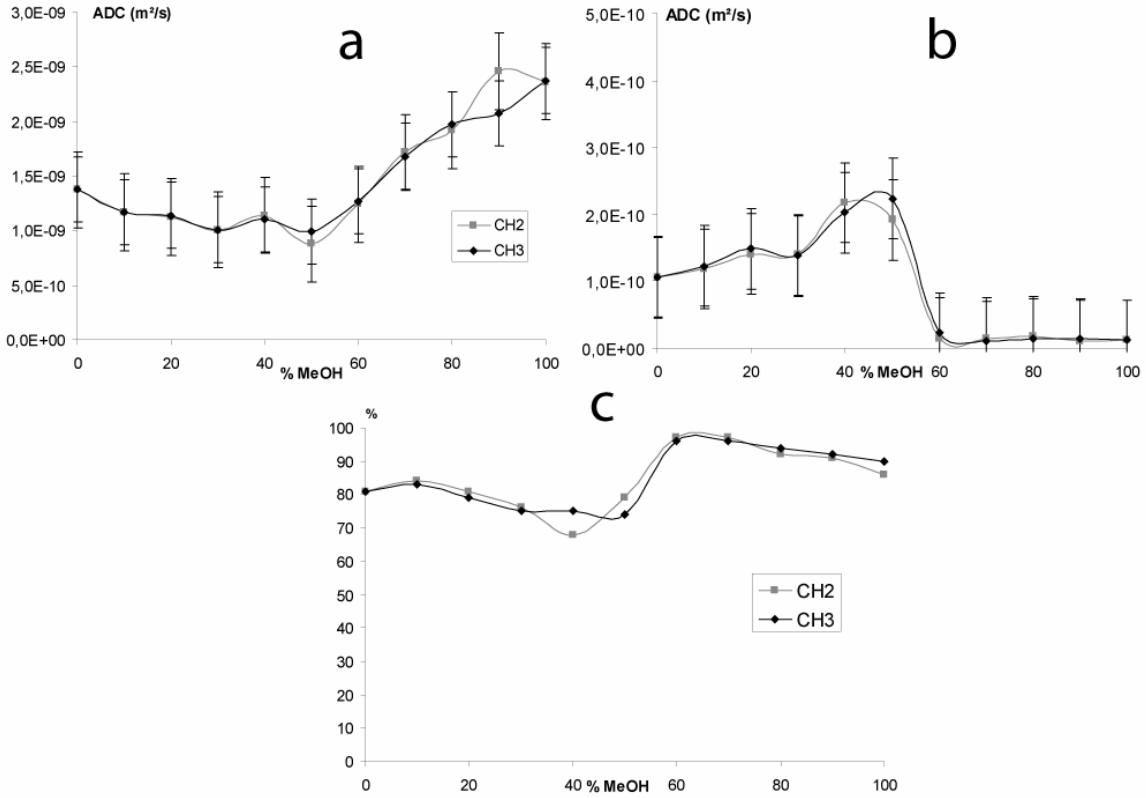

Figure 21 : ADC des chaines greffées en fonction de la teneur en MeOH. (a) partie la plus mobile, (b) faibles coefficients de diffusion et (c) représente le pourcentage de la composante rapide de l'ADC dans la décroissance.

La mobilité de la chaine alkyle greffée sur le support chromatographique peut donc être estimée en RMN PGSE. La décroissance résultant de l'expérience met en exergue un comportement multi-exponentiel et les meilleurs résultats sont obtenus en utilisant une relation avec deux coefficients de diffusion. Nous avons ainsi montré l'influence des isotopes sur l'organisation des greffons, bien qu'elle n'intervienne pas au niveau de l'ADC des solutés. L'enrichissement en eau de la phase liquide entraine des variations dans l'organisation de la phase et l'organisation des greffons varie selon le modifiant organique utilisé.

La mobilité des greffons est mise en évidence en RMN PGSE et il est donc possible d'investiguer leurs organisations en fonction de ces différents paramètres. Par contre, étant donnée la difficulté à se procurer des supports stationnaires (du fait de leur coût) et l'ampleur des travaux à entreprendre dans ce domaine, nous avons jugé plus pertinent de nous consacrer aux possibilités de séparation d'un mélange de solutés plutôt que de tenter de comparer les performances d'un large panel de supports.

3.2. Diffusion des solutés

L'ADC des solutés est un moyen d'estimer le gain de résolution obtenu dans la dimension de la diffusion, ainsi que la séparation des solutés réalisés par la RMN Chromatographique. Il s'agit d'une observation directe de l'effet de l'ajout de la phase stationnaire [131]. Nous nous sommes donc intéressés dans les paragraphes qui suivent à étudier l'influence des paramètres « chromatographiques ».

Les travaux présentés dans ce paragraphe ont été publié dans le journal *Analytical Chemistry* [149]. Les expériences ont été réalisées avec deux séries homologues (aromatiques et cétones) avec des phases liquides composées de mélange d'ACN et d'eau en différentes proportions. La superposition des pics de l'ACN (1,94 ppm) et du groupement méthyle des cétones (2,15 ppm), du à la présence de la phase chromatographique, ne permet pas l'utilisation de solvant protoné avec ces analytes (Figure 22). De plus, l'élargissement des pics RMN en présence de support diminue la résolution du spectre et rend impossible l'étude simultanée de l'ADC de toutes les cétones.

Ces séries homologues ont été choisies car, d'un point de vue chromatographique, leur comportement, en fonction des conditions expérimentales, est bien connu. De plus, en RMN, la série des aromatiques peut être étudiée en mélange, car la résolution des différents signaux est suffisante (plusieurs dizaines de hertz) et donc, la superposition des pics en présence de phase chromatographique est faible. Les déplacements chimiques des aromatiques se situent

dans une échelle différente de toutes les autres molécules présentent dans le mélange (solvants, greffons). Pour pouvoir mettre en évidence l'influence de l'hydrophobie des analytes, la seconde série homologue devait présenter une variation de motifs différente des groupements ajoutés. Dans cet objectif, le choix le plus judicieux a été la série des cétones, car ces molécules présentent un spectre RMN avec un nombre restreint de pic dont les déplacements chimiques varient sensiblement grâce à la présence de la fonction cétone.

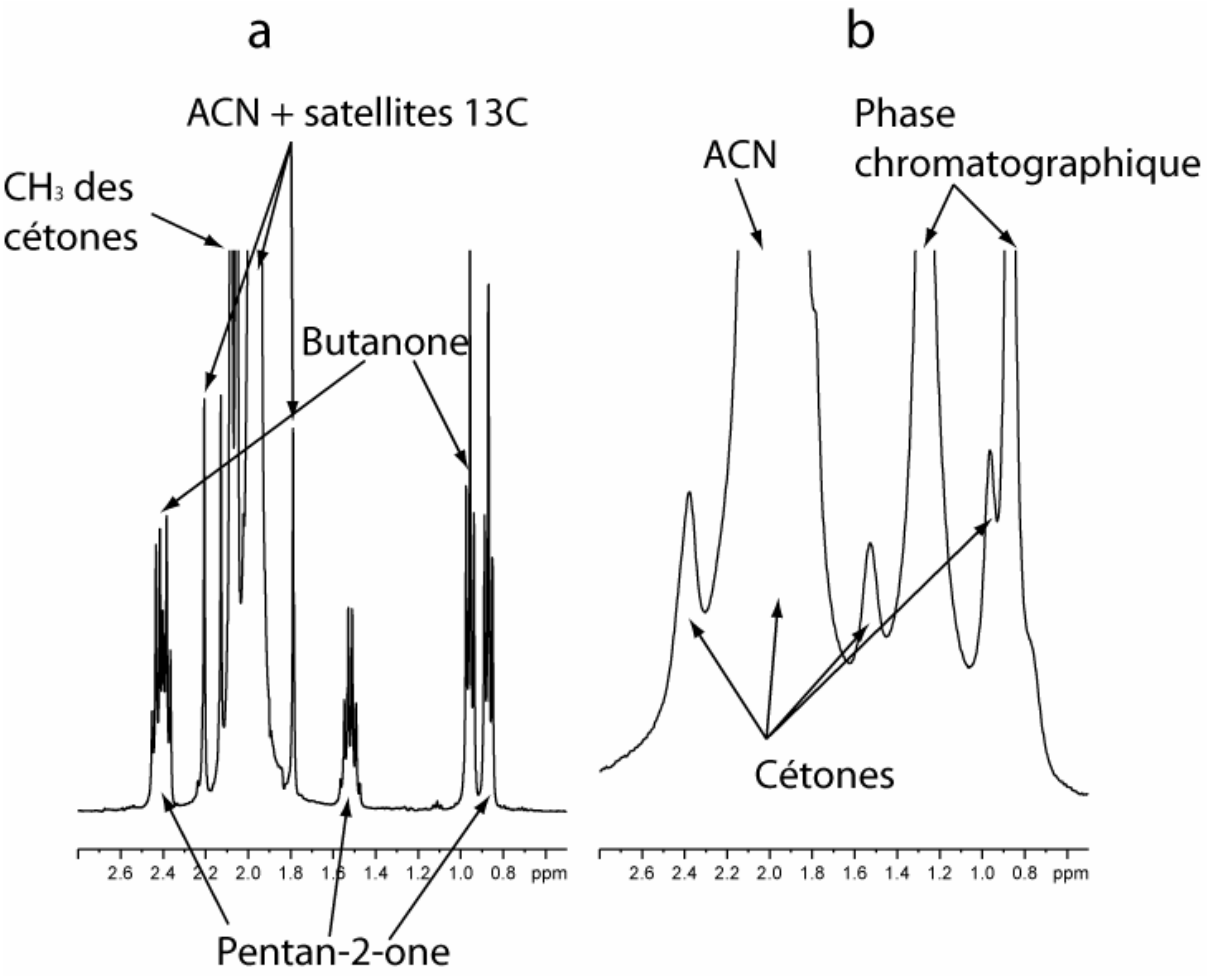

Figure 22 : Comparaison des spectres ^{1}H d'un mélange équivolumique des trois cétones dans de l'ACN (a) sans support et (b) en présence de phase chromatographique.

3.2.1. Influence de la phase stationnaire

L'influence de l'ajout d'une phase chromatographique sur l'amélioration de la résolution est indéniable en RMN PGSE. Les cartes DOSY ci-après (Figure 23 et Figure 24) montrent les résultats obtenus pour la série homologue des aromatiques, avec deux compositions de phase liquide différentes.

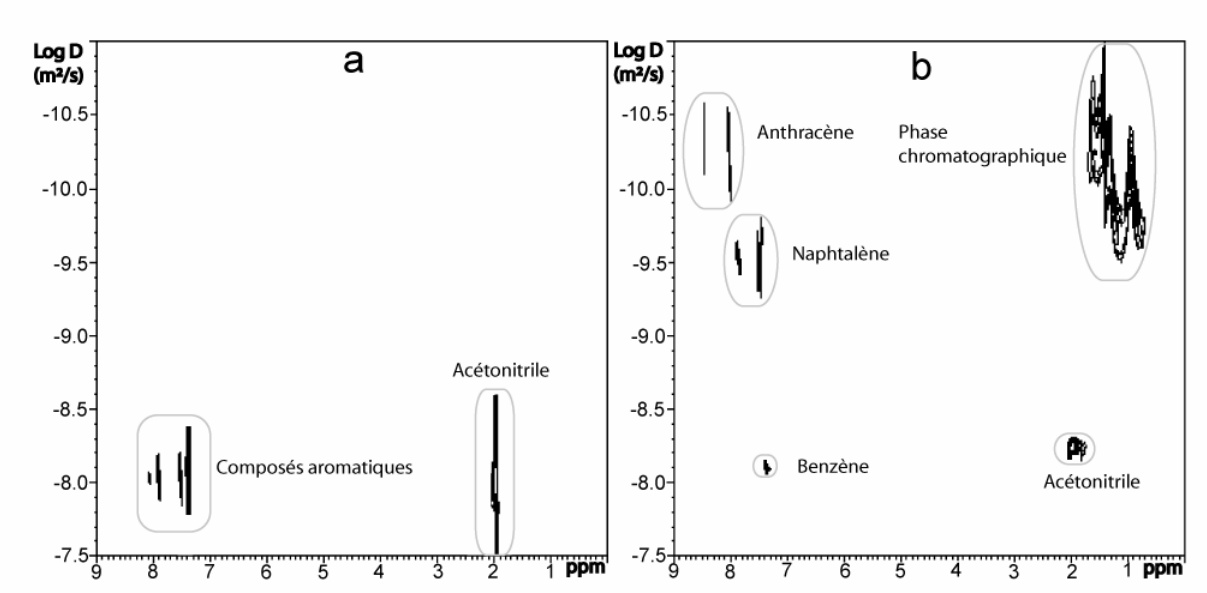

Figure 23 : Carte 2D ^{1}H DOSY pour la série aromatique dissoute dans l'ACN. (a) en absence de phase stationnaire et (b) en présence du support ODS poreux.

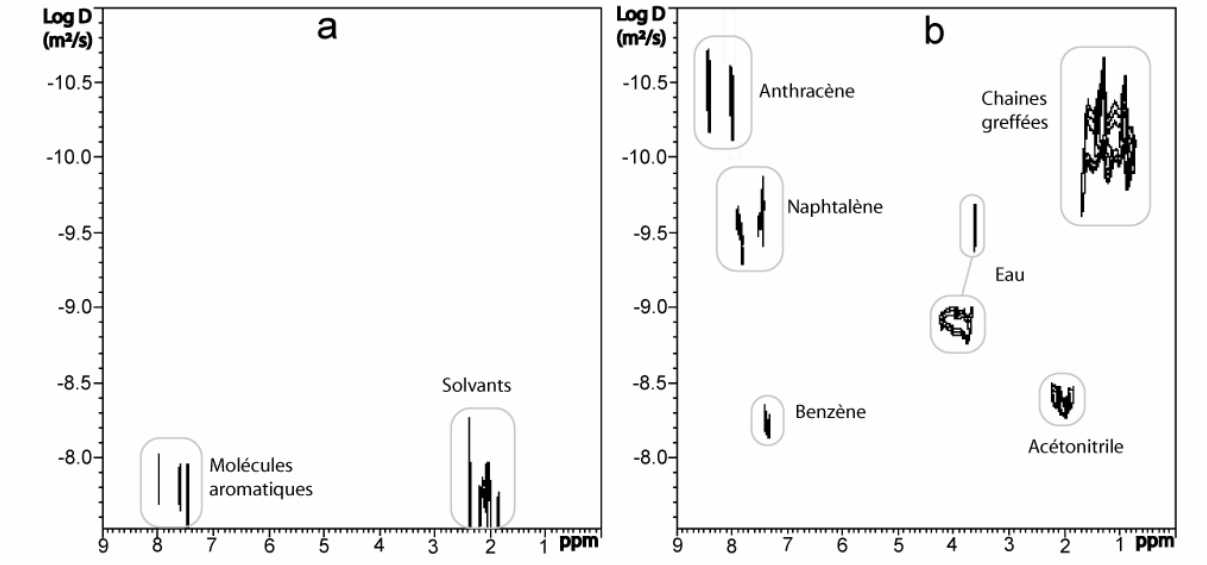

Figure 24 : Carte 2D ^{1}H DOSY pour la série aromatique dans un mélange de solvants composé de 80/20, ACN/eau, v/v. (a) en absence de phase stationnaire et (b) en présence du support ODS poreux.

Le benzène est le composé le plus rapide tandis que le naphtalène présente plus d'interactions avec le support. L'anthracène reste fortement fixé sur la phase, avec une mobilité voisine de celle des greffons. L'ACN est relativement mobile et la mesure de deux ADC pour l'eau indique deux comportements. Le premier ADC ($2{,}3.10^{-9}$ $m^2.s^{-1}$) est voisin de celui de l'eau libre, c'est-à-dire de l'eau non retenue par le support, alors que la seconde diffusion est environ sept fois plus lente ($3{,}1.10^{-10}$ $m^2.s^{-1}$) et correspond à l'eau piégée par les greffons. Ces deux populations d'eau sur une phase greffée avaient été observées préalablement en RMN

par Lindon et collaborateurs [114]. Ces résultats sont en accord avec les théories développées en RPLC qui décrivent un déploiement des greffons en présence d'eau et une solvatation des chaines alkyles par une partie de la phase aqueuse du solvant.

Pour la série homologue des cétones, les mesures de diffusion sont réalisées avec un seul soluté dans le rotor et les cartes DOSY sont superposées après le traitement des données. Dans l'exemple présenté ci-après (Figure 25), nous avons utilisé l'ACN deutérié comme solvant.

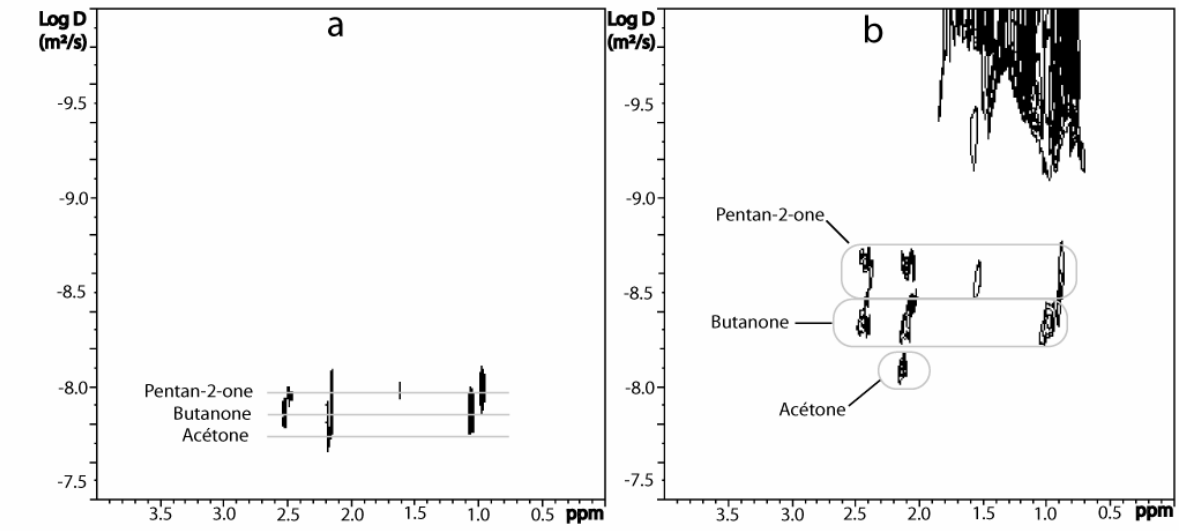

Figure 25 : Carte 2D ^{1}H DOSY des cétones dans de l'ACN-d3 (a) en absence de support et (b) avec la phase stationnaire ODS. Chaque cétone est étudiée séparément puis les cartes 2D sont superposées.

Dans ce nouvel exemple, la séparation par les ADC en présence de support poreux est possible, tandis qu'en absence de celui-ci la résolution n'est pas suffisante dans la dimension de la diffusion. Cependant, les résultats sont beaucoup moins spectaculaires qu'avec les solutés aromatiques, les écarts entre les coefficients de diffusion étant plus faibles.

Dans la série homologue des cétones, les solutés varient par le nombre de groupements méthyles, tandis que pour la série des aromatiques, c'est le nombre de cycle qui est incrémenté. Le caractère hydrophobe d'un méthyle est plus faible que celui d'un cycle aromatique. Ces résultats sont en accord avec la RPLC où de meilleures résolution et sélectivité sont obtenues pour les solutés aromatiques que pour la série homologue des cétones à de même composition de phase liquide.

3.2.2. Variation de la composition de la phase liquide

Nous avons fait varier la fraction volumique du modifiant organique au sein du mélange hydro-organique pour la série homologue des composés aromatiques et celle des cétones respectivement de 100 % à 75 % et de 100 % à 60 %. Ces gammes de composition sont différentes à cause des limites de solubilité de la série aromatique et du fait qu'en RPLC, pour la série des cétones, un pourcentage d'eau plus important est nécessaire pour obtenir une séparation.

La Figure 26 représente les résultats obtenus pour les deux séries homologues, étudiées en absence de phase chromatographique.

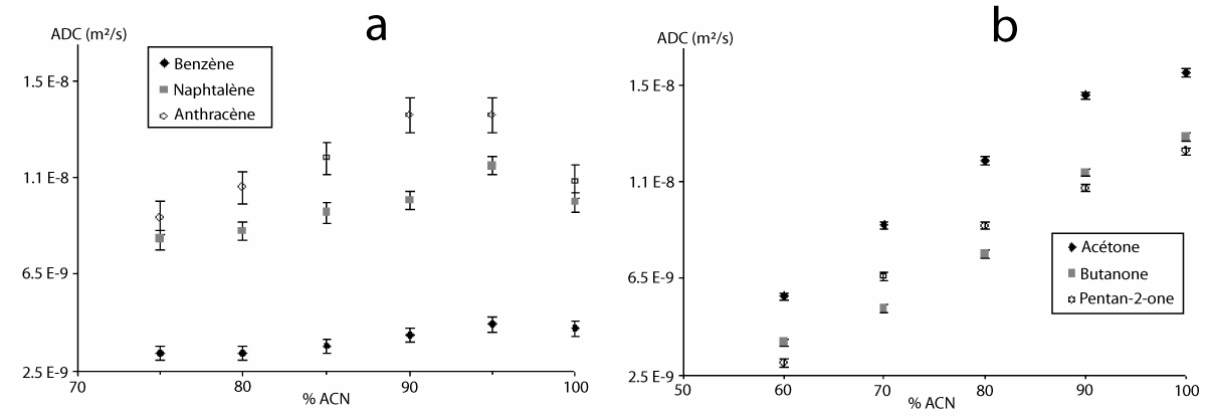

Figure 26 : Variation de l'ADC des solutés en fonction de la composition de la phase liquide, en absence de phase chromatographique. (a) avec la série des aromatique et (b) avec celle des cétones.

L'évolution est identique pour tous les solutés. Lorsque le pourcentage d'eau augmente, la diffusion diminue. Pour un même soluté et dans la gamme de composition choisie, l'ADC varie d'un facteur d'environ 1,5 pour les composés cycliques, de 2,6 pour l'acétone et aux alentours de 3,5 pour les deux autres cétones. Cette constatation est en accord avec l'équation (4) de Stokes-Einstein. L'ajout d'eau augmente la viscosité de la solution et donc, en considérant le rayon hydrodynamique constant, la diffusion du soluté diminue.

En présence de phase chromatographique (Figure 27), les ADC, et donc la mobilité des solutés, augmente lorsque le pourcentage d'eau augmente. L'évolution est inversée par rapport à celle observée en absence de support. La discrimination importante des ADC avec la série homologue aromatique contraint à représenter les résultats à l'aide d'une échelle double : une pour le benzène, composé le plus rapide et l'autre pour le naphtalène et l'anthracène. Alors que les ADC du benzène et du naphtalène augmentent, l'ADC de l'anthracène, soluté le moins mobile, présente une très faible variation. L'influence de la proportion en eau semble donc diminuer, lorsque soit le nombre de cycles, soit l'hydrophobie

des analytes augmentent. Nous remarquons également le comportement différent des ADC avec de l'ACN pur en utilisant la série des cétones. Pour cette composition de la phase liquide, ce point possède une diffusion élevée qui diminue pour ré-augmenter par la suite.

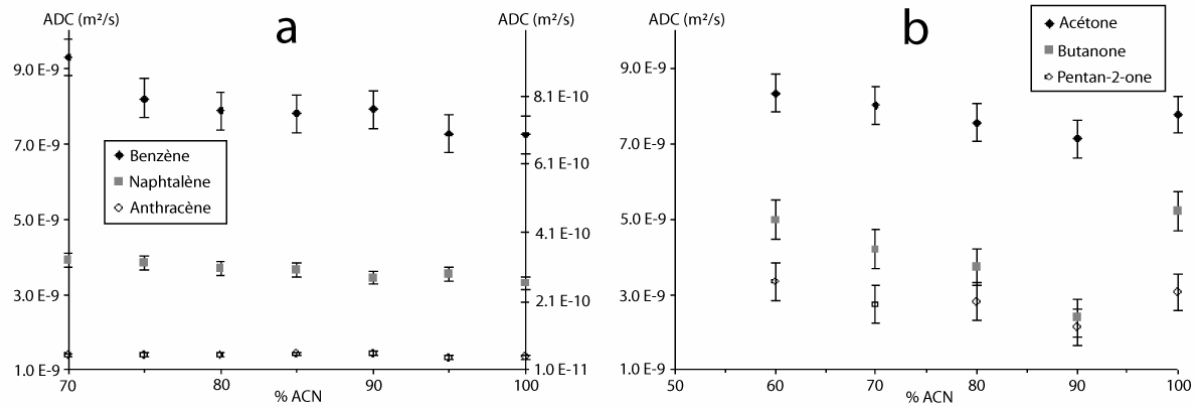

Figure 27 : Evolution des ADC en fonction de la composition du solvant en présence de la phase ODS poreuse (a) avec la série aromatique et (b) avec les cétones. Pour les composés cycliques, l'échelle de gauche se reporte au benzène et celle de droite aux deux autres solutés aromatiques.

L'ajout de la phase stationnaire à la phase liquide entraine la formation de différentes zones avec des mobilités spécifiques. Les analytes utilisés permettent de « sonder » ces différents environnements, en fonction de leur accessibilité. Ainsi, l'ajout d'eau déploie les greffons (ce qui est confirmé par le caractère biexponentiel de ce solvant) avec dans le même temps, un nouvel environnement liquide. L'ADC de l'ACN diminue également lorsque l'eau est ajoutée, montrant ainsi l'augmentation des interactions de la phase liquide avec la silice. Les solutés vont peupler les différentes couches à la surface du support en fonction de leurs affinités relatives et de leurs tailles. Une estimation de la limite supérieure de la mobilité de ces couches est accessible à partir de l'ADC de la partie mobile des greffons.

Il est également possible que la présence d'une phase stationnaire modifie complètement la diffusion en terme de phénomène physique. D'après les données en RPLC de la littérature [150], seule la diffusion intraparticulaire, qui est une diffusion combinant la diffusion dans le pore et la diffusion à la surface de la couche adsorbée, se caractérise par une même variation des mobilités, lorsque la phase mobile est modifiée. Nous devons donc envisager la possibilité d'observer principalement ce type de diffusion.

Nous avons présenté les résultats obtenus en termes d'ADC sous la forme d'une représentation assimilable à un profil d'élution en chromatographie. La rétention chromatographique d'un soluté dépend majoritairement de son affinité pour le support

stationnaire. Ainsi, un soluté très peu retenu apparaît en début de chromatogramme, alors qu'un soluté fortement retenu, apparaît plus loin. En RMN Chromatographique, la variation de l'ADC est fortement liée à l'affinité des solutés pour le support. En effet, plus celle-ci augmente, plus l'ADC diminue. Pour représenter les solutés fortement retenus sur le support à la droite du graphique et ceux ayant peu d'affinité sur la gauche, il faut représenter l'inverse de l'ADC sur l'axe des abscisses.

N.B. : la hauteur des barres sur les « chromatogrammes RMN » n'est représentative d'aucune grandeur (Figure 28).

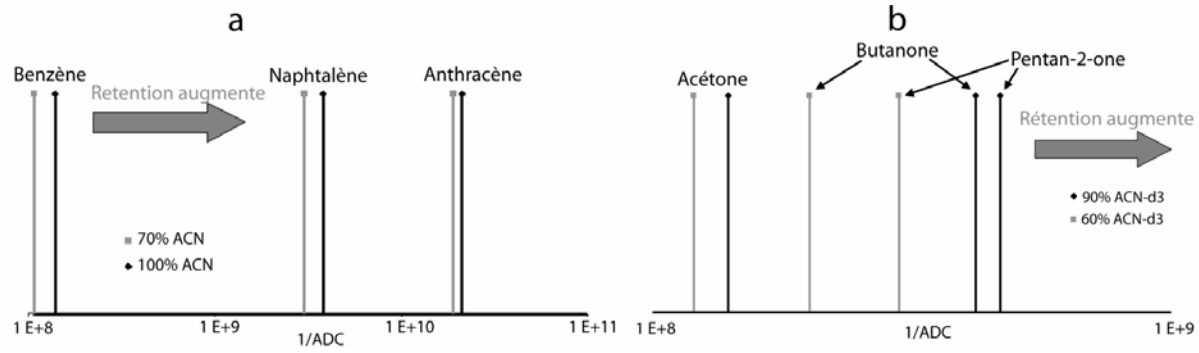

Figure 28 : « Chromatogramme RMN » à deux compositions différentes de solvant avec une phase stationnaire ODS poreuse pour (a) la série homologue aromatique et (b) la série des cétones. L'axe des abscisses est en échelle logarithmique, l'axe vertical a été fixé au même niveau pour tous les solutés.

Cette représentation permet de souligner de nombreux points. Tout d'abord, il est intéressant de mettre en exergue la différence dans les échelles des abscisses. Pour les solutés cycliques, l'échelle s'étend de 10^8 à 10^{11} $s.m^{-2}$, tandis que pour la série des cétones, l'échelle ne porte que sur un ordre de grandeur. La séparation des cétones est de moins bonne qualité que celle des aromatiques. La différence d'hydrophobie entre deux homologues est moins importante pour la série des cétones, que pour celle des aromatiques. Le Tableau 6 résume les résultats obtenus en RPLC, pour la série homologue des aromatiques.

L'ordre de rétention obtenu en RMN Chromatographique est identique à celui obtenu en chromatographie liquide dans les mêmes conditions de support et de phase liquide. Les solutés les moins hydrophobes (benzène pour une série et acétone pour l'autre) sont élués en premier, tandis que les molécules les plus hydrophobes sont fortement retenues (anthracène et pentan-2-one). L'affinité des molécules par le support est donc comparable au phénomène global enregistré sur un chromatogramme en RPLC : la rétention augmente avec l'hydrophobie de l'analyte.

En comparant les résultats obtenus pour deux pourcentages d'eau dans la phase liquide, nous remarquons que la « sélectivité », la différence de rétention, entre les solutés par RMN augmente avec le pourcentage d'eau, comme en RPLC (Tableau 6). En revanche, l'influence de l'eau est plus importante en RMN pour l'analyte possédant le plus faible caractère hydrophobe et cette influence diminue avec l'hydrophobie des solutés. Ce comportement est à l'opposé de la CLHP pour laquelle, l'influence de l'eau va augmenter avec l'hydrophobie de l'analyte. Enfin, l'ajout d'eau accélère le « chromatogramme RMN » tandis qu'en CLHP, lorsque la teneur en eau augmente, la rétention des analytes devient plus importante. Le fait de n'observer que localement le phénomène dans des conditions d'absence de débit est probablement la cause de cette différence de comportement, lorsque la composition de la phase mobile est modifiée. Le processus RMN ne permettrait donc de n'étudier qu'une partie des interactions mise en jeu en CLHP.

	% ACN	Benzène	Naphtalène	Anthracène	Inerte
Temps de	100	2,66	2,92	3,48	S.O.
rétention (min)	75	5,17	7,50	13,46	1,80

Tableau 6 : Temps de rétention des solutés de la série homologue aromatique. L'inerte utilisé est une solution de nitrate de potassium à 10^{-3} mol.L^{-1} dans l'eau. S.O. = Sans Objet.

Une exception peut être notée. En effet, l'ajout d'eau n'a que peu d'influence sur l'ADC de l'acétone. Cette molécule est utilisée en CLHP comme un inerte, c'est-à-dire une molécule non retenue par le support. Le temps de rétention de tels solutés varie faiblement lorsque la composition de l'éluant est modifiée. En RMN, cet analyte est peu retenu par le support et la variation des conditions n'a que peu d'influence sur son ADC.

3.2.3. Influence de la température : une énergie d'activation ?

Un des paramètres à réguler lors de la mesure de diffusion est la température de l'échantillon, car l'ADC dépend de cette grandeur, comme décrit dans l'équation (4). Toutes les expériences précédentes ont été réalisées à une température fixée à 303°K, température minimale pouvant être régulée au niveau de l'instrumentation.

En RMN Chromatographique et plus généralement lors de mesures de la diffusion, la variation de la mobilité des molécules dans le liquide est associée au changement de densité avec la température. (Cf. équation (4)). Une augmentation de la température de l'échantillon induit une augmentation de l'ADC, la densité de l'échantillon diminuant. Si le processus de

diffusion observé répond à une loi d'Arrhénius alors, l'énergie d'activation E de ce processus peut être calculée à partir de la variation de l'ADC en fonction de l'inverse de la température :

$$D = D_0 \exp\left(\frac{-E}{RT}\right) \tag{74}$$

où D_0 est le facteur de fréquence, R la constante des gaz parfait, T la température et E l'énergie d'activation. Cette équation (74) s'exprime sous forme logarithmique :

$$\ln D = \ln D_0 - \frac{E}{RT} \tag{75}$$

La loi d'Arrhénius décrit alors la variation de $\ln D$ en fonction de $\frac{1}{T}$ comme une droite. La pente de cette droite permet de calculer l'énergie d'activation, alors que son ordonnée à l'origine représente la valeur du facteur de fréquence.

Dans le cadre de la séparation des deux séries homologues, nous avons étudié la variation du logarithme de l'ADC en fonction de l'inverse de la température, et ce pour une gamme de températures variant de 303 à 333°K. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de graphes (Figure 29 et Figure 30).

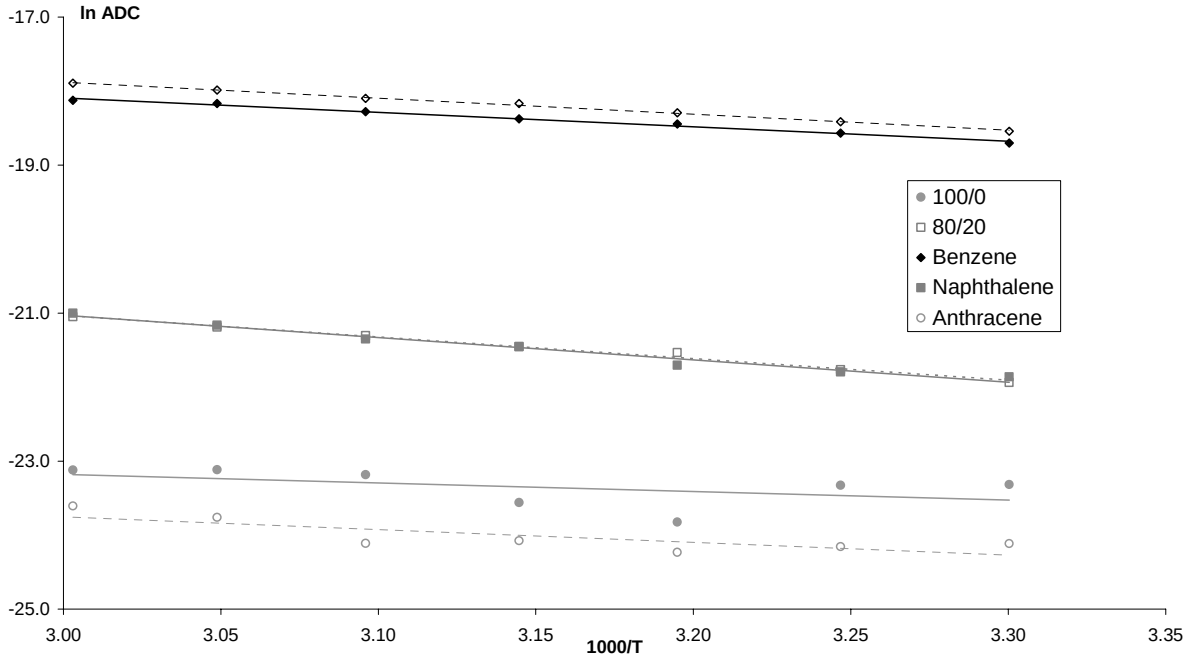

Figure 29 : Variation du logarithme de l'ADC en fonction de l'inverse de la température pour les analytes de la série homologue aromatiques en présence de phase chromatographique ODS avec des compositions de 100/0 et 80/20, ACN/Eau, v/v.

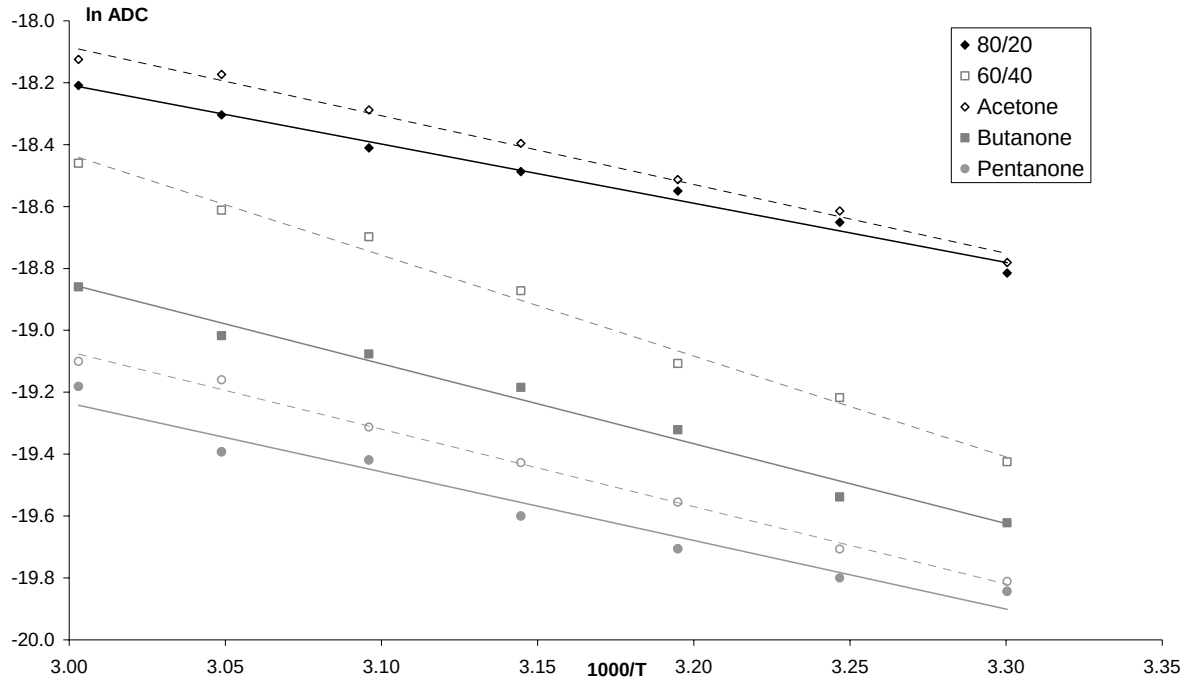

Figure 30 : Variation du logarithme de l'ADC en fonction de l'inverse de la température pour les analytes de la série homologue des cétones avec des compositions de 80/20 et 60/40, ACN-d3/D_2O, v/v. Expériences réalisées avec la phase ODS de diamètre moyen de pores de 100 Å

La linéarité observée au niveau de la variation du logarithme de l'ADC en fonction de l'inverse de la température présente un coefficient de corrélation supérieur ou égal 0,98 (Tableau 7 et Tableau 8) pour tous les solutés, à l'exception de l'anthracène. Pour cette molécule, les régressions linéaires présentent un faible coefficient de corrélation, ce qui peut s'expliquer par une qualité de la décroissance du signal faible, car nous nous situons à la frontière des possibilités technologiques du spectromètre. Il est également possible que le processus diffusif de cette molécule, fortement retenue, soit plus complexe. Les solutés présentant un bon alignement des points ont un processus diffusif simple, répondant alors à l'équation d'Arrhénius, tandis que l'anthracène présente une diffusion complexe qui ne peut être estimée à partir d'une relation simple d'Arrhénius. La mesure de l'énergie d'activation (Tableau 9) pour cet analyte est entachée d'une forte erreur.

ACN/Eau	100/0			80/20		
	Benzène	Naphtalène	Anthracène	Benzène	Naphtalène	Anthracène
Pente	-1,949	-3,015	-1,156	-2,164	-2,919	-1,725
Ord. origine	-12,247	-11,986	-19,712	-11,389	-12,273	-18,578
Coeff. corrélation	-0,9954	-0,9874	-0,4757	-0,9983	-0,9948	-0,7970

Tableau 7 : Résumé des différentes grandeurs mesurées à partir des droites de régression du graphe $\ln ADC = f\left(\frac{1000}{T}\right)$ pour la série homologue aromatique avec deux compositions de phase liquide.

ACN-d3/D_2O	80/20			60/40		
	Acétone	Butanone	Pentan-2-one	Acétone	Butanone	Pentan-2-one
Pente	-1,914	-2,580	-2,217	-2,223	-3,259	-2,504
Ord. origine	-12,465	-11,109	-12,584	-11,416	-8,656	-11,558
Coeff. corrélation	-0,9936	-0,9920	-0,9799	-0,9958	-0,9959	-0,9976

Tableau 8 : Résumé des différentes grandeurs mesurées à partir des droites de régression du graphe $\ln ADC = f\left(\frac{1000}{T}\right)$ pour la série homologue des cétones avec deux compositions de phase liquide.

Les énergies d'activation ont été estimées à partir des droites de régression représentées sur les Figure 29 et Figure 30. Le Tableau 9 regroupe les résultats obtenus pour les deux séries homologues, aux différentes compositions de la phase liquide. Pour le benzène, ainsi que pour les cétones, l'énergie d'activation augmente, lorsque la phase liquide est enrichie en eau. Pour ces solutés qui présentent peu d'interactions avec le support, cette augmentation s'explique par un pourcentage de la diffusion dans la phase liquide plus important et une énergie pour s'adsorber à la surface du support plus élevée. En effet, l'ADC en absence de support diminue, lorsque le pourcentage d'eau augmente (Figure 26), tandis qu'en présence de phase chromatographique, il augmente (Figure 27). Comme les énergies d'activation augmentent avec le pourcentage d'eau, nous en déduisons que la molécule reste préférentiellement dans une des phases. Comme les évolutions avec le pourcentage d'eau sont inverses en présence et en absence de support, la diffusion des solutés hydrophobes se dérouleraient principalement à proximité des greffons pour limiter les contacts avec la partie hydrophile de la phase liquide.

ACN/Eau	100/0	80/20
Benzène	16,2	18,0
Naphtalène	25,1	24,3
Anthracène	9,6	14,3

ACN-d3/D_2O	80/20	60/40
Acétone	15,9	18,5
Butanone	21,4	27,1
Pentan-2-one	18,4	20,8

Tableau 9 : Energies d'activation (kJ.mol^{-1}) pour les solutés aux deux différentes compositions étudiées.

3.2.4. Nature du déplacement des solutés

A partir de l'ADC des solutés, nous pouvons calculer la distance parcourue d par la molécule, durant le temps de diffusion Δ grâce à l'équation ci-dessous :

$$d = \sqrt{2D\Delta} \quad (76)$$

Le chiffre 2 est du à la présence d'un seul degré de liberté, car les gradients ne sont appliqués que dans une seule direction. Dans le cas des expériences que nous avons menées en présence d'un matériau restreignant la diffusion, deux cas peuvent se produire lorsque nous étudions le déplacement moyen en fonction du temps de diffusion. Tout d'abord, l'augmentation de la distance parcourue peut être constante quelle que soit la valeur de Δ. La diffusion du soluté n'est pas restreinte par le support ; plus du temps est laissé à la molécule pour diffuser, plus la distance parcourue est importante. A l'inverse, si la diffusion est restreinte, alors le déplacement va être, à partir d'une certaine valeur du temps de diffusion, restreint.

Dans le cas de matériaux poreux, les solutés peuvent se déplacer à l'intérieur ou à l'extérieur du pore, la distance parcourue par les solutés à l'intérieur du pore étant plus limitée. En traitant les données comme si nous avions deux ADC dans la décroissance des solutés, nous devrions observer un déplacement moyen des solutés qui converge si la diffusion est réalisée, en partie, à l'intérieur du pore. En effet, si le temps de diffusion est suffisant alors, les molécules se déplacerons à l'intérieur, mais également à l'extérieur du pore et le déplacement moyen deviendra alors identique.

Cette hypothèse a été investiguée avec la série homologue des aromatiques, dans de l'ACN, en présence de phase greffée poreuse. Comme pour mesurer la diffusion de l'anthracène, nous sommes limités par les capacités du spectromètre, il s'est avéré impossible d'augmenter le temps de diffusion significativement ; le déplacement de ce soluté n'a donc pas pu être étudié. Les résultats sont présentés sur la Figure 31.

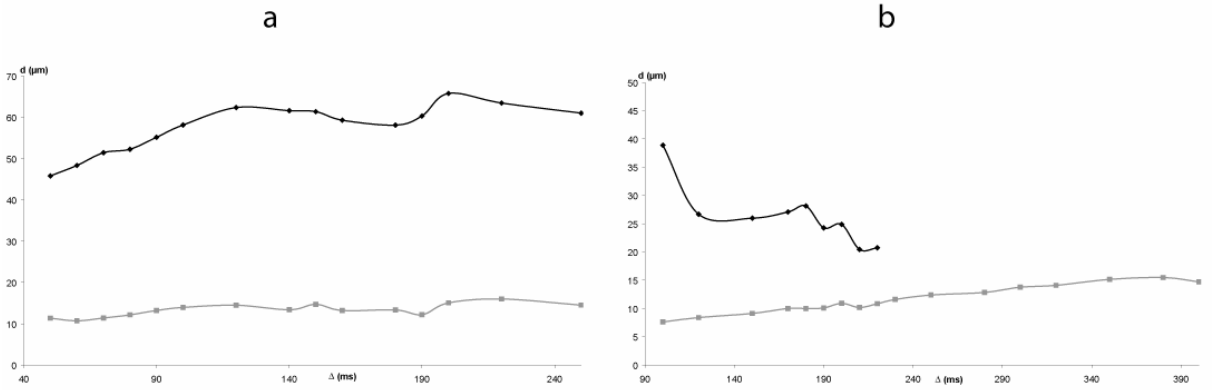

Figure 31 : Distance parcourue par les solutés en fonction du temps de diffusion lorsque le solvant est de l'ACN en présence de la phase greffée poreuse. (a) benzène et (b) naphtalène.

Les résultats obtenus pour le benzène montrent une diffusion rapide, qui augmente lorsque le temps de diffusion augmente et un faible déplacement qui ne varie pas significativement. Ce soluté semble donc se déplacer principalement à l'extérieur des pores et présenter une diffusion faiblement restreinte par le support. A l'inverse, pour le naphtalène, nous observons le cas décrit ci-avant pour une diffusion restreinte par le support : le déplacement le plus important diminue avec l'augmentation du temps de diffusion, tandis que le déplacement faible augmente, mettant ainsi en évidence un déplacement important du naphtalène dans les pores. A partir d'un temps de diffusion de 230 ms, le traitement des données avec deux ADC conduit à des résultats aberrants. Cette interprétation est confirmée grâce à l'utilisation d'un support ODS non poreux (Figure 32). Le traitement des données peut être exploité uniquement, en considérant la présence d'un seul ADC pour chaque soluté. Le déplacement des analytes augmente à la fois pour le benzène et pour le naphtalène, caractérisant un déplacement dans l'espace extraparticulaire.

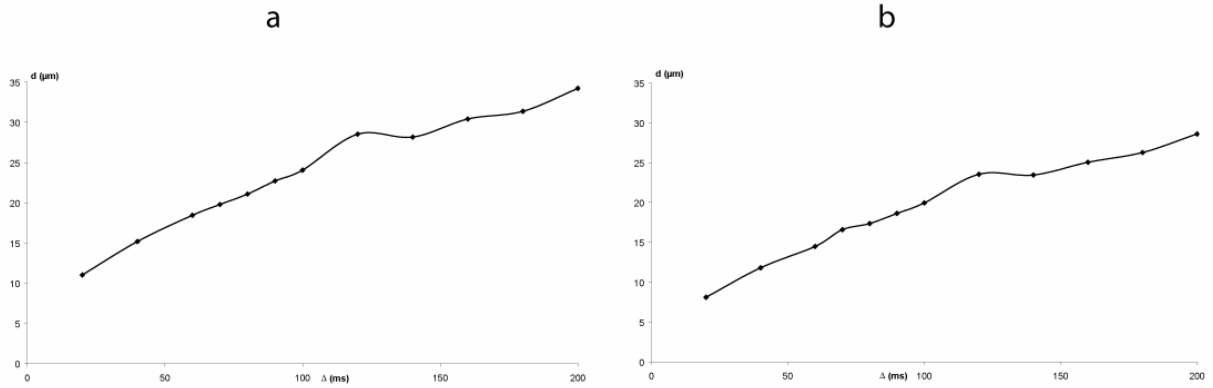

Figure 32 : Distance parcourue par les solutés en fonction du temps de diffusion lorsque le la phase liquide est un mélange ACN/eau, 90/10, v/v et la phase non poreuse et greffée. (a) benzène et (b) naphtalène.

La diffusion du benzène n'est pas restreinte par le support, les interactions entre cette molécule et le support sont faibles. Les interactions plus importantes entre le naphtalène et la phase chromatographique permettent de distinguer la diffusion restreinte par le solide, de celle qui ne l'est pas. Ces résultats sont surprenants si nous considérons la taille de ces deux composés. En effet, le plus important par sa taille, le naphtalène en l'occurrence, devrait subir plutôt le phénomène d'exclusion du pore que le benzène moins encombrant.

3.3. Conclusion

La variation de l'ADC des solutés de deux séries homologues en fonction de la composition du solvant a permis de mettre en évidence des similarités, au niveau de l'ordre de rétention, mais également des différences, au niveau de l'influence de la quantité d'eau dans le solvant, avec la CLHP. Ces premiers résultats, très prometteurs, ont montré le pouvoir séparatif de la méthode sur les différentes molécules testées. De plus, à partir de l'influence de deux facteurs, la température et le temps de diffusion, nous avons pu émettre des hypothèses concernant les différences dans les rétentions des solutés aromatiques. La généralisation de la technique à des molécules relativement simple est donc envisageable. L'étude d'un panel plus important d'analytes permettrait une meilleure compréhension des interactions responsables de la discrimination créée par le support stationnaire. Cependant, il existe peu de séries de solutés dont les déplacements chimiques sont résolus en RMN Chromatographique. Un protocole identique à celui utilisé pour les cétones, impliquant l'étude des analytes un par un pourrait être mis en œuvre, notamment avec les séries homologues des alkyl-benzènes. La quantité abondante d'informations disponible dans la littérature sur leur diffusion en chromatographie permettrait d'envisager une comparaison des performances des deux techniques.

Il est également intéressant de mettre en évidence l'influence des propriétés physico-chimiques de la phase dans le processus séparatif. Dans cet objectif, nous avons étudié, en utilisant la série aromatique, la variation de l'ADC suivant les types de supports employés.

4. Influence des propriétés du support stationnaire

En CLHP, une large gamme de phases stationnaires commerciales est disponible. Les différences entre les supports concernent aussi bien les propriétés physiques de la silice (diamètres moyens des pores et des particules de silices, surface spécifique…), que la

structure du support fonctionnalisé (mono-, di- ou trimèriques), ainsi que la nature du greffon (ODS, cyano, amino, post-greffé…).

La comparaison des ADC des solutés sur des supports présentant des caractéristiques physiques différentes peut être exploitée pour mettre en évidence le rôle de la phase et décrire les interactions spécifiques à l'origine de la séparation observée par RMN Chromatographique. La difficulté de cette étude réside dans l'accès à des phases stationnaires « en vrac ». Notre étude s'est donc limitée aux supports disponibles au laboratoire ou gracieusement fournis et dont les caractéristiques chromatographiques connues sont regroupées dans le Tableau 3.

4.1. Comparaison des silices vierge et greffée

L'utilisation d'une silice greffée et d'une silice vierge a permis de mener une première étude pour mettre en évidence l'influence des propriétés du support et plus précisément celle du greffon. Nous disposons de la même silice poreuse vierge ou greffée (Lichrospher®100 5 µm), seule la surface spécifique varie, respectivement 400 et 350 $m^2.g^{-1}$, à cause du greffage.

4.1.1. En RMN Chromatographique

La diffusion des solutés aromatiques est mesurée avec un mélange composé d'ACN et d'eau en proportions variables. La Figure 33 représente les cartes DOSY obtenues avec des supports greffé ODS et vierge. Il apparaît que quelle que soit la phase chromatographique utilisée, l'ADC est sensiblement le même. Un déplacement légèrement plus rapide est observé sur la silice. Aucune différence n'est constatée entre les deux supports poreux. Les résultats obtenus avec la silice vierge sont surprenants, car le solvant est en compétition avec les solutés pour s'adsorber à la surface du support. Il semblerait donc que, dans le phénomène étudié, le greffage du support n'a que peu d'influence sur la séparation des solutés par leur ADC.

La surface spécifique des deux supports utilisés pour obtenir les cartes DOSY représentées en Figure 33 est voisine. Malgré le greffage de la silice, il reste des silanols à la surface du support, qui pourraient être à l'origine de la similitude des séparations obtenues en RMN. L'utilisation d'une phase dont les silanols résiduels ont été post-greffés par des groupements triméthylsilanes peut confirmer ou infirmer cette hypothèse. Les ADC ont donc été mesurés en utilisant une phase ODS post-greffée (Figure 34).

Les résultats qualitatifs sont identiques avec les trois types de support employés. La diffusion sur le support post-greffé est proche de celle mesurée sur la silice. La séparation n'est donc pas due à des interactions entre les analytes et les silanols. Nous pouvons également affirmer

que la discrimination de ces solutés n'est pas causée par le greffage du support, car des ADC très proches sont mesurés avec des phases vierges ou des supports post-greffés.

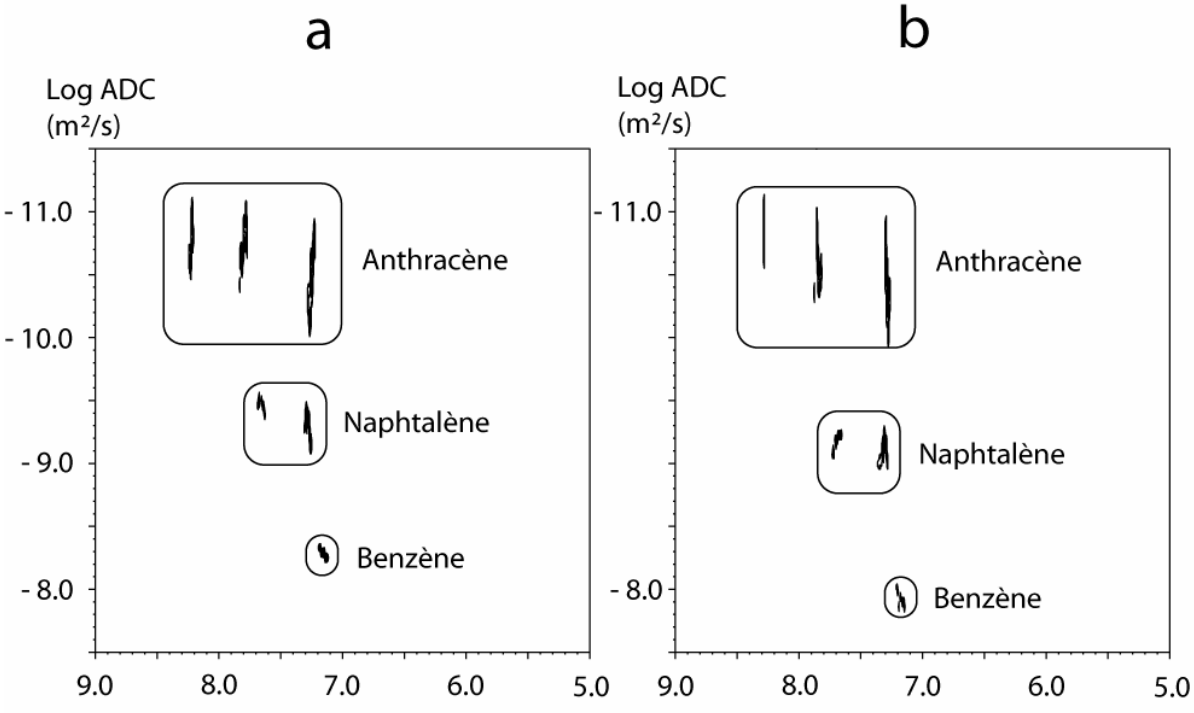

Figure 33 : Carte 1H DOSY de la série homologue des aromatiques pour une phase liquide composée d'ACN/Eau, 90/10, v/v en présence de (a) phase greffée ODS et (b) de phase vierge.

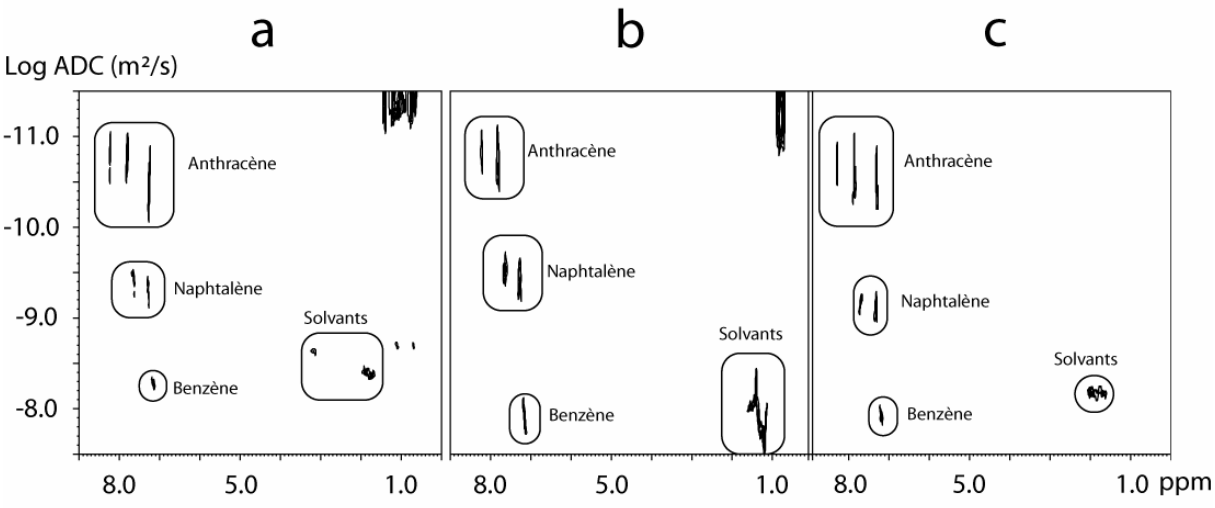

Figure 34 : Carte 1H DOSY de la série homologue des aromatiques avec une phase liquide composée d'ACN/Eau, 90/10, v/v en présence de (a) phase ODS, (b) phase ODS post-greffée et (b) phase vierge.

Nous pouvons également suivre l'évolution des ADC en fonction du greffage et ce, pour deux diamètres moyens des pores, à deux compositions de solvants (Figure 35). Sur les supports

greffés, l'ADC de l'eau n'a pas été présenté, à cause du caractère biexponentiel de la décroissance (paragraphe 3.2.1).

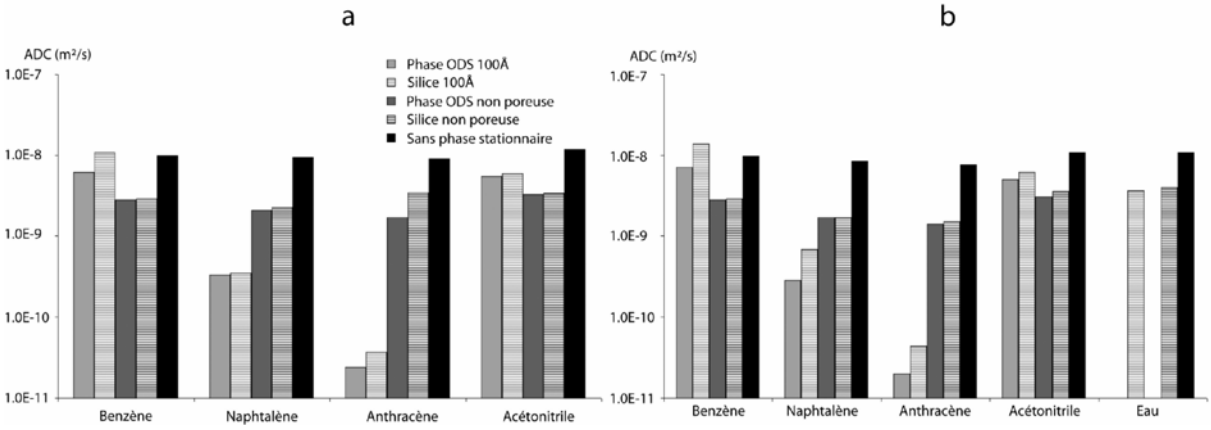

Figure 35 : Comparaison des ADC sur les supports non poreux et de diamètre moyen de pores de100Å (a) lorsque l'ACN est le solvant et (b) pour une phase liquide constituée d'ACN/Eau, 90/10, v/v.

L'addition d'eau, qui rentre en compétition avec les solutés pour s'adsorber sur la silice, accélère la diffusion moyenne des solutés aromatiques sur le support non greffé. Sur la phase ODS, l'ADC des solutés aromatiques diminue lorsque l'hydrophobie des analytes augmente, alors que pour le support vierge, cette variation dépend du nombre de cycles aromatiques. Sur la silice poreuse, l'écart entre les ADC suivant que le support est greffé ou non, est plus important pour la silice.

L'influence des pores sur l'ADC sera abordée au paragraphe 4.2 de ce chapitre.

4.1.2. En CLHP

Les mêmes expériences ont été effectuées en CLHP avec la série homologue des aromatiques et un éluant composé de 90 % d'ACN. Le débit a été fixé à une valeur de 1,0 $mL.min^{-1}$. Sur une phase greffée ODS, les trois molécules sont séparées avec un temps d'analyse de l'ordre de 5 minutes (Figure 36a). *A contrario*, en utilisant une colonne de silice vierge, aucune séparation des solutés n'est mise en évidence dans ces conditions (Figure 36b).

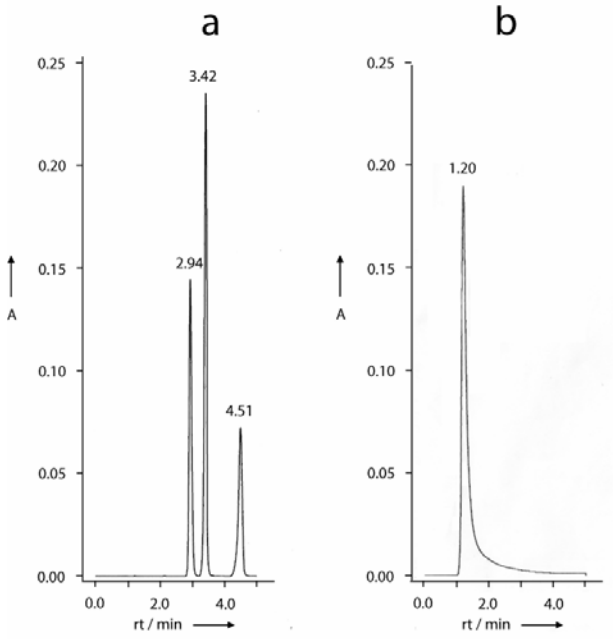

Figure 36 : Séparation chromatographique de la série homologue des aromatiques sur (a) une phase ODS et (b) une silice vierge. Phase mobile ACN/eau, 90/10, v/v. Débit 1,0 mL.min^{-1}, détection 254 nm.

Ce mélange de solvants est utilisé classiquement en chromatographie lorsque la phase est greffée (conditions de RPLC), mais beaucoup plus rarement avec de la silice. Ce dernier cas, peu décrit dans la littérature, est surtout utilisé dans l'analyse des peptides et est appelé « *reverse reversed-phase* » ou HILIC (*hydrophilic interaction LC*) [151]. Le mécanisme de rétention serait du partage entre une couche de solvant adsorbée à la surface du support hydrophile et la phase mobile. Pour observer une séparation en CLHP, le débit de la phase mobile a été diminué et les solutés ont également été injectés un par un pour déterminer leurs temps de rétention (Tableau 10). Nous remarquons que l'ordre d'élution est inversé par rapport à la RPLC avec, par ordre d'élution, l'anthracène, le naphtalène et le benzène. Comme les inertes classiquement utilisés en RPLC (solutions aqueuses de nitrate de potassium ou d'uracile) sont plus retenus que les molécules aromatiques dans ces conditions, nous avons choisi l'anthracène pour exprimer les temps de rétention relatifs et pouvoir ainsi exprimer la sélectivité α comme la différence de rétention entre deux analytes. Lorsque le débit de l'éluant diminue, les temps de rétention augmentent, mais également α. Toutefois, à cause de l'élargissement des bandes chromatographiques, l'étude en mélange des trois analytes ne permet pas d'appréhender une séparation. De plus, à un très faible débit, les pics chromatographiques s'étalent sur plusieurs heures et il est impossible de déterminer un temps de rétention pour les solutés. Les valeurs présentées dans le Tableau 10 sont celles données par le système d'enregistrement du signal (intégrateur) qui détermine le temps de rétention, lorsque le premier maximum du signal est atteint. Ces valeurs sont fiables lorsque

l'élargissement du pic est faible (pour des valeurs du débit supérieures à 0,01 $mL.min^{-1}$) mais deviennent non représentatives à 0,01 $mL.min^{-1}$, lorsque le signal est enregistré pendant plusieurs heures.

Débit ($mL.min^{-1}$)	tr du benzène	tr du naphtalène	tr de l'anthracène	α benzène/anthracène
1,00	1,34	1,30	1,27	2,2
0,50	2,66	2,58	2,53	2,5
0,10	14,51	13,78	13,33	2,6
0,01	243,48	231,69	220,68	2,1

Tableau 10 : Valeurs moyennes des temps de rétention (tr) des analytes aromatiques sur la colonne de silice à différents débits avec une phase mobile ACN/Eau, 90/10, v/v. La sélectivité est calculée en utilisant le temps d'élution de l'anthracène comme inerte.

La RMN Chromatographique permet en présence d'une silice vierge d'obtenir une séparation dans des conditions où la chromatographie n'en produit pas [152]. La différence constatée peut être le résultat de l'absence de débit, ainsi que du rapport solide/liquide beaucoup plus important en HRMAS.

En RMN PGSE, l'adsorption des analytes aussi bien que des solvants est favorisée et ce, d'autant plus facilement, que le rapport support/phase liquide est élevé. Le nombre relatif de sites plus élevé en RMN Chromatographique favorise les interactions entre le support et les solutés, entraînant ainsi une différence dans les ADC.

En CLHP, une colonne est remplie d'environ 80 % de liquide. Les forces d'adsorption des mélanges de solvants (ACN/eau) sur le support stationnaire sont supérieures à celles des solutés aromatiques. Nous pouvons donc concevoir qu'en CLHP, il existe une couche stagnante de solvant adsorbée sur le support et une diffusion des analytes hydrophobes principalement dans la phase mobile.

Cependant, cette séparation surprenante en RMN PGSE n'a été observée et étudiée que pour la série des aromatiques, ne permettant donc pas de généraliser cette approche à tous les solutés.

4.2. Rôle du pore

Les chromatographistes ont à leur disposition des matériaux possédant divers diamètres moyens de pores. Le processus chromatographique de discrimination est réalisé en partie grâce aux pores et à la facilité des solutés à pénétrer à l'intérieur de celui-ci. Les résultats

décrits dans les paragraphes qui suivent ont donné lieu à la rédaction d'un article [153] soumis à publication.

4.2.1. Mise en évidence grâce à un support non poreux

Comme nous ne disposions que de faibles quantités de silices non poreuses greffée et vierge, il nous a semblé pertinent de comparer les résultats obtenus avec les supports qui différent par leur diamètre de pore moyen. Les cartes DOSY obtenues en absence de phase, avec un support greffé non poreux et avec la phase poreuse Lichrospher100® C18 sont représentées en Figure 37 et avec de la silice vierge en Figure 38.

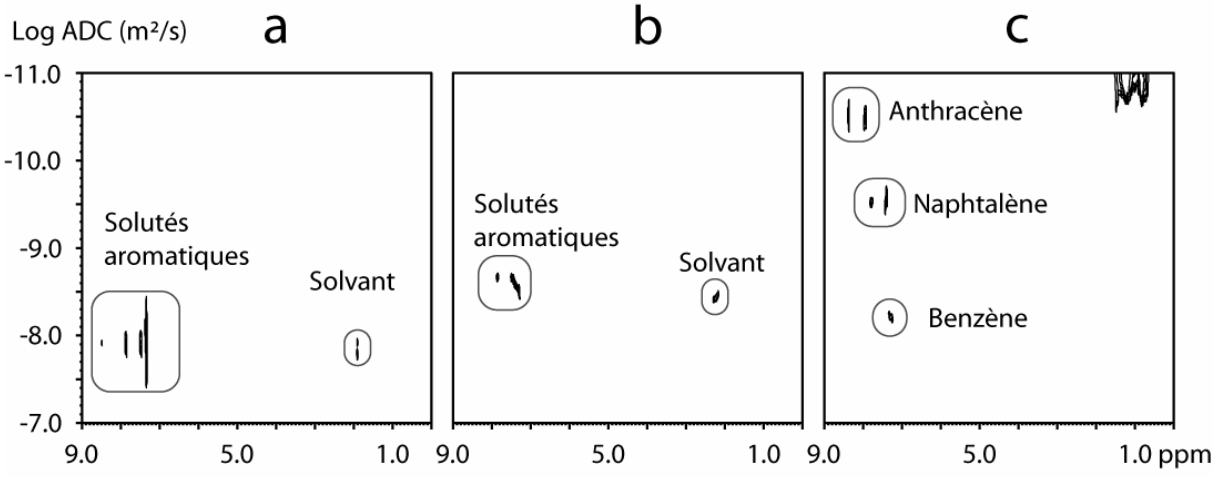

Figure 37 : Comparaison de la diffusion des solutés aromatiques dans de l'ACN-d3 (a) sans phase, (b) en présence de la phase non poreuse ODS et (c) en présence du support de diamètre moyen de pores de 100Å.

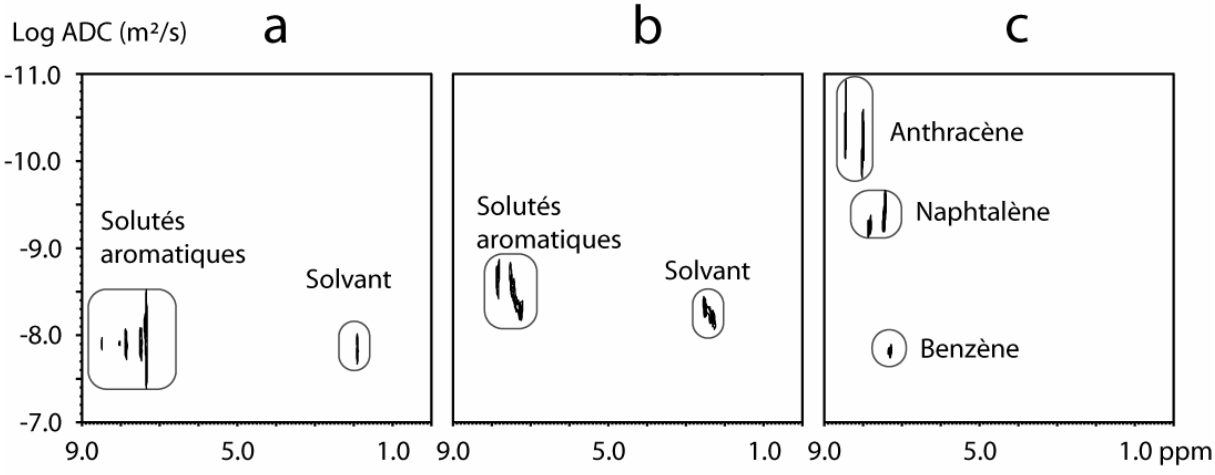

Figure 38 : Comparaison de la diffusion des solutés aromatiques dans de l'ACN-d3 (a) sans phase, (b) en présence de phase non poreuse vierge et (c) en présence du support de diamètre moyen de pores de 100Å.

En absence de phase chromatographique, les molécules ne sont pas séparées en fonction de leur ADC ; leur mobilité est voisine. En présence de support non poreux, les solutés et le solvant sont ralentis, sans discrimination des analytes. Cette diminution de l'ADC est due à la présence des particules de silices de faibles diamètres et à une diffusion restreinte par le support, c'est à dire à un déplacement moyen des solutés diminué par un mouvement qui n'est plus libre et limité à l'espace extraparticulaire. A l'inverse, en présence d'un support poreux, la résolution dans la dimension de la diffusion est fortement augmentée avec approximativement un ordre de grandeur de différence entre les ADC des analytes. L'allure des cartes DOSY est similaire, que la phase stationnaire soit greffée ou vierge. Les mêmes types d'interactions seraient donc mis en jeu sur des supports qui différencient uniquement par leurs greffages.

L'absence de séparation sur le support non poreux ne peut pas être exclusivement attribuée à l'absence de pore. En effet, les propriétés physico-chimiques des deux phases chromatographiques utilisées sont significativement différentes : diamètre des particules, surface spécifique, densité… De plus, la surface totale disponible dans le rotor est diminuée de deux ordres de grandeurs, suivant que les supports sont poreux ou non. Avec le support non poreux, tous les sites actifs sont susceptibles d'être saturés, diminuant ainsi la capacité séparative de la phase stationnaire, et par conséquent la résolution dans la dimension de la diffusion. Une autre explication possible à ce phénomène est le conditionnement de la phase stationnaire et plus particulièrement, le tassage plus faible du support en HRMAS. Le manque d'homogénéité du garnissage en RMN Chromatographique ne favorise pas le transfert de matière. En CLHP, le faible volume mort extraparticulaire, caractéristique des supports non poreux, permet d'augmenter le transfert de matière et donc d'obtenir une bonne qualité séparative.

Pour estimer le pouvoir séparatif de notre technique, nous avons calculé le rapport des ADC des solutés (Tableau 11). En absence de phase stationnaire, le rapport des ADC est, dans tous les cas, inférieur à 2. Il en est de même avec les supports non poreux. En revanche, avec une phase poreuse, ce rapport est supérieur ou égal à un ordre de grandeur ; la diffusion varie de plus d'un facteur 10 entre chaque soluté, permettant alors d'observer la séparation sur les cartes DOSY.

Le rôle des pores apparaît comme déterminant en RMN Chromatographique ; en absence de débit, la surface totale disponible semble affecter les propriétés de l'équilibre, ainsi que le transfert de matière d'une manière mise plus clairement en évidence en RMN qu'en CLHP.

Ratio des ADC	ADC Benzène/ADC Naphtalène		ADC Naphtalène/ADC Anthracène	
Composition solvant	100/0	90/10	100/0	90/10
Phase liquide	1,1	1,2	1,0	1,1
ODS 100Å	18,8	25,4	13,8	14,0
ODS non poreux	1,3	1,6	1,2	1,2
Silice 100Å	31,4	20,6	9,5	15,5
Silice non poreuse	1,3	1,7	0,7	1,1

Tableau 11 : Comparaison des rapports des ADC pour la série aromatique en absence de phase stationnaire, puis avec des supports non poreux, greffés ou vierges, et de diamètre de pores 100Å, pour deux compositions de phase liquide constituée d'ACN et d'un mélange d'ACN/eau, 90/10, v/v.

4.2.2. Diffusion des greffons

Avec la silice greffée non poreuse, bien que les groupements greffés sont beaucoup moins nombreux, une étude qualitative de la mobilité des greffons est toujours possible (Figure 39) et peut constituer un autre moyen pour appréhender le comportement des greffons au niveau des supports poreux. L'allure générale des décroissances obtenues sur le support non poreux est mono-exponentielle. Sur les supports poreux, à l'inverse, la décroissance du signal peut être régressée à partir de deux ADC. Il semble donc possible de discriminer au niveau des supports poreux, les greffons intra- et extraparticulaires. Les greffons à l'intérieur du pore apparaissent comme les plus mobiles. Nous pouvons donc estimer, à partir du pourcentage de chaque ADC, la quantité relative de greffons intra- et extraparticulaires. Pour la silice greffée présentant un diamètre moyen de pore de 100Å, 80 % des chaines alkyles seraient situées à l'intérieur du pore.

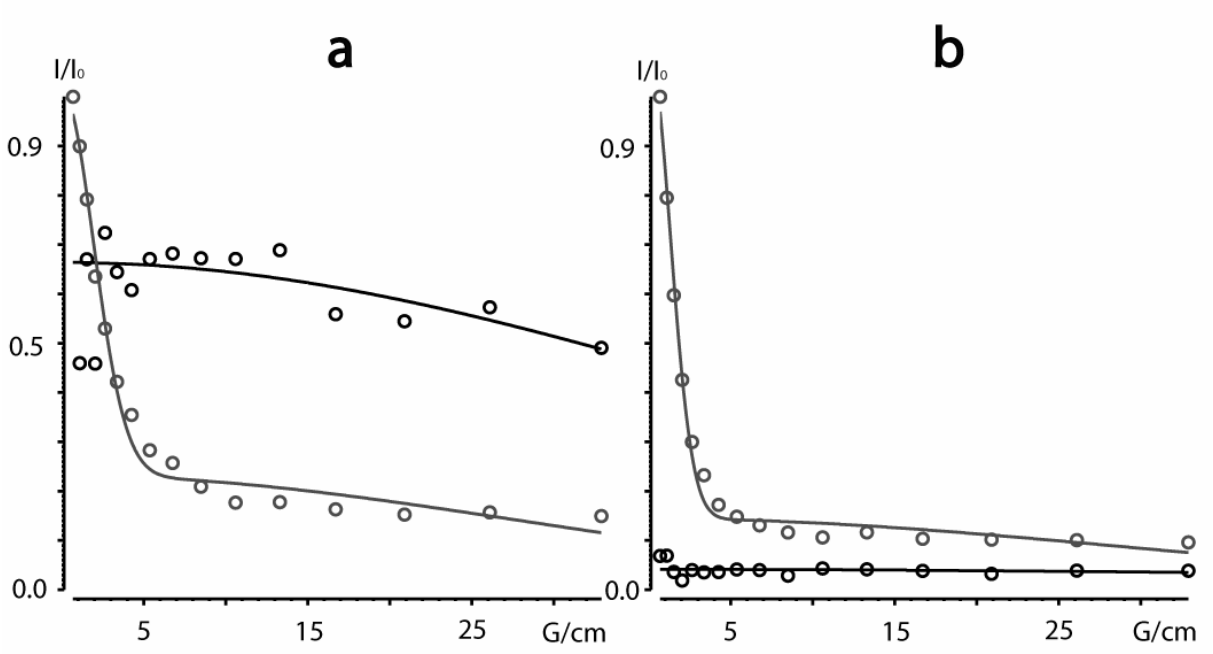

Figure 39 : Comparaison de la mobilité des greffons pour une phase de diamètre de pore moyen 100Å ou non poreuse avec une composition du mélange liquide de (a) ACN/Eau, 90/10, v/v et (b) ACN/Eau, 75/25, v/v. Les points et courbes en noir représentent le support non poreux, et en gris ceux obtenus avec un support poreux.

4.2.3. Influence du diamètre moyen du pore

Il est impossible de se procurer des supports différant uniquement par le diamètre moyen de pores. Nous avons uniquement pu obtenir de la silice vierge (Lichrospher®) présentant des diamètres de pore 100 ou 300Å, dont le diamètre moyen des particules est respectivement de 5 et 10 µm. Pour appréhender des conditions chromatographiques classiques de NPLC, obtenues avec de la silice, nous avons réalisé certaines expériences en utilisant le cyclohexane comme solvant.

4.2.3.1. Sur le solvant

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'ADC des solvants mesurés en présence de ces différents supports (Figure 40). Pour tous les solvants et toutes les compositions de phase liquide, la diffusion la plus lente est mesurée sur le support non poreux et augmente lorsque le diamètre du pore augmente. Cette variation, obtenue avec le support poreux, peut être attribuée à une modification de la surface spécifique. Lorsque le diamètre moyen du pore augmente, la surface spécifique, et par conséquent la surface totale dans le rotor, diminue. Le nombre de contacts pouvant alors se produire entre le solvant et la phase stationnaire va diminuer, conduisant ainsi à l'augmentation de l'ADC. La faible diffusion observée pour le support non poreux est due, majoritairement, à une diffusion

extraparticulaire, tandis que pour les supports poreux, la diffusion dans le pore serait possible grâce à un gradient de concentrations entre les volumes extra- et intraparticulaires.

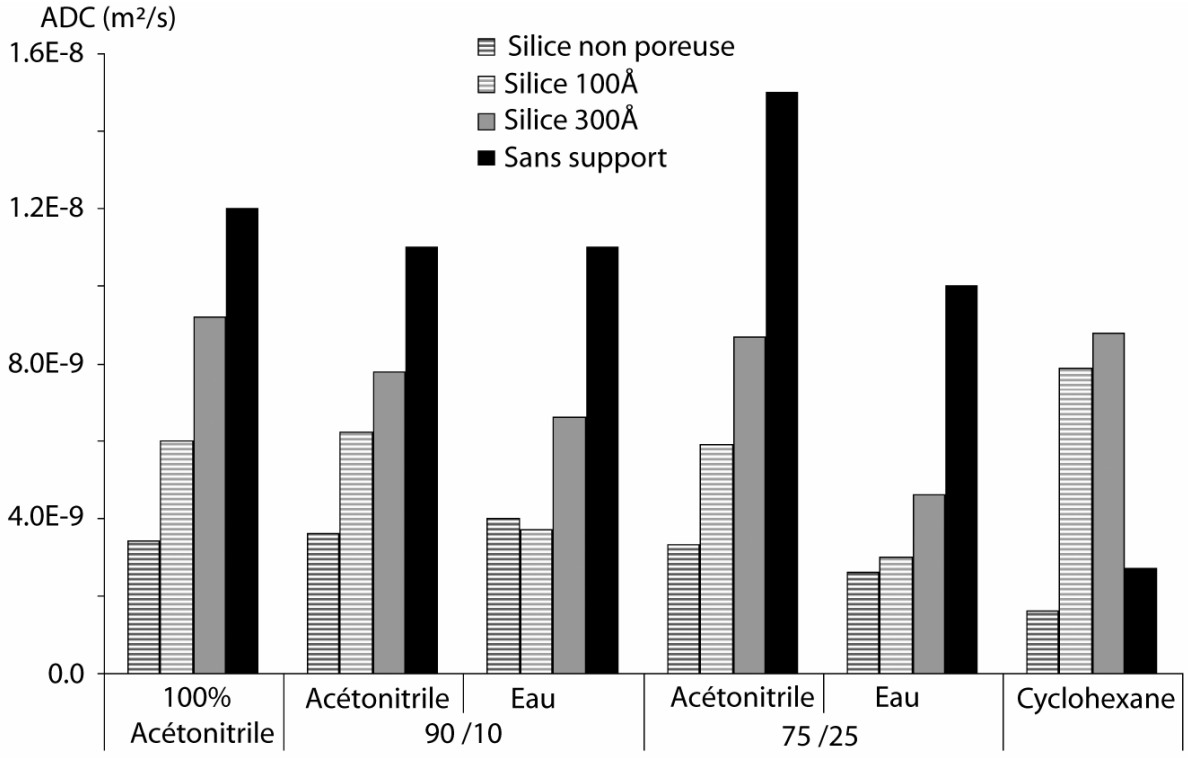

Figure 40 : ADC des solvants mesuré en présence des silices de différents diamètres de pores.

Nous pouvons remarquer sur la Figure 40 que la diffusion en absence de support est la plus rapide, à l'exception du cas du cyclohexane, pour lequel la mobilité est comprise entre celle mesurée sur la phase non poreuse et celle obtenue sur la silice de 100Å. La présence des analytes aromatiques, contribuant notamment à l'augmentation de la viscosité du mélange, conduit à un ralentissement du solvant en absence de phase. En présence de support, les solutés s'adsorbent préférentiellement sur le support, modifiant alors les propriétés de la phase liquide et par conséquent, son ADC.

Nous pouvons estimer l'affinité entre les solvants et la silice en calculant le rapport entre la diffusion en présence et en absence de phase (Tableau 12). Nous avons estimé cette grandeur également pour le benzène que nous avons, dans ce cas, considéré comme le solvant. Plus le rapport est faible, plus le solvant a de l'affinité pour le support et reste adsorbé à sa surface. Sur les supports poreux, le rapport le plus élevé est obtenu pour le cyclohexane (aux alentours de 3) et pour le benzène (aux environs de 2) ; quelle que soit la composition du mélange ACN/eau, l'ACN a moins d'affinité que l'eau pour le support. Ces observations sont comparables à l'échelle de force de solvant utilisée en NPLC, dans laquelle la force

d'adsorption ε_0 la moins élevée est mesurée pour le cyclohexane (0,03) puis le benzène (0,25), l'ACN (0,50 à 0,52) et enfin l'eau [154]. Sur le support non poreux, l'ordre diffère légèrement : le benzène présente le moins d'affinité avec le support, puis le cyclohexane et enfin l'eau ainsi que l'ACN caractérisé par les plus fortes valeurs de ε_0.

Dans le cas des supports poreux, la valeur des rapports pour le cyclohexane et le benzène sont supérieur à 1, les solutés diffusent plus vite en présence de support qu'en son absence. La présence de naphtalène et d'anthracène dans le mélange ralentit la diffusion en absence de phase d'un ordre de grandeur environ. Nous supposons donc, qu'en présence de phase stationnaire poreuse, il y a un appauvrissement de la phase liquide en molécules poly-aromatiques qui interagissent plus fortement avec le support que le solvant, entraînant alors une augmentation de la diffusion de ce dernier.

		Silices		
		Non poreux	100Å	300Å
Acétonitrile	100	0,28	0,50	0,77
	90	0,33	0,56	0,71
	75	0,22	0,39	0,58
Eau	10	0,36	0,34	0,60
	25	0,26	0,30	0,46
Cyclohexane		0,59	2,93	3,26
Benzène		0,98	1,57	1,93

Tableau 12 : Rapport des ADC des solvants entre la présence et l'absence de phase chromatographique pour les trois supports.

4.2.3.2. Sur les solutés

Nous avons montré précédemment qu'aucune séparation des analytes n'était observée en présence de silice non poreuse. L'étude de la variation des ADC sur la silice possédant des pores de 300Å pourrait nous permettre d'appréhender l'influence du pore et de la surface spécifique sur la rétention RMN. Comme les échelles de diffusions sont différentes d'un facteur dix entre chaque molécule, les résultats sont présentés sur la Figure 41 avec un graphique spécifique à chaque soluté.

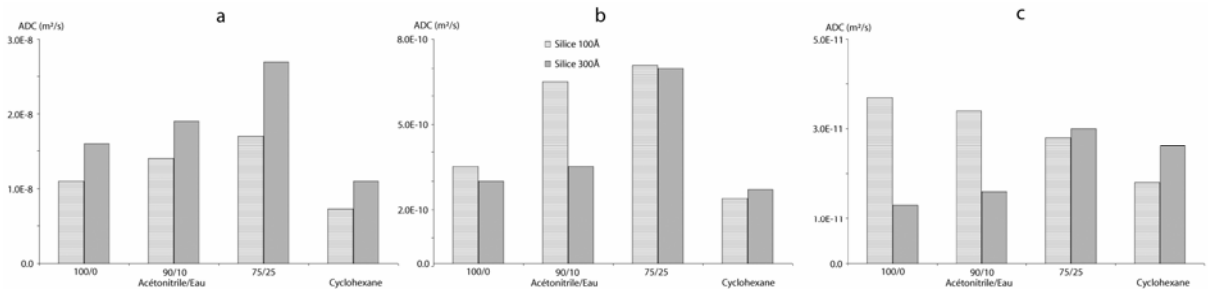

Figure 41 : ADC des solutés aromatiques sur les silices de 100 et 300Å avec 3 mélanges ACN/eau de compositions différentes et le cyclohexane comme solvant ; (a) pour le benzène, (b) pour le naphtalène et (c) pour l'anthracène.

Excepté pour l'anthracène, en présence de silice avec un diamètre de pore moyen de 300Å, les ADC mesurés avec le cyclohexane sont plus faibles, qu'avec une phase liquide composée d'ACN et d'eau. Ce solvant présente le moins d'interaction avec le support et le déplacement des solutés à la surface de la silice n'est alors modifié par aucune adsorption compétitive de la part du solvant. De plus, la diffusion sur la silice varie en sens inverse du diamètre moyen des pores. La surface spécifique diminue lorsque le diamètre moyen du pore augmente et donc, le nombre de contacts diminue, entrainant ainsi une augmentation de l'ADC. Ce phénomène se produit dans des conditions particulières pour lesquelles l'influence du pore ne se traduit qu'en terme de surface spécifique avec un solvant ne s'adsorbant pas sur le support (cyclohexane) ou avec des solutés de petites tailles, faiblement retenus comme le benzène.

Pour expliquer les résultats de la Figure 41 dans le cas d'un solvant qui présente des affinités avec le support stationnaire, nous sommes amenés à considérer que le processus séparatif est une contribution des différents facteurs diffusifs. Ainsi, l'ADC mesuré est une somme des différentes diffusions pouvant se dérouler dans le rotor : la diffusion des analytes dans le liquide, mais aussi celles à proximité de la surface du support comme la diffusion de surface, de pore ou intraparticulaire. Chaque diffusion est pondérée par une fraction représentant l'importance de chaque processus dans la valeur mesurée.

Pour le benzène, l'ajout d'eau dans la phase liquide se traduit, pour les deux supports, par une augmentation des ADC. L'eau, présentant la plus forte affinité avec la silice, masque les silanols présents à la surface du solide. L'augmentation de la porosité diminue la surface spécifique et, par conséquent, le nombre de sites actifs. L'ADC augmente alors avec le diamètre moyen du pore, car le soluté est faiblement retenu et la taille du pore n'a que peu d'influence sur sa rétention. Dans ce cas précis, c'est la fraction de la composante liquide qui augmente avec la teneur en eau entrainant un ADC plus rapide pour un même support.

Le naphtalène est une molécule présentant plus d'affinité pour le support stationnaire que le benzène et donc, un ADC plus lent. Nous remarquons que la diffusion augmente également avec le pourcentage en eau et une forte augmentation par paliers de l'ADC est observée pour les deux supports. Toutefois, sur le support à 100Å, ce saut de la diffusion se produit à un pourcentage d'eau de 10 % alors que sur la 300Å, il intervient à une valeur de 25 %. Comme l'eau a une forte affinité avec le support, les molécules vont se fixer sur le support et obstruer l'entrée du pore. Celui présentant le plus faible diamètre est le moins accessible aux solutés, tandis que le pourcentage d'eau doit être plus important pour modifier l'accès du pore de 300Å de diamètre. Dans ce cas, ce sont les mécanismes diffusionnels à la proximité de la surface qui gouvernent la rétention RMN.

Concernant l'anthracène, sur le support de diamètre de pores de 300Å, le même phénomène que pour le naphtalène est à l'origine de la variation de l'ADC. En revanche, sur la phase de 100Å, l'ADC ne varie pas significativement avec le pourcentage d'eau pour les deux premières compositions, puis il diminue lorsque le solvant contient 25 % d'eau. La taille et l'hydrophobie de l'anthracène seraient à l'origine du piégeage de cette molécule à l'intérieur du pore, favorisant alors sa diffusion à proximité du support. La variation des coefficients de diffusion de surface peut ainsi être sondée en faisant varier la proportion en eau du mélange.

Pour estimer une possible influence de la concentration des solutés dans la phase liquide, nous avons étudié l'ADC des analytes à deux concentrations (Figure 15). Nous avons choisi le cyclohexane comme solvant pour couvrir une large gamme de concentrations en naphtalène. La Figure 15 montre que la concentration n'a pas d'influence sur la grandeur mesurée et nous permet de nous affranchir d'éventuels effets de concentration dans l'interprétation des résultats.

4.3. Conclusion

Nous venons de montrer l'influence des propriétés physico-chimiques de la phase stationnaire en RMN Chromatographique, et notamment la possibilité de réaliser des séparations sur un support non greffée qui ne sont pas observées en CLHP. *A contrario*, des séparations obtenues en CLHP avec un support non poreux ne sont pas observées avec notre méthode RMN. La RMN Chromatographique pourrait donc être complémentaire de la chromatographie.

5. Limitations de la technique et perspectives

La méthode développée dans ce manuscrit pour appréhender les phénomènes chromatographiques est particulièrement innovante. Nous avons montré le potentiel de la technique avec différents exemples, mis en évidence l'influence de certains paramètres sur la diffusion et comparer les résultats avec la CLHP.

La technique d'analyse n'est cependant pas facile à mettre en œuvre et il est indispensable de mettre en exergue les différentes limitations que nous avons rencontrées et apporter ainsi un regard critique sur la technique.

5.1. Problèmes technologiques et de traitement des données

Comme nous avons montré dans l'étude bibliographique, peu de mesures de diffusions ont été réalisées avec une sonde HRMAS. La bobine de gradients introduite dans la sonde est susceptible de produire une intensité maximale de l'ordre de 55 $G.cm^{-1}$ permettant de mesurer des coefficients de diffusion compris entre 10^{-8} et 10^{-11} $m^2.s^{-1}$. Pour des molécules présentant de fortes interactions avec le support, les gradients produits ne sont pas assez puissants pour mesurer précisément le coefficient de diffusion. En effet, à la fin de l'expérience, le signal du pic dont l'ADC est mesuré doit avoir moins de 10 % de l'intensité initiale pour que le traitement mathématique des données s'affranchit d'erreurs. Avec de faibles gradients, la décroissance est plus faible induisant une régression de moins bonne intensité. Un moyen pour obtenir des gradients plus fort, et donc de détecter des diffusions plus lente, est d'utiliser un système de micro-imagerie [57] (paragraphe 3.2.3 de l'étude bibliographique).

La fabrication des rotors semble poser actuellement encore quelques problèmes et ne pas induire systématiquement des résultats comparables. Ainsi, nous avons pu constater qu'en fonction de l'insert utilisé dans le rotor, la qualité des décroissances obtenues en absence de phase était fortement modifiée. La Figure 42 en donne un exemple avec à droite un insert conduisant à une qualité de décroissance moyenne, à la différence de la régression à gauche obtenue avec un insert différent. Il est donc important de vérifier périodiquement, dans des conditions simples, le matériel et plus particulièrement l'insert, lors des analyses de la diffusion.

Concernant le traitement des données, l'équation utilisée pour corréler les résultats n'est pas la plus appropriée ; avec des matériaux poreux, l'approche théorique est beaucoup plus complexe. La largeur importante des pics dans la dimension de la diffusion peut être due à

l'utilisation d'une relation non appropriée pour exploiter les données. Cependant, les résultats obtenus avec l'équation (73) permettent de traiter correctement les données et elle a été utilisée tout au long de ce manuscrit.

Le traitement mathématique des données est relativement complexe et est, à l'heure actuelle, un des points de blocage du développement des expériences à gradient de champs magnétique.

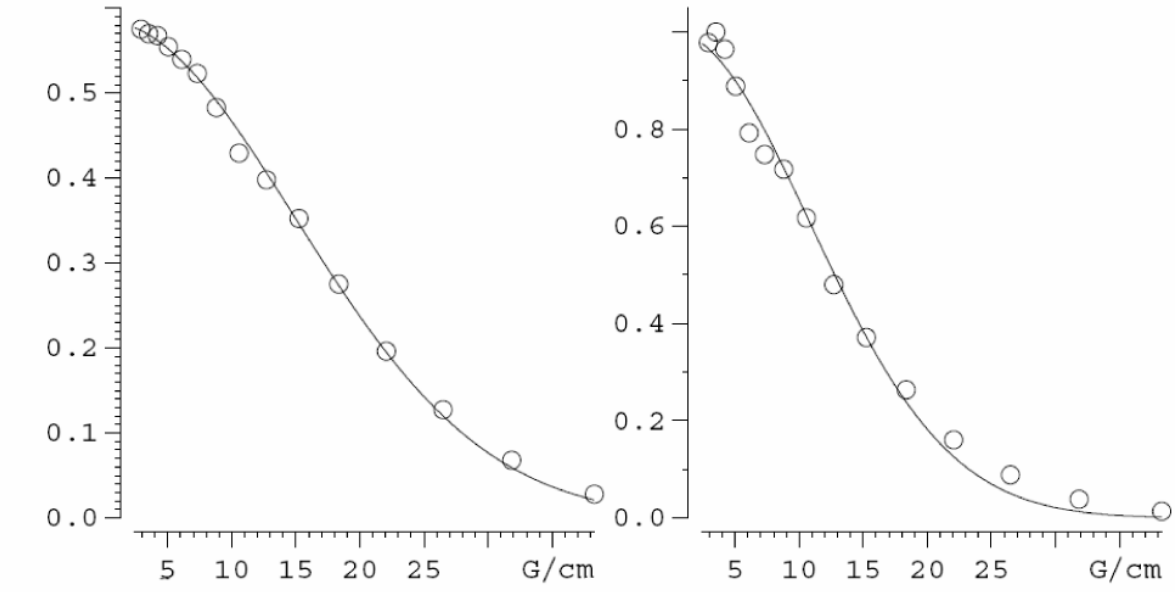

Figure 42 : Décroissances obtenues sur le pic des aromatiques pour un mélange de phénylalanine et d'éthanol dans l'eau deutérié en fonction de l'insert employé.

5.2. Problèmes dus au système

En RMN HRMAS, la sensibilité de l'analyse est faible (de l'ordre du millimolaire). Ainsi, les solutions introduites dans le rotor sont concentrées. Il existe un facteur d'environ 100 entre la concentration des solutés analysés en RMN et celle employée en CLHP. Bien que nous ayons montré qu'en RMN Chromatographique, la concentration du soluté n'a que peu d'influence, ce n'est pas le cas de la CLHP où les isothermes d'adsorption prennent toute leur importance.

L'addition d'une phase stationnaire chromatographique entraine l'élargissement des raies spectrales lors de l'acquisition des spectres. Malgré la MAS, les pics sont plus larges et moins bien résolus qu'en RMN du liquide. Pour pouvoir traiter les données, la situation idéale résiderait dans la certitude de l'existence d'une seule et unique espèce pour un pic RMN. Il est donc nécessaire que les solutés étudiés présentent une zone de déplacements chimiques d'environ 100 Hz pour laquelle nous sommes surs de n'observer que le pic d'une seule molécule. Ce qui a été le cas des analytes aromatiques mais pas celui des cétones, d'où la

nécessité d'étudier chaque cétone séparément. Cet inconvénient majeur nous oblige donc à choisir astucieusement les solutés et nous limite à des composés présentant un spectre RMN relativement simple, soit des molécules de petites tailles.

Une dernière limitation pour la partie fondamentale, et non des moindre, est la difficulté à se procurer différentes phases stationnaires chromatographiques « en vrac » car elles ne sont pas forcément disponible commercialement sous ce conditionnement et les constructeurs, ne fournissent pas ces supports, indispensables à la caractérisation et à la compréhension du phénomène.

5.3. Perspectives

Malgré les inconvénients mis en exergue ci-avant, la RMN Chromatographique peut se révéler être une méthode d'intérêt pour différentes applications.

Ces travaux préliminaires ont montré l'influence de certains paramètres sur l'ADC des solutés et des greffons mais n'ont pas permis de caractériser précisément le ou les phénomènes observés. Des études doivent encore être menées pour essayer de déterminer les interactions mises en jeu et ainsi, pouvoir contribuer à la mise en évidence d'une partie du phénomène chromatographique. Ces premiers travaux ont montré que, dans le cas spécifique des analytes aromatiques, le processus de ralentissement n'était pas majoritairement du à la présence d'un greffage. Il apparaît primordial de confirmer ces résultats pour aborder l'étude par RMN Chromatographique de mélanges d'énantiomères. En effet, si le greffon ne joue qu'un faible rôle dans la séparation, alors la diastéréosélectité du système créée lors de séparations chirales grâce aux groupements fixés sur le support ne pourra pas être mise en évidence, et donc la séparation de telles molécules ne pourra pas être réalisée à l'aide de cette technique.

Une perspective très intéressante consiste à développer des tests permettant de prédire les capacités séparatives des nouvelles phases stationnaires avant même de les étudier par CLHP. Actuellement, les propriétés des nouveaux supports chromatographiques sont caractérisées par des tests réalisés lorsque la colonne a été tassée, à partir de l'exploitation des grandeurs obtenues sur un chromatogramme type obtenu avec des solutés de référence. L'inconvénient de ces tests réside dans les conditions de mise en œuvre : tester une colonne. Pour cela, il est nécessaire de synthétiser une quantité de phase suffisante pour pouvoir obtenir une colonne chromatographique (quelques grammes), puis tasser la phase stationnaire dans une colonne. En réalisant le test par RMN PGSE, seulement quelques milligrammes de phase sont nécessaires, permettant de gagner ainsi du temps dans le développement de la synthèse, mais

aussi sur la préparation de la colonne. Un premier screening permettant d'éliminer les phases stationnaires qui ne présenteraient pas les capacités attendues pourrait ainsi être réalisé.

CONCLUSION

Nous avons montré que l'ADC d'un soluté, mesuré par RMN PGSE, pouvait être modifié par la présence d'une phase chromatographique. L'addition de ce support stationnaire entraine une hétérogénéité de l'échantillon et, par conséquent, un élargissement des largeurs spectrales du à l'anisotropie du mélange. Pour résoudre ce problème, une sonde spécifique dans laquelle l'échantillon est mis en rotation à l'angle magique doit être utilisée : la sonde HRMAS.

Les travaux décrits ont consisté à comprendre les phénomènes se déroulant au sein de l'échantillon, c'est-à-dire appréhender les interactions entre le support et la phase liquide. Le processus séparatif étant réalisé grâce au solide, nous avons comparé les résultats obtenus avec ceux issus de la CLHP. Dans un premier temps, pour que la préparation de l'échantillon soit reproductible et pour maitriser les facteurs extérieurs à la mesure, nous avons étudié l'influence des conditions de préparation de l'échantillon et de la rotation à l'angle magique. Il a été notamment mis en évidence que l'équilibre du processus séparatif était atteint rapidement et que la concentration des solutés sur une large gamme de valeurs n'avait pas d'influence sur la mesure de l'ADC. De plus, la quantité de liquide introduite dans le rotor a été optimisée pour obtenir la meilleure séparation possible en terme de résolution dans la dimension de la diffusion.

En CLHP, la composition de l'éluant a une forte influence sur la rétention des analytes. Nous avons étudié la variation des ADC en fonction de la composition du solvant sur une phase greffée ODS pour deux séries homologues : aromatique et cétone. En présence de phase chromatographique dans le rotor, les ADC augmentent lorsque le solvant est enrichi en eau, ce qui s'explique par une modification des équilibres de partage et par l'observation d'une diffusion de type intraparticulaire. Le comportement des greffons a été également mis en évidence. Une représentation sous la forme d'un « chromatogramme RMN » permet de mettre en exergue les points communs, mais aussi les différences constatées avec la CLHP.

Dans une seconde partie, nous avons modifié les propriétés physiques de la phase stationnaire. Des capacités séparatives inattendues ont été mises en évidence. En effet, dans le cas particulier de la série homologue des aromatiques, une séparation identique est observée sur la phase greffée et la silice vierge, tandis qu'en chromatographie, dans les mêmes conditions, la

silice vierge ne permet pas de séparer les trois analytes. De plus, nous avons mis en évidence l'importance des pores et de leurs diamètres moyens au niveau du processus séparatif.

Cependant, au cours de ces travaux, nous nous sommes heurtés à certains problèmes technologiques comme la qualité des rotors utilisés ou la limitation de la force des gradients. De plus, une des difficultés réside dans l'obtention des phases stationnaires chromatographiques souhaitées pour réaliser nos études car peu de supports sont disponibles dans un conditionnement autre que celui d'une colonne ou d'une cartouche chromatographique.

Un des développements prometteurs de cette technique, hormis la compréhension des interactions, concerne la mise au point de tests prédisant les capacités séparatives de la phase stationnaire préparée.

REFERENCES

[1] Y. C. Guillaume, C. Guinchard, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 183.

[2] Y. C. Guillaume, C. Guinchard, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 608.

[3] C. A. Doyle, T. J. Vickers, C. K. Mann, J. G. Dorsey, *J. Chromatogr. A* **1997**, *779*, 91.

[4] C. A. Doyle, T. J. Vickers, C. K. Mann, J. G. Dorsey, *J. Chromatogr. A* **2000**, *877*, 41.

[5] M. W. Ducey, Jr., C. J. Orendorff, J. E. Pemberton, L. C. Sander, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5576.

[6] M. W. Ducey, Jr., C. J. Orendorff, J. E. Pemberton, L. C. Sander, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5585.

[7] A. Tchapla, S. Heron, E. Lesellier, H. Colin, *J. Chromatogr. A* **1993**, *656*, 81.

[8] F. Gritti, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* **2005**, *1099*, 1.

[9] A. Vailaya, C. Horvath, *J. Chromatogr. A* **1998**, *829*, 1.

[10] P. T. Callaghan, *Principles of nuclear magnetic resonance microscopy*, Oxford University Press ed., New-York, **1991**.

[11] D. Canet, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1997**, *30*, 101.

[12] C. S. Johnson, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1999**, *34*, 203.

[13] P. Stilbs, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1987**, *19*, 1.

[14] L. van Hove, *Phys. Rev.* **1954**, *95*, 249.

[15] L. van Hove, *Phys. Rev.* **1954**, *95*, 1374.

[16] E. O. Stejskal, J. E. Tanner, *J. Chem. Phys.* **1965**, *42*, 288.

[17] J. E. Tanner, E. O. Stejskal, *J. Chem. Phys.* **1968**, *49*, 1768.

[18] R. L. Vold, J. S. Waugh, M. P. Klein, D. E. Phelps, *J. Chem. Phys.* **1968**, *48*, 3831.

[19] T. L. James, G. G. McDonald, *J. Magn. Reson.* **1973**, *11*, 58.

[20] P. Stilbs, M. E. Moseley, *Chem. Scripta* **1979**, *13*, 26.

[21] P. Stilbs, M. E. Moseley, *Chem. Scripta* **1980**, *15*, 176.

[22] M. E. Moseley, P. Stilbs, *Chem. Scripta* **1980**, *16*, 114.

[23] P. Stilbs, *Anal. Chem.* **1981**, *53*, 2135.

[24] W. S. Price, *Concepts Magn. Reson.* **1997**, *9*, 299.

[25] H. C. Torrey, *Phys. Rev.* **1956**, *104*, 563.

[26] R. Kimmich, *NMR-Tomography, Diffusometry, Relaxometry*, Springer ed., Berlin, **1997**.

[27] M. D. Pelta, H. Barjat, G. A. Morris, A. L. Davis, S. J. Hammond, *Magn. Reson. Chem.* **1998**, *36*, 706.

[28] W. S. Price, P. W. Kuchel, *J. Magn. Reson.* **1991**, *94*, 133.

[29] J. E. Tanner, *J. Chem. Phys.* **1970**, *52*, 2523.

[30] E. L. Hahn, *Phys. Rev.* **1950**, *80*, 580.

[31] A. Chen, C. S. Johnson, Jr., M. Lin, M. J. Shapiro, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9094.

[32] Wu D. H., Chen A. D., Johnson C. S., *J. Magn. Reson. Ser. A* **1995**, *115*, 260.

[33] J. R. F. Karlicek, I. J. Lowe, *J. Magn. Reson.* **1980**, *37*, 75.

[34] S. J. Gibbs, C. S. Johnson Jr, *J. Magn. Reson.* **1991**, *93*, 395.

[35] K. F. Morris, C. S. Johnson Jr, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3139.

[36] S. W. Provencher, *Comput. Phys. Commun.* **1982**, *27*, 229.

[37] M. A. Delsuc, T. E. Malliavin, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2146.

[38] P. Stilbs, K. Paulsen, P. C. Griffiths, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 8180.

[39] B. Antalek, W. Windig, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10331.

[40] I. Scarminio, M. Kubista, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 409.

[41] B. Antalek, *Concepts Magn. Reson.* **2002**, *14*, 225.

[42] B. Antalek, J. M. Hewitt, W. Windig, P. D. Yacobucci, T. Mourey, K. Le, *Magn. Reson. Chem.* **2002**, *40*, S60.

[43] W. Windig, B. Antalek, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1999**, *46*, 207.

[44] G. S. Armstrong, N. M. Loening, J. E. Curtis, A. J. Shaka, V. A. Mandelshtam, *J. Magn. Reson.* **2003**, *163*, 139.

[45] P. Thureau, A. Thevand, B. Ancian, P. Escavabaja, G. S. Armstrong, V. A. Mandelshtam, *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 1510.

[46] P. Mutzenhardt, J. Brondeau, F. Humbert, D. Canet, *J. Magn. Reson.* **1991**, *94*, 543.

[47] C. Mouro, P. Mutzenhardt, B. Diter, D. Canet, *Magn. Reson. Chem.* **2002**, *40*, S133.

[48] R. Huo, R. Wehrens, J. Van Duynhoven, L. M. C. Buydens, *Anal. Chim. Acta* **2003**, *490*, 231.

[49] P. Thureau, Thèse de doctorat, Diffusion Ordered Spectroscopy. Comparison of processing methods and application to chemical exchange, Université de Provence (Marseille), **2006**.

[50] P. A. Keifer, L. Baltusis, D. M. Rice, A. A. Tymiak, J. N. Shoolery, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1996**, *119*, 65.

[51] W. L. Fitch, G. Detre, C. P. Holmes, J. N. Shoolery, P. A. Keifer, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7955.

[52] F. D. Doty, G. Entzminger, Y. A. Yang, *Concepts Magn. Reson.* **1998**, *10*, 133.

[53] F. D. Doty, G. Entzminger, Y. A. Yang, *Concepts Magn. Reson.* **1998**, *10*, 239.

[54] A. Sodickson, D. G. Cory, *J. Magn. Reson.* **1997**, *128*, 87.

[55] M. Piotto, K. Elbayed, J.-M. Wieruszeski, G. Lippens, *J. Magn. Reson.* **2005**, *173*, 84.

[56] W. E. Maas, F. H. Laukien, D. G. Cory, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13085.

[57] A. Pampel, K. Zick, H. Glauner, F. Engelke, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9534.

[58] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.

[59] P. A. Keifer, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1558.

[60] M. Guino, Y. R. De Miguel, in *Analysis and Purification Methods in Combinatorial Chemistry* (Ed.: B. Yan), Wiley Interscience, New-York, **2004**, pp. 71.

[61] W. P. Power, *Annu. Rep. NMR Spectro.* **2003**, *51*, 261.

[62] G. Lippens, R. Warrass, J. M. Wieruszeski, P. Rousselot-Pailley, G. Chessari, *Comb. Chem. High. T. Scr.* **2001**, *4*, 333.

[63] R. Warrass, G. Lippens, in *Combinatorial Chemistry: Synthesis, Analysis, Screening* (Ed.: G. Jung), Wyley-VCH, Weinheim, **1999**, pp. 533.

[64] J. H. Davis, M. Auger, R. S. Hodges, *Biophys. J.* **1995**, *69*, 1917.

[65] H. C. Bertram, J. Z. Hu, D. N. Rommereim, R. A. Wind, H. J. Andersen, *J. Agr. Food Chem.* **2004**, *52*, 2681.

[66] O. Saether, O. Risa, J. Cejkova, J. Krane, A. Midelfart, *Graef. Arch. Clin. Exp.* **2004**, *242*, 1000.

[67] J. L. Griffin, J. Troke, L. A. Walker, R. F. Shore, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, *FEBS Lett.* **2000**, *486*, 225.

[68] S. Garrod, E. Humpher, S. C. Connor, J. C. Connelly, M. Spraul, J. K. Nicholson, E. Holmes, *Magn. Reson. Med.* **2001**, *45*, 781.

[69] J. L. Griffin, L. Walker, R. F. Shore, J. K. Nicholson, *Xenobiotica* **2001**, *31*, 377.

[70] M. E. Bollard, J. Xu, W. Purcell, J. L. Griffin, C. Quirk, E. Holmes, J. K. Nicholson, *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 1351.

[71] M. Coen, E. M. Lenz, J. K. Nicholson, I. D. Wilson, F. Pognan, J. C. Lindon, *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 295.

[72] R. J. Mortishire-Smith, G. L. Skiles, J. W. Lawrence, S. Spence, A. W. Nicholls, B. A. Johnson, J. K. Nicholson, *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 165.

[73] O. M. Rooney, J. Troke, J. K. Nicholson, J. L. Griffin, *Magn. Reson. Med.* **2003**, *50*, 925.

[74] Y. Wang, M. E. Bollard, H. Keun, H. Antti, O. Beckonert, T. M. Ebbels, J. C. Lindon, E. Holmes, H. Tang, J. K. Nicholson, *Anal. Biochem.* **2003**, *323*, 26.

[75] M. E. Bollard, A. J. Murray, K. Clarke, J. K. Nicholson, J. L. Griffin, *FEBS Lett.* **2003**, *553*, 73.

[76] Y. Wang, H. Tang, E. Holmes, J. C. Lindon, M. E. Turini, N. Sprenger, G. Bergonzelli, L. B. Fay, S. Kochhar, J. K. Nicholson, *J. Proteome Res.* **2005**, *4*, 1324.

[77] O. Risa, O. Saether, M. Kakar, V. Mody, S. Loefgren, P. G. Soederberg, J. Krane, A. Midelfart, *Exp. Eye Res.* **2005**, *81*, 407.

[78] J. L. Griffin, O. Corcoran, *Magn. Reson. Mater. Phy. Biol. Med.* **2005**, *18*, 51.

[79] R. W. Martin, R. C. Jachmann, D. Sakellariou, U. G. Nielsen, A. Pines, *Magn. Reson. Med.* **2005**, *54*, 253.

[80] L. L. Cheng, K. Newell, A. E. Mallory, B. T. Hyman, R. G. Gonzalez, *Magn. Reson. Imaging* **2002**, *20*, 527.

[81] K. K. Millis, W. E. Maas, D. G. Cory, S. Singer, *Magn. Reson. Med.* **1997**, *38*, 399.

[82] J.-H. Chen, B. M. Enloe, P. Weybright, N. Campbell, D. Dorfman, C. D. Fletcher, D. G. Cory, S. Singer, *Magn. Reson. Med.* **2002**, *48*, 602.

[83] M. A. Burns, J. L. Taylor, C.-L. Wu, A. G. Zepeda, A. Bielecki, D. Cory, L. L. Cheng, *Magn. Reson. Med.* **2005**, *54*, 34.

[84] M. G. Swanson, D. B. Vigneron, Z. L. Tabatabai, R. G. Males, L. Schmitt, P. R. Carroll, J. K. James, R. E. Hurd, J. Kurhanewicz, *Magn. Reson. Med.* **2003**, *50*, 944.

[85] L. L. Cheng, C.-L. Wu, M. R. Smith, R. G. Gonzalez, *FEBS Lett.* **2001**, *494*, 112.

[86] L. Calabi, G. Alfieri, L. Biondi, M. De Miranda, L. Paleari, S. Ghelli, *J. Magn. Reson.* **2002**, *156*, 222.

[87] I. F. Duarte, E. G. Stanley, E. Holmes, J. C. Lindon, A. M. Gil, H. Tang, R. Ferdinand, C. G. McKee, J. K. Nicholson, H. Vilca-Melendez, N. Heaton, G. M. Murphy, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 5570.

[88] L. H. Lucas, S. F. Wilson, C. E. Lunte, C. K. Larive, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 2978.

[89] L. L. Cheng, M. A. Burns, J. L. Taylor, W. He, E. F. Halpern, W. S. McDougal, C.-L. Wu, *Cancer Res.* **2005**, *65*, 3030.

[90] D. Morvan, A. Demidem, J. Papon, M. De Latour, J. C. Madelmont, *Cancer Res.* **2002**, *62*, 1890.

[91] M. C. Martinez-Bisbal, L. Marti-Bonmati, J. Piquer, A. Revert, P. Ferrer, J. L. Llacer, M. Piotto, O. Assemat, B. Celda, *NMR Biomed.* **2004**, *17*, 191.

[92] J. L. Griffin, K. K. Lehtimaeki, P. K. Valonen, O. H. J. Groehn, M. I. Kettunen, S. Ylae-Herttuala, A. Pitkaenen, J. K. Nicholson, R. A. Kauppinen, *Cancer Res.* **2003**, *63*, 3195.

[93] J. L. Griffin, C. Blenkiron, P. K. Valonen, C. Caldas, R. A. Kauppinen, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 1546.

[94] A. M. Gil, I. F. Duarte, I. Delgadillo, I. J. Colquhoun, F. Casuscelli, E. Humpfer, M. Spraul, *J. Agr. Food Chem.* **2000**, *48*, 1524.

[95] I. F. Duarte, I. Delgadillo, M. Spraul, E. Humpfer, A. M. Gil, in *Magnetic resonance in food science, Vol. 262* (Eds.: G. A. Webb, P. S. Belton, A. M. Gil, I. Delgadillo), Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2001**, pp. 259.

[96] A. P. Sobolev, A. Segre, R. Lamanna, *Magn. Reson. Chem.* **2003**, *41*, 237.

[97] A. P. Deshmukh, A. J. Simpson, P. G. Hatcher, *Phytochemistry* **2003**, *64*, 1163.

[98] L.-H. Tseng, H. Handel, K. Albert, *GIT Labor-Fachzeitschrift* **2000**, *44*, 364.

[99] M. A. Brescia, G. Di Martino, C. Fares, N. Di Fonzo, C. Platani, S. Ghelli, F. Reniero, A. Sacco, *Cereal Chem.* **2002**, *79*, 238.

[100] M. A. Brescia, A. Sgaramella, S. Ghelli, A. Sacco, *J. Sci. Food Agr.* **2003**, *83*, 1463.

[101] L. Shintu, Thèse de doctorat, Développement d'une méthodologie combinée RMN HRMAS et chimiométrie pour l'étude de produits alimentaires, Université Paul Cézanne (Marseille), **2006**.

[102] L. Shintu, F. Ziarelli, S. Caldarelli, *Magn. Reson. Chem.* **2004**, *42*, 396.

[103] L. Shintu, S. Caldarelli, *J. Agr. Food Chem.* **2005**, *53*, 4026.

[104] P. Weybright, K. Millis, N. Campbell, D. G. Cory, S. Singer, *Magn. Reson. Med.* **1998**, *39*, 337.

[105] A. Pampel, D. Michel, R. Reszka, *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *357*, 131.

[106] A. Pampel, J. Karger, D. Michel, *Chem. Phys. Lett.* **2003**, *379*, 555.

[107] H. C. Gaede, K. Gawrisch, *Biophys. J.* **2003**, *85*, 1734.

[108] H. A. Scheidt, A. Pampel, L. Nissler, R. Gebhardt, D. Huster, *BBA-Biomembranes* **2004**, *1663*, 97.

[109] G. E. Maciel, D. W. Sindorf, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7606.

[110] D. W. Sindorf, G. E. Maciel, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 1848.

[111] M. Pursch, L. C. Sander, K. Albert, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 733A.

[112] S. Bachmann, C. Hellriegel, J. Wegmann, H. Handel, K. Albert, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **2000**, *17*, 39.

[113] M. Coen, J. C. Lindon, C. Gavaghan, E. Holmes, J. K. Nicholson, E. Humpfer, I. D. Wilson, P. D. Stanley, *Analyst* **2001**, *126*, 548.

[114] M. Coen, I. D. Wilson, J. K. Nicholson, H. Tang, J. C. Lindon, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 3023.

[115] U. Skogsberg, H. Handel, D. Sanchez, K. Albert, *J. Chromatogr. A* **2004**, *1023*, 215.

[116] C. Hellriegel, U. Skogsberg, K. Albert, M. Lämmerhofer, N. M. Maier, W. Lindner, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3809.

[117] H. Händel, E. Gesele, K. Gottschall, K. Albert, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2003**, *42*, 438.

[118] H. R. Ansarian, M. Derakhshan, M. Mizanur Rahman, T. Sakurai, M. Takafuji, I. Taniguchi, H. Ihara, *Anal. Chim. Acta* **2005**, *547*, 179.

[119] M. Ilg, J. Maier-Rosenkranz, W. Mueller, E. Bayer, *J. Chromatogr.* **1990**, *517*, 263.

[120] E. Bayer, W. Mueller, M. Ilg, K. Albert, *Angew. Chem., Int. Edit.* **1989**, *101*, 1033.

[121] M. Ilg, J. Maier-Rosenkranz, W. Mueller, K. Albert, E. Bayer, D. Hoepfel, *J. Magn. Reson.* **1992**, *96*, 335.

[122] U. Tallarek, E. Baumeister, K. Albert, E. Bayer, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* **1995**, *696*, 1.

[123] E. Bayer, E. Baumeister, U. Tallarek, K. Albert, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* **1995**, *704*, 37.

[124] B. J. Boughtflower, I. M. Mutton, C. J. Paterson, D. G. Reid, A. L. Busza, A. P. Blackaby, *Analyst* **2004**, *129*, 124.

[125] E. Baumeister, U. Klose, K. Albert, E. Bayer, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* **1995**, *694*, 321.

[126] U. Tallarek, D. Van Dusschoten, H. Van As, E. Bayer, G. Guiochon, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 3486.

[127] U. Tallarek, D. Van Dusschoten, H. Van As, G. Guiochon, E. Bayer, *Angew. Chem. Int. Edit.* **1998**, *37*, 1882.

[128] U. Tallarek, F. J. Vergeldt, H. Van As, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 7654.

[129] A. I. Liapis, M. A. McCoy, *J. Chromatogr. A* **1992**, *599*, 87.

[130] U. Tallarek, E. Bayer, G. Guiochon, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1494.

[131] S. Viel, F. Ziarelli, S. Caldarelli, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 9696.

[132] E. Kucera, *J. Chromatogr.* **1965**, *19*, 237.

[133] E. J. Wilson, C. J. Geankoplis, *Ind. Eng. Chem. Fund.* **1966**, *5*, 9.

[134] C. R. Wilke, P. Chang, *Am. Inst. Chem. Eng. J.* **1955**, *1*, 264.

[135] L. R. Perkins, C. J. Geankoplis, *Chem. Eng. Sci.* **1969**, *24*, 1035.

[136] W. Hayduk, H. Laudie, *AIChe J.* **1974**, *20*, 611.

[137] K. Miyabe, G. Guiochon, *Fundamental interpretation of the peak profiles in linear RPLC, Vol. 40*, Marcel Dekker, New York, **2000**.

[138] K. Miyabe, S. Takeuchi, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2567.

[139] K. Miyabe, G. Guiochon, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1475.

[140] K. Miyabe, G. Guiochon, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3096.

[141] K. Miyabe, G. Guiochon, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 9202.

[142] K. Miyabe, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* **2002**, *961*, 23.

[143] K. Miyabe, G. Guiochon, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 2987.

[144] A. Tchapla, H. Colin, G. Guiochon, *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 621.

[145] A. Tchapla, S. Heron, H. Colin, G. Guiochon, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1443.

[146] K. Jinno, *J. High Resolut. Chrom. Chrom. Comm.* **1982**, *5*, 364.

[147] B. Shi, B. H. Davis, *J. Chromatogr. A* **1996**, *731*, 351.

[148] A. Valleix, S. Carrat, C. Caussignac, E. Leonce, A. Tchapla, *J. Chromatogr. A* **2006**, *1116*, 109.

[149] G. Pages, C. Delaurent, S. Caldarelli, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 561.

[150] L. Hong, A. Felinger, K. Kaczmarski, G. Guiochon, *Chem. Eng. Sci.* **2004**, *59*, 3399.

[151] T. Yoshida, *J. Biochem. Biophys. Methods* **2004**, *60*, 265.

[152] G. Pages, C. Delaurent, S. Caldarelli, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2006**, *45*, 5950.

[153] G. Pages, C. Delaurent, S. Caldarelli, *Anal. Chem.* **2006**, Submitted.

[154] L. R. Snyder, *Principles of adsorption chromatography*, Chromatographic science series ed., Marcel Dekker Inc., New-York, **1968**.

GLOSSAIRE

Anisotropie (d'une espèce) : si l'espèce ne répond pas à au moins un des deux critères d'isotropie.

Autodiffusion : mouvement aléatoire de déplacement des molécules dans des conditions d'équilibre thermodynamique.

Diffusion intraparticulaire : combinaison de la diffusion de surface et de la diffusion de pore.

Diffusion moléculaire : diffusion des analytes dans la phase éluante.

Diffusion de pore : diffusion moléculaire dans la solution stagnante qui remplit les pores des particules du support chromatographique.

Diffusion de surface : migration des molécules adsorbées à la surface de la phase stationnaire chromatographique. Ce processus se déroule dans le champ potentiel d'adsorption.

Isotropie (d'une espèce) : invariance de ses propriétés dans toutes les directions de l'espace. En RMN, l'espèce doit avoir des mouvements moléculaires rapides de réorientations et la même probabilité d'orientation des spins pour être considérée comme isotrope.

Porosité (totale d'une colonne) : fraction de volume total occupé par une phase liquide au volume de la colonne.

Séculaires (termes) : termes conduisant à un résultat non nul lors du calcul de perturbation au premier ou au deuxième ordre.

Shims : petites bobines qui permettent d'homogénéiser localement le champ magnétique. La variation de l'intensité du courant électrique fourni à chaque bobine permet de modifier le champ magnétique produit par chacune d'elles.

ABREVIATIONS

ACN :	Acétonitrile
ADC :	Apparent Diffusion Coefficient Coefficient de diffusion apparent
BPP-LED :	BiPolar Pulse Longitudinal Eddy current Delay Impulsions bipolaires et délai supprimant les courants de Foucault
CCM :	Chromatographie sur Couche Mince
CL :	Chromatographie Liquide
CLHP :	Chromatographie Liquide Haute Performance
CP :	Cross Polarisation Polarisation croisée
DOSY :	Diffusion Ordered SpectroscopY
HRMAS :	High Resolution Magic Angle Spinning Haute résolution avec rotation à l'angle magique
IRM :	Imagerie par Résonance Magnétique
MAS :	Magic Angle Spinning Rotation à l'angle magique
MeOH	Méthanol
NPLC :	Normal Phase Liquid Chromatography Chromatographie liquide en phase normale
NOESY :	Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
NOE:	Nuclear Overhauser Effect
tr-NOE:	Transfert de NOE
ODS :	Octadécylsylilé
PGSE :	Pulsed Gradient Spin Echo Echo de spin avec des impulsions de gradients
RF :	Radiofréquence
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
RPLC :	Reversed-Phase Liquid Chromatography Chromatographie liquide de partage à polarité de phase inversée
SE :	Spin écho
SPE :	Solid Phase Extraction Extraction en phase solide
STE :	Stimulated Echo Echo de spin stimulé
TF :	Transformée de Fourier

NOTATIONS

$A_n(\nu_m)$	Intensité du spectre RMN 1D de la nième espèce
A_{intra}	Quantité moyenne ne diffusant pas
$a(D)$	Distribution de masses des coefficients de diffusion
B_0	Champ magnétique statique
B_{eff}	Champ magnétique ressenti par le spin
$C(t)$	Fonction d'élution
$\hat{\hat{\mathrm{D}}}$	Matrice de rang deux
D	Coefficient d'(auto)diffusion
D_0	Facteur de fréquence
D_e	Diffusion intraparticulaire
D_m	Diffusion moléculaire
D_n	Diffusion de la nième espèce
D_{par}	Diffusion parallèle à l'axe des gradients
D_{per}	Diffusion perpendiculaire à l'axe des gradients
D_s	Diffusion de surface
D_{s0}	Facteur de fréquence de la diffusion de surface
D_p	Diffusion de pore
$Disp_a$	Dispersion axiale
$Disp_{app}$	Dispersion apparente
d	Déplacement moyen
d_p	Taille moyenne des particules
d_c	Diamètre interne de la colonne
E	Energie d'activation
E_h^s	Energie permettant la formation d'une lacune à la surface du support
E_j^s	Energie permettant le déplacement d'un soluté d'un site à l'autre de la surface du support
E_s	Energie d'activation de surface
f	Facteur de friction
g	Gradient de champ magnétique
$\widehat{H}$	Hamiltonien. L'indice identifie le type des interactions. z zeeman, D dipolaire, CS de déplacement chimique, J de couplage J et Q quadripolaire
$\overrightarrow{H_0}$	Champ magnétique uniforme
$\hbar$	Constante de Planck divisé par 2π
h_a	Hauteur réduite d'un plateau théorique axial
h_t	Hauteur réduite d'un plateau théorique radial
$\hat{\mathrm{I}}$	Vecteur opérateur
I	Intensité ou aire du pic étudié dans une expérience DOSY pour une valeur de g fixée

I_0	Intensité ou aire du pic étudié dans une expérience DOSY en absence de gradients
K	Constante d'équilibre d'adsorption
k	Facteur de tortuosité
k_B	Constante de Boltzmann
k_f	Coefficient de transfert de matière du fluide vers la phase
k_g	Facteur géométrique
l	Longueur de la colonne CLHP
$\overrightarrow{M}$	Aimantation
M_0	Amplitude de l'aimantation en absence de gradients
n	Ordre de cohérence quantique
Pe	Nombre de Peclet
$P(R,\Delta)$	Propagateur moyen
Q_{st}	Chaleur d'adsorption
q	Aire des gradients ou aire divisée par 2π
R	Déplacement du spin selon un axe pendant une durée
R	Constante des gaz parfait
R_h	Rayon hydrodynamique
r	Endroit où se situe un spin
r_0	Localisation du spin au moment initial
r_{ij}	Distance entre deux spins
r_p	Rayon moyen de la particule
S	Amplitude du signal
$\hat{\hat{\mathrm{S}}}$	Tenseur d'écran d'ordre 2
$\bar{s}$	Déplacement moyen d'une molécule
T	Température
T_1	Temps de relaxation spin-réseau
T_2	Temps de relaxation transversal
t	Temps
t_0	Début de la mesure
$\bar{u}$	Vitesse moyenne
u_0	Vitesse de la phase mobile
z	Axe d'application des gradients
α	Sélectivité en chromatographie
α_c	Facteur constant
β	Angle entre le champ magnétique et le système d'axe du tenseur
β_c	Facteur constant
γ	Rapport gyromagnétique
Δ	Durée de diffusion
Δ'	Temps de diffusion réduit
Δ_e	Temps d'échange
δ	Durée de l'impulsion de gradient
δ_D	Fonction de Dirac
δ_{film}	Epaisseur de la couche stagnante à la surface d'une particule
ε_0	Force d'adsorption du solvant
ε_c	Facteur correctif
ε_p	Porosité intraparticulaire
η	Viscosité dynamique

θ	Angle entre le champ magnétique et l'axe de rotation de l'échantillon
ϕ	Déphasage
χ	Susceptibilité magnétique
χ_v	Susceptibilité magnétique de volume
Λ	Hauteur de l'hélice
μ_0	Perméabilité de l'air
μ_p	Moyenne du rayon des particules
μ_1	Moment du premier ordre
$\mu_2^{'}$	Moment du second ordre
ρ_p	Densité
$\rho(r_0)$	Densité normalisée des positions initiales des spins
σ	Moyenne des déplacements des spins
σ_i	Déplacement chimique isotrope
σ_j	Ecart type
σ_p	Ecart type du rayon des particules
τ_c	Temps de corrélation rotationnel
τ_{intra}	Facteur de tortuosité intraparticulaire
υ	Fréquence en Hertz
Ω	Fonction
ω	Fréquence angulaire

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Comparaison des performances de la RMN, de la spectroscopie de neutrons polarisés et des traceurs radioactifs pour la mesure du coefficient d'autodiffusion. 20

Tableau 2 : Correspondance entre les *shims* HRMAS et ceux en RMN à l'état liquide lorsque le stator est dans le plan *xz* 38

Tableau 3 : Propriétés physico-chimiques des phases chromatographiques utilisées. 66

Tableau 4 : Ordre de grandeur des impulsions et des délais utilisés dans la séquence BPP-LED. 68

Tableau 5 : Influence du volume du rotor sur les ADC du mélange. 81

Tableau 6 : Temps de rétention des solutés de la série homologue aromatique. L'inerte utilisé est une solution de nitrate de potassium à 10^{-3} mol.L^{-1} dans l'eau. S.O. = Sans Objet. 95

Tableau 7 : Résumé des différentes grandeurs mesurées à partir des droites de régression du graphe $\ln ADC = f\left(\frac{1000}{T}\right)$ pour la série homologue aromatique avec deux compositions de phase liquide. 98

Tableau 8 : Résumé des différentes grandeurs mesurées à partir des droites de régression du graphe $\ln ADC = f\left(\frac{1000}{T}\right)$ pour la série homologue des cétones avec deux compositions de phase liquide. 98

Tableau 9 : Energies d'activation (kJ.mol^{-1}) pour les solutés aux deux différentes compositions étudiées. 99

Tableau 10 : Valeurs moyennes des temps de rétention (tr) des analytes aromatiques sur la colonne de silice à différents débits avec une phase mobile ACN/Eau, 90/10, v/v. La sélectivité est calculée en utilisant le temps d'élution de l'anthracène comme inerte. 106

Tableau 11 : Comparaison des rapports des ADC pour la série aromatique en absence de phase stationnaire, puis avec des supports non poreux, greffés ou vierges, et de diamètre de pores 100Å, pour deux compositions de phase liquide constituée d'ACN et d'un mélange d'ACN/eau, 90/10, v/v. 109

Tableau 12 : Rapport des ADC des solvants entre la présence et l'absence de phase chromatographique pour les trois supports. 112

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Séquence d'impulsions de l'écho de spin et représentation de l'aimantation sous la forme de ruban comme décrite par Johnson [12]. 24

Figure 2 : Séquence de l'écho stimulé d'après Tanner [29]. 25

Figure 3 : Séquence combinant des impulsions de gradients sinusoïdaux bipolaires avec un délai avant l'enregistrement du signal et deux impulsions de gradient pour favoriser la suppression des courants de Foucault. Séquence BPP-LED [32]. 27

Figure 4 : Représentation d'un rotor à l'angle magique (MAS) sur le plan xz lorsque le champ magnétique statique est aligné sur l'axe z. 35

Figure 5 : Spectre RMN d'un mélange de 3,5-dichlorophénol, n-heptane et d'éthanol (a) en RMN liquide, puis en présence de silice (b) avec une sonde RMN liquide et (c) en ^{1}H HRMAS RMN. Le pic large du spectre (c) est du aux silanols non mobile de la phase stationnaire. 39

Figure 6 : Gradients ressenties par les spins lorsque (a) la bobine de gradient et l'échantillon sont parallèles à l'axe z, (b) l'échantillon est en rotation à l'angle magique et la bobine de gradient est parallèle à l'axe z et (c) la bobine et l'échantillon sont orientés à l'angle magique. 40

Figure 7 : Spectres RMN CP/MAS des noyaux ^{29}Si et ^{13}C d'une phase greffée par un éther de cholestérol (travail interne au laboratoire, non publié). 45

Figure 8 : Cartes DOSY d'un mélange naphtalène, éthanol et dec-1-ène (a) sans phase chromatographique et (b) en présence d'une phase greffée ODS..... 55

Figure 9 : Schéma d'un rotor. 65

Figure 10 : Exemple de représentation de la droite $\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = f\left(g^2\right)$ obtenu à partir du pic de la butanone dans un mélange de solvant deutérié ACN/Eau, 90/10, v/v. Les points représentent les valeurs expérimentales et la droite est obtenue à partir de la meilleure

régression mono-exponentielle (en n'estimant la présence d'une seule diffusion dans la décroissance). 69

Figure 11 : Formalisme utilisé dans le présent manuscrit pour les représentations DOSY. Sur la Figure, quatre molécules sont contenues dans le mélange. 70

Figure 12 : Influence du volume de liquide sur la résolution dans la dimension de la diffusion. Mélange de naphtalène, dec-1-ène et d'éthanol dans de l'éthanol-d6 (a) sans phase stationnaire, en présence de support ODS et de (b) 5 µL, (c) 10 µL, (d) 15 µL, (e) 20 µL et (f) 25 µL de liquide. 75

Figure 13 : Influence de la durée de préparation sur la mesure de l'ADC des solutés de la série homologue aromatique en présence de la phase stationnaire ODS. (a) avec de l'ACN et (b) avec un mélange ACN/Eau, 80/20, v/v. Les valeurs des ADC du benzène se réfèrent à l'échelle de gauche et ceux du naphtalène à celle de droite. 76

Figure 14 : Etude de la variation de l'ADC du benzène en fonction de sa concentration dans un mélange deutérié d'ACN/Eau, 80/20, v/v avec un support poreux ODS. 76

Figure 15 : Mesures des ADC du benzène et du naphtalène dans le cyclohexane à 90,0 ou 9,0 $g.L^{-1}$ sur de la silice de diamètre moyen de pores de 100 et 300Å. 77

Figure 16 : Influence de l'isotope du solvant sur l'ADC des solutés. Trois compositions de solvants ont été étudiées. L'échelle de l'ADC est logarithmique. 78

Figure 17 : Influence de la vitesse de rotation sur l'ADC mesuré en présence de phase chromatographique. Le mélange étudié est composé de la série homologue aromatique dans un solvant ACN/Eau, 80/20, v/v. 80

Figure 18 : Spectre RMN ^{1}H HRMAS de la phase chromatographique ODS poreuse et des solutés de la série homologue aromatique dissout dans de l'ACN. 83

Figure 19 : Décroissance du signal RMN de la phase stationnaire en fonction de l'aire des gradients en présence d'un mélange composé d'ACN/Eau, 90/10, v/v. La décroissance est multi-exponentielle. 84

Figure 20 : ADC des chaines greffées en fonction de la teneur en modifiant organique. (a) partie la plus mobile, (b) faibles coefficients de diffusion et (c) représente le pourcentage de la composante rapide de l'ADC dans la décroissance. 86

Figure 21 : ADC des chaines greffées en fonction de la teneur en MeOH. (a) partie la plus mobile, (b) faibles coefficients de diffusion et (c) représente le pourcentage de la composante rapide de l'ADC dans la décroissance..... 87

Figure 22 : Comparaison des spectres ^{1}H d'un mélange équivolumique des trois cétones dans de l'ACN (a) sans support et (b) en présence de phase chromatographique..... 89

Figure 23 : Carte 2D ^{1}H DOSY pour la série aromatique dissoute dans l'ACN. (a) en absence de phase stationnaire et (b) en présence du support ODS poreux. 90

Figure 24 : Carte 2D ^{1}H DOSY pour la série aromatique dans un mélange de solvants composé de 80/20, ACN/eau, v/v. (a) en absence de phase stationnaire et (b) en présence du support ODS poreux. 90

Figure 25 : Carte 2D ^{1}H DOSY des cétones dans de l'ACN-d3 (a) en absence de support et (b) avec la phase stationnaire ODS. Chaque cétone est étudiée séparément puis les cartes 2D sont superposées. 91

Figure 26 : Variation de l'ADC des solutés en fonction de la composition de la phase liquide, en absence de phase chromatographique. (a) avec la série des aromatique et (b) avec celle des cétones. 92

Figure 27 : Evolution des ADC en fonction de la composition du solvant en présence de la phase ODS poreuse (a) avec la série aromatique et (b) avec les cétones. Pour les composés cycliques, l'échelle de gauche se reporte au benzène et celle de droite aux deux autres solutés aromatiques. 93

Figure 28 : « Chromatogramme RMN » à deux compositions différentes de solvant avec une phase stationnaire ODS poreuse pour (a) la série homologue aromatique et (b) la série des cétones. L'axe des abscisses est en échelle logarithmique, l'axe vertical a été fixé au même niveau pour tous les solutés. 94

Figure 29 : Variation du logarithme de l'ADC en fonction de l'inverse de la température pour les analytes de la série homologue aromatiques en présence de phase chromatographique ODS avec des compositions de 100/0 et 80/20, ACN/Eau, v/v. 96

Figure 30 : Variation du logarithme de l'ADC en fonction de l'inverse de la température pour les analytes de la série homologue des cétones avec des compositions de 80/20 et 60/40, ACN-d3/D_2O, v/v. Expériences réalisées avec la phase ODS de diamètre moyen de pores de 100 Å 97

Figure 31 : Distance parcourue par les solutés en fonction du temps de diffusion lorsque le solvant est de l'ACN en présence de la phase greffée poreuse. (a) benzène et (b) naphtalène. 100

Figure 32 : Distance parcourue par les solutés en fonction du temps de diffusion lorsque le la phase liquide est un mélange ACN/eau, 90/10, v/v et la phase non poreuse et greffée. (a) benzène et (b) naphtalène. 100

Figure 33 : Carte 1H DOSY de la série homologue des aromatiques pour une phase liquide composée d'ACN/Eau, 90/10, v/v en présence de (a) phase greffée ODS et (b) de phase vierge. 103

Figure 34 : Carte 1H DOSY de la série homologue des aromatiques avec une phase liquide composée d'ACN/Eau, 90/10, v/v en présence de (a) phase ODS, (b) phase ODS post-greffée et (b) phase vierge. 103

Figure 35 : Comparaison des ADC sur les supports non poreux et de diamètre moyen de pores de100Å (a) lorsque l'ACN est le solvant et (b) pour une phase liquide constituée d'ACN/Eau, 90/10, v/v..... 104

Figure 36 : Séparation chromatographique de la série homologue des aromatiques sur (a) une phase ODS et (b) une silice vierge. Phase mobile ACN/eau, 90/10, v/v. Débit 1,0 $mL.min^{-1}$, détection 254 nm. 105

Figure 37 : Comparaison de la diffusion des solutés aromatiques dans de l'ACN-d3 (a) sans phase, (b) en présence de la phase non poreuse ODS et (c) en présence du support de diamètre moyen de pores de 100Å. 107

Figure 38 : Comparaison de la diffusion des solutés aromatiques dans de l'ACN-d3 (a) sans phase, (b) en présence de phase non poreuse vierge et (c) en présence du support de diamètre moyen de pores de 100Å. 107

Figure 39 : Comparaison de la mobilité des greffons pour une phase de diamètre de pore moyen 100Å ou non poreuse avec une composition du mélange liquide de (a) ACN/Eau, 90/10, v/v et (b) ACN/Eau, 75/25, v/v. Les points et courbes en noir représentent le support non poreux, et en gris ceux obtenus avec un support poreux. 110

Figure 40 : ADC des solvants mesuré en présence des silices de différents diamètres de pores. 111

Figure 41 : ADC des solutés aromatiques sur les silices de 100 et 300Å avec 3 mélanges ACN/eau de compositions différentes et le cyclohexane comme solvant ; (a) pour le benzène, (b) pour le naphtalène et (c) pour l'anthracène. 113

Figure 42 : Décroissances obtenues sur le pic des aromatiques pour un mélange de phénylalanine et d'éthanol dans l'eau deutérié en fonction de l'insert employé. 116

Résumé :

L'utilisation de gradients de champ magnétiques (PFG) en résonance magnétique nucléaire (RMN) permet de déterminer des coefficients de diffusion apparents (ADC). L'ajout d'une phase stationnaire est à l'origine d'un ralentissement sélectif des solutés. L'addition de ce support solide implique la mise en rotation à l'angle magique (MAS) de l'échantillon pour moyenner à zéro les interactions anisotropes. Cette méthode que nous avons appelée : RMN Chromatographique, nous a permis d'appréhender différentes interactions se produisant à proximité du support stationnaire.
Après la présentation des techniques RMN utilisées (PFG et MAS), nous avons détaillé deux méthodes permettant d'investiguer les phénomènes chromatographiques. Nous avons montré l'influence d'un certains nombres de paramètres sur l'ADC en présence d'une phase stationnaire et nous avons comparé les résultats avec ceux issus de la CLHP. Enfin, les limites et les perspectives de cette méthode ont été abordées.

Mots-clefs :

résonance magnétique nucléaire (RMN) ; chromatographie ; chromatographie liquide haute performance (CLHP) ; RMN Chromatographique ; rotation à l'angle magique (MAS) ; HRMAS ; écho de spin de gradient de champ magnétique (PGSE) ; coefficient de diffusion apparent (ADC)

Abstract:

Apparent diffusion coefficients (ADCs) can be measured by nuclear magnetic resonance (NMR) using pulsed field gradient (PFG). The addition of a chromatographic stationary phase allows decreasing selectively the solutes ADC. The sample spins at the magic angle (MAS) to average at zero the anisotropic interactions due to the sample heterogeneity. This method, that we named Chromatographic NMR, was used to apprehend the interactions near the solid phase.
After the presentation of both NMR techniques (PFG and MAS), we described two methods developed to investigate the chromatographic process. In this manuscript, we showed the influence of some parameters on the ADCs measured in presence of a chromatographic stationary phase inside the rotor. These results were compared to the data obtained in HPLC. Finally, the limits and the perspectives of the method were apprehended.

Keywords:

nuclear magnetic resonance (NMR); chromatography; high performance liquid chromatography (HPLC); Chromatographic NMR; magic angle spinning (MAS); HRMAS; pulsed gradient spin echo (PGSE); apparent diffusion coefficient (ADC)