*R*EPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE TISSEMSILT

Faculté des sciences et technologies

Polycopie de cours

Techniques d'Analyse Physico-chimique I

Domaine : Science de la matière

Filière : Chimie

Département : Science de la matière

Spécialité : Chimie des matériaux

Niveau : 2ème année

Préparé par :

Dr. Belhocine Mohamed

Préface

Le présent polycopié est destiné aux étudiants de 2ème licence Chimie des matériaux. Son programme regroupe les différentes méthodes de séparation les plus utilisées pour purifier et séparer les matériaux.

Ce polycopié est le résultat des enseignements que j'ai effectué dans le module Techniques d'Analyse Physico-chimique I pour le niveau L2, Chimie des matériaux.

Les cours sont présentés de façon simplifiée, plusieurs exemples des figures et tableaux sont donnés pour faciliter la compréhension.

Ce polycopié est structuré en cinq chapitres comme suit :

Au chapitre I, nous avons présenté dans la première partie, la définition de la matière, de ses formes trouvées dans la nature et les différents types de mélanges.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous présentons des généralisations sur les méthodes de séparation, et nous décrivons quelque méthodes utilisés pour la séparation des constituants d'un mélange hétérogène, permet ces méthodes nous avons cité : la décantation, la centrifugation et la filtration.

Le deuxième chapitre décrit certaines méthodes utilisées pour séparer les constituants d'un mélange homogène, basant sur les caractéristiques physiques ou chimiques. Dans ce chapitre, on va discuter la séparation par rupture de phase (mélange liquide).

Le troisième chapitre est consacré à l'extraction d'une substance contenant dans un solvant par un solvant non miscible.

Le quatrième chapitre est consacré à la technique de distillation, qui est utilisée pour séparer des constituants d'un mélange homogènes par l'utilisation d'une méthode repose sur le changement d'état de l'un des constituants.

Dans le cinquième chapitre, nous étudions les méthodes chromatographiques. Nous avons commencé par des définitions et généralités sur les méthodes chromatographiques et ensuite nous avons présentés une étude théorique de quelques méthodes chromatographiques tels que la CCM, HPLC, CPG…….

Dans le dernier chapitre, nous présentons la technique de L'électrophorèse.

Une série d'exercices d'application est donnée à la fin de ce manuscrit.

Table de matière :

Chapitre I : Généralités sur les méthodes de séparations……6

- Introduction……..……..7
- La matière……..……...7
- Les corps purs……..…….8
- Définition et type de mélange…….……..8
- Généralités sur les méthodes de séparation……10
- Principe de la séparation……10
- La décantation……11
- La filtration…….…….13
- La Centrifugation……..…17

Chapitre II : Séparation par rupture de phase…….21

- Introduction ……..…22
- Définition ……..…22
- Principe……...…22
- Elimination du solvant……. 22
- Précipitation……..…….24

Chapitre III : Extraction par un solvant non miscible……26

- Introduction ……..…..27
- Extraction liquide-liquide……....27
- Principe d'extraction liquide-liquide……...28
- Le choix de solvant……....28
- Coefficient de partage K…….……30
- Coefficient de partage relatif……..….31
- Taux de distribution D……....32
- Rendement d'extraction R……..…….32

- Récupération du soluté……..…….35

Chapitre IV: Séparation par changement d'état……36

- Introduction……..….37
- Principe……37
- La distillation……..…37
- Distillation simple……...…38
- Distillation fractionnée……..….38
- Sublimation…….……....39
- La lyophilisation……..40

Chapitre V : Méthode chromatographiques……42

- Définition……....43
- Historique……...43
- Classification des techniques chromatographiques……...….43
- Terminologie……..44
- Applications de la chromatographie……...…44
- Présentation des méthodes chromatographiques……..….44
- La Chromatographie sur couche mince (CCM)……....45
- La Chromatographie sur colonne……..…50
- La Chromatographie d'adsorption……54
- La Chromatographie d'échange d'ions…….56
- La Chromatographie de partage……....61
- La chromatographie liquide haute performance (HPLC)…….……64
- La Chromatographie en phase gazeuse (CPG)……..67
- Etude théorique de la chromatographie……..74

Chapitre VI : L'électrophorèse……83

- Introduction……...…..… 84
- Description…… 84

- Principes de fonctionnement……...… 84
- Principes de la migration électrophorétique…….85
- Les différents types d'électrophorèses…….....86
- L'électrophorèse libre, en veine liquide……..….87
- L'électrophorèse sur support ou électrophorèse de zones……...….87
- Électrophorèse sur papier et sur acétate de cellulose……...….88
- Électrophorèse sur gel de polyacrylamide……...….89
- Electrophorèse capillaire (CE)……...…..96

Série d'exercices…….…97

Références bibliographiques……..…..105

Chapitre I : Généralités sur les méthodes de séparation

1. Introduction

Les substances les plus courantes dans la nature sont des mélanges. L'eau salée, par exemple, est un mélange d'eau et de sel tandis que l'air est un mélange de divers gaz. Il arrive très souvent qu'une substance doive être purifiée avant d'être utilisée. Ainsi, l'eau de mer n'est pas potable mais l'eau distillée est potable. La séparation de divers mélanges fait appel à des techniques de purification/séparation variées. Cela nous procure donc l'occasion d'étudier les différentes techniques de séparation.

Ainsi, avant de discuter les méthodes de séparation, nous devons définir quelles terminologies concertantes la matière, leur forme qui existe dans la nature et les différents types des mélanges.

2. La matière

Tout l'univers qui nous entoure est formé de matière. La matière désigne toute substance qui occupe un volume et présente une masse. Elle est constituée d'une combinaison d'éléments.

Exemple :

Le mercure, le cuivre, le soufre, le sel, le fer……

Elle se présente sous différentes formes ou états : solide, liquide et gazeux. Les changements d'états de la matière sont des transformations physique de la matière en fonctionne la température et de pression à la pression à la quelle cette matière est soumise. La Figure I.1 illustre les différents changements d'état possibles:

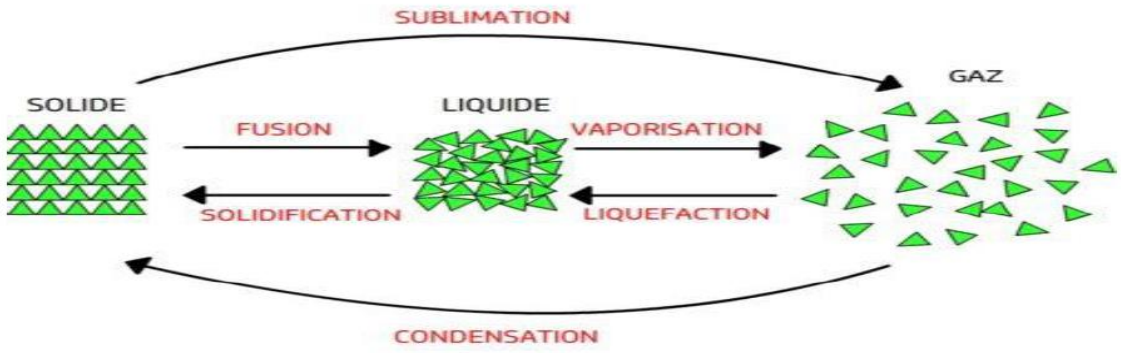


Figure I.1 : Les différents changements d'état de la matière possibles.

Voici les définitions correspondantes:

- **Fusion** : passage de l'état solide à l'état liquide.
- **Vaporisation** : passage de l'état liquide à l'état gazeux.
- **Liquéfaction** : passage de l'état gazeux à l'état liquide.
- **Solidification** : passage de l'état liquide à l'état solide.

- **Sublimation** : passage de l'état solide à l'état gazeux.
- **Condensation** : passage de l'état gazeux à l'état condensé (solide ou liquide).

3. Les corps purs

Un corps pur est un corps qui n'est constitué que d'un seul type de substance. Il possède des propriétés caractéristiques, bien définies et invariables.

Exemple :

Le fer, l'eau distillée, le chlorure de sodium.

4. Définition et type de mélange

Un mélange est une association de deux ou plusieurs substances. Les propriétés de n'importe quel mélange dépendent des substances qui le composent. On distingue 2 types de mélange : le mélange homogène et le mélange hétérogène (figure I.2).

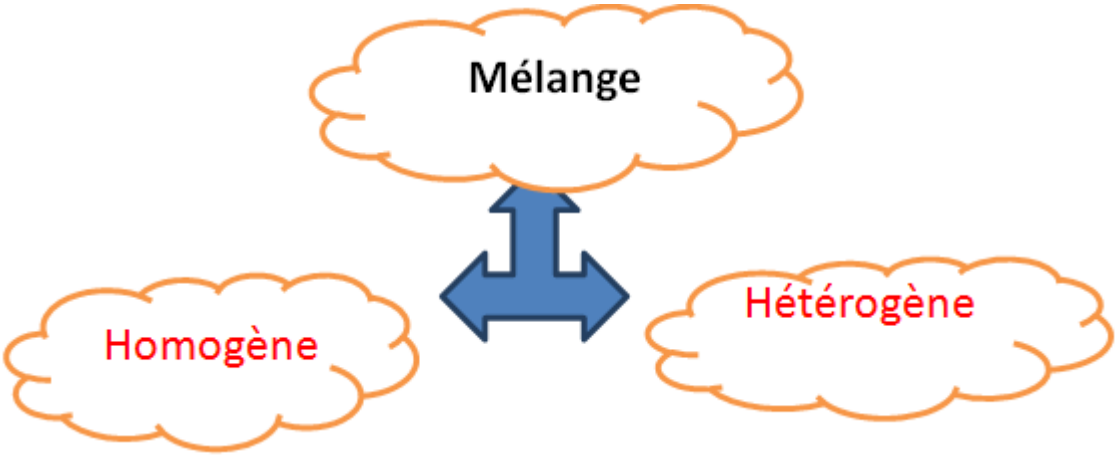


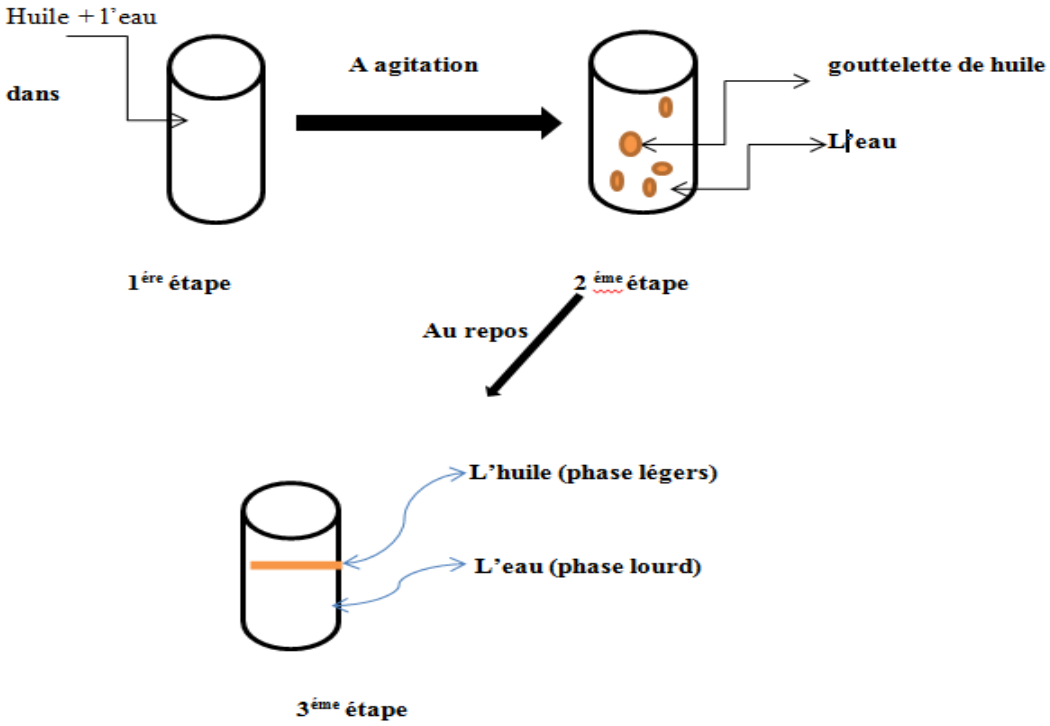
Figure I.2 : Les différents types de mélange.

a) Mélange hétérogène :

C'est un mélange dans lequel deux ou plusieurs phases sont visible, ces caractéristiques sont :

*On peut distinguer les phases par l'œil vu.
*Les substances reportent d'une manière non uniforme.
*Les propriétés ne sont pas identiques au tout point de mélange.

Exemple :
Si on mélange l'eau avec l'huile ⟶ va donner un mélange hétérogène (2 phases).



b) Mélange homogène :

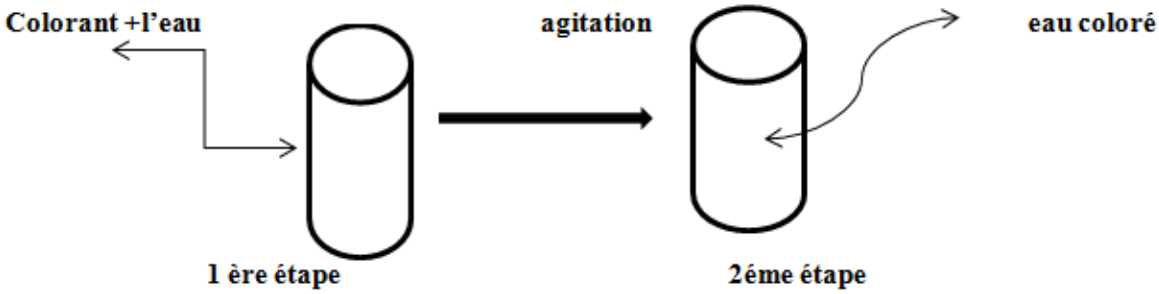
C'est le contraire d'un mélange hétérogène c.à.d. on ne peut pas distinguer les différentes substances qui constitue le mélange à l'œil nu. Citons quelques caractéristiques :

1-On observe une seule phase dans le mélange.

2-Puisque les particules sont répartit d'une manière uniforme, donc les propriétés sont identiques en tout point de phase.

Exemple:

Si on mélange l'eau avec un colorant ⟹ une seule phase colorée



Remarque :

Après le repos on distingue une seule phase coloré.

5. Généralités sur les méthodes de séparation

Les techniques de séparation des mélanges servant à isolés ou séparés certains constituants des mélanges dans lesquels ils se trouvent. Il y a plusieurs méthodes de séparations utilisées (voir figure I.3) pour séparer les constituants du mélange. Le choix de la méthode ou bien la technique se fait selon la nature des mélanges (homogène ou hétérogène) et au nature des substances qui constitue le mélange.

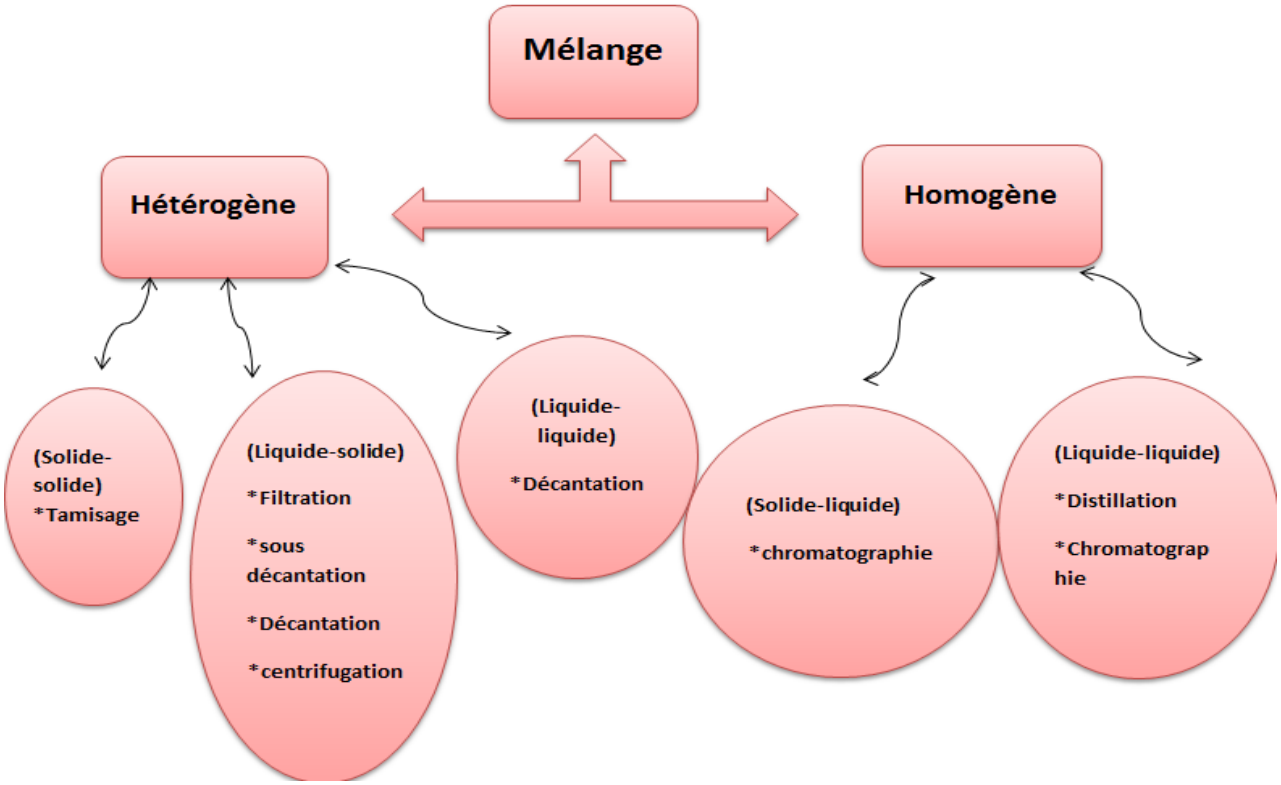


Figure 1.3 : Les différentes méthodes de séparations de mélange.

5.1. Principe de la séparation

Pour séparer les différents composants d'un mélange, on utilise les différences de propriétés physico-chimiques entre le composé intéressant et le reste du mélange. Plus la différence de propriétés est grande et plus la séparation sera facile. On peut séparer les composés chimiques grâce aux différences :

- de points de fusion,
- de points d'ébullition,
- de solubilités dans un solvant choisi,
- et de masses ou même de masses volumiques.

La séparation sera dite physique puisqu'on travaille sur les propriétés physiques.

On peut également séparer les composés par leurs différentes affinités chimiques avec un réactif (la chromatographie). La séparation est cette fois dite chimique.

La **décantation**, la **centrifugation** et la **filtration** sont des techniques de séparation des mélanges hétérogènes. Elles permettent de séparer les particules solides du liquide auquel elles sont mélangées. Elle s'obtient en laissant reposer le mélange.

5.2. La décantation

C'est une méthode de séparation d'un mélange hétérogène qui consiste à laisser au repos ce mélange (liquide-liquide non miscible) ou bien (solide-liquide) à fin que les différents constituants se séparent.

- **1er cas : Mélange liquide-liquide non miscible**

La décantation est un procédé qui permet de séparer des liquides non-miscibles et des masses volumiques différentes. Le mélange à séparer est introduit dans une ampoule à décanter (voir la figure I.4). Après le repos, le liquide le moins dense se flotte et le reste c.à.d. le plus dense (lourd) se dirige vers le bas. Le liquide inférieur peut être récupéré en ouvrant le robinet.

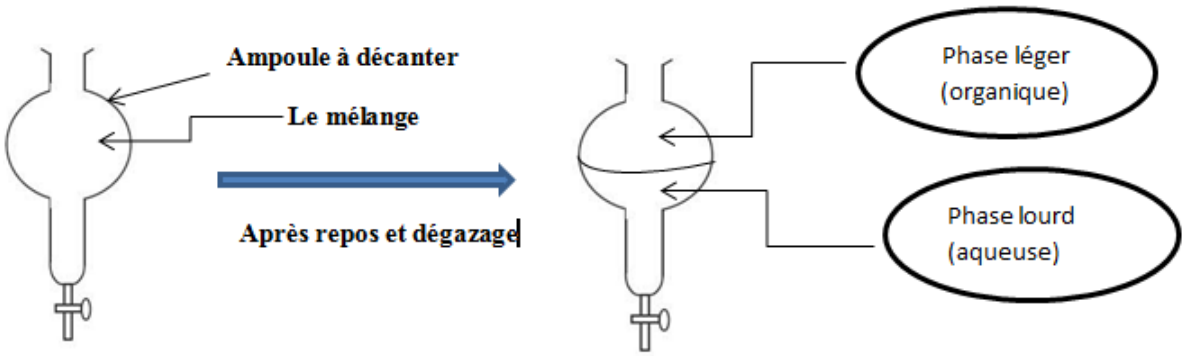
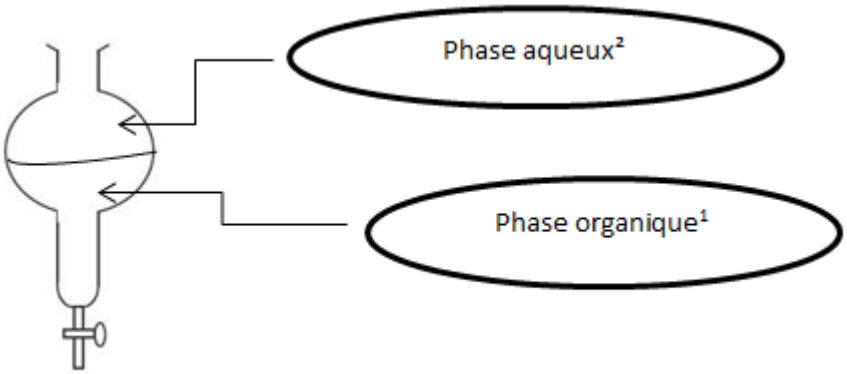


Figure I.4 : La décantation d'un mélange hétérogène liquide-liquide non miscible.

Remarque:

Dans le cas où la densité de la phase organique est plus importante que celle de l'eau, la séparation devient comme ça :



- **2eme cas : le Mélange solide-liquide**

La décantation sépare les particules solides qui se trouvent dans un mélange hétérogène. Le principe est le même que le précèdent, mais au lieu d'utiliser ampoule à décanter on utilise un récipient ou bien une éprouvette. Le solide s'accumule en bas (sédiment) et le liquide reste en haut comme l'indique la figure I.5. La séparation obtenue est parfois partielle et elle ne permette pas d'obtenir un liquide limpide.

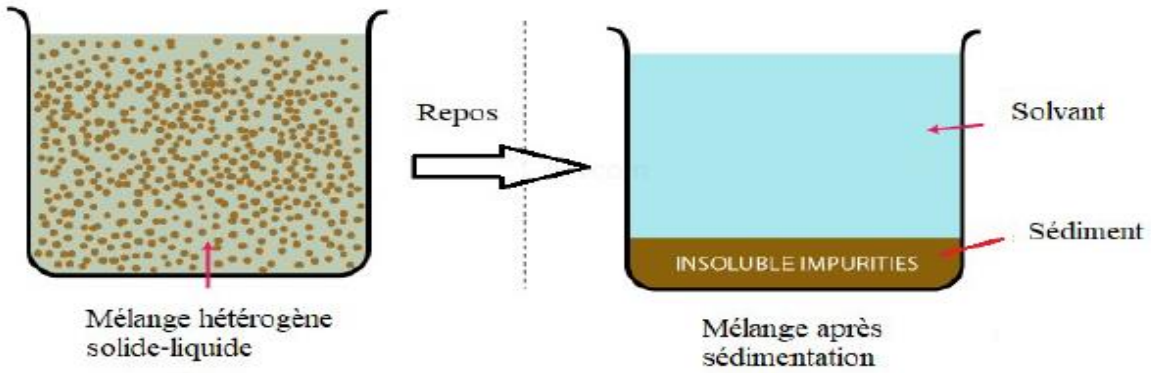


Figure I.5 : Principe de décantation solide-liquide.

La Vitesse de décantation

Lorsque on met une particule solide de rayon (r) dans un liquide de viscosité $\boldsymbol{\mu}$ (viscosité dynamique), on aura 3 forces qui s'intervenant, tels que :

$\vec{P}$ **:** poids de particule.

$\vec{\Pi}$**:** poussé d'Archimède.

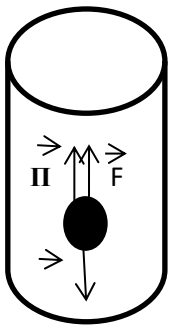
$\vec{F}$**:** force de frottement.

La figure suivante représente ces 3 forces intervient:

$$\vec{p} = m\,(particule) \times g\,(gravité) = \rho_p \times V_p \times g$$

$$\vec{\Pi} = \rho\,(liquide) \times V\,(particule) \times g$$

$$\vec{F} = 6\pi\mu r \times V$$



Avec :

ρ :masse volumique de particule **μ**: viscosité dynamique de liquide **V**: vitesse de décantation $\mathbf{V_p}$:volume de particule **r**: rayon de particule

À l'équilibre : $\sum \vec{F} = 0$ $\vec{P} = \vec{F} + \vec{k}$

Et l'expression de la vitesse est donnée par la relation suivante :

$$V = \frac{2.r^2.g.(\vartheta p - \vartheta l)}{9\mu}$$

Remarque: La particule à une forme sphérique.

En conséquence, la vitesse de sédimentation augmente avec la différence de masse volumique particule-fluide ρ_S-ρ_L, et elle diminue lorsque la viscosité du milieu augmente, ou le diamètre des particules diminue. Les particules de plus gros diamètre sédimentent plus rapidement que les particules de petit diamètre. Donc, les facteurs clefs de la sédimentation sont la différence de masse volumique entre le solide et le liquide, la taille des particules et la viscosité du fluide. Pour des particules de quelques microns, la vitesse de sédimentation devient trop faible.

5.3. La filtration

5.3.1. Définition

C'est une méthode de séparation de deux phases (solide-liquide) par passage à travers un élément poreux qui s'appelle le filtre, ce dernier retient la phase solide et laisse s'écouler le liquide.

5.3.2. Principe de filtration

La filtration est une séparation selon le diamètre des particules solides de différentes tailles, qui sont dispersées dans un liquide. La différence de pression force le liquide à passer à travers le filtre alors que les particules solides restent à la surface.

Exemple : la filtration d'une suspension de sable dans l'eau (Figure I.6)

Figure I.6 : La filtration d'une suspension de sable dans l'eau.

5.3.3. Quelques définitions des principaux thermes liés à la filtration:

- Suspension : solution contenant le mélange (liquide-liquide) qui alimente l'unité de filtration.
- Filtrat : solution contenant le liquide sans les particules solides.
- Gâteau: c'est le solide retenu par le filtre.
- Colmatage: se dit d'un filtre lorsque les particules solides s'accumulent dans les ports de filtre conduisant à un faible début de filtration.
- Porosité: c'est le vide de la substance par rapport à son volume entier.

5.3.4.Matériel de filtration:

Le matériel de filtration regroupe les filtres et les entonnoirs.

a) Les filtres

Il existe deux types de filtre, les filtres d'épaisseur et les filtres membranes. L'utilisation de l'un de ces deux types dépend du but de l'expérience, de la qualité et la quantité du matériel à filtrer. Les filtres doivent être inerte chimiquement et physiquement vis-à-vis du liquide à filtrer; insolubles et ne subissent aucun changement d'état physique (gonflement, rétrécissement, distorsion).

a.1. Les filtres d'épaisseur (épais ou en profondeur)

Ils retiennent les particules dans un réseau de fibres (papier, amiante, cellulose, coton, fibre de verre, etc.) ou de canalicules (verre fritté, sable, charbon, etc.). L'efficacité d'un filtre en profondeur augmente avec son épaisseur par contre elle diminue lorsque la pression appliquée sur le filtre augmente.

Les matériaux utilisés dans les filtres d'épaisseur sont:

- **Les papiers filtres classiques**
- **Les textiles**: gaze, coton, laine.
- **Les fibres**: laine de verre, amiante.
- **Les terres d'infusoires**, argiles et porcelaine
- **Le matériel fritté**: le verre fritté est obtenu par compression à température contrôlée de microbilles de verre. Des porosités différentes sont obtenues selon le diamètre de ces grains et la température de frittage. Les porosités sont codées de 0 (larges pores) à 4 (pores étroits).

a.2. Les filtres membranes (écrans ou de surface)

Les plus utilisés sont les membranes millipores (Figure I. 7). Ils sont constitués d'une fine lame plastique percée de pores calibrés. Les membranes filtrantes sont constituées de cellulose, d'acétate de cellulose, de

nitrate de cellulose ou de téflon. Le diamètre des pores est faible, et varie de 5 à 35 nm pour l'ultrafiltration et de 0.1 à 8 µm pour la microfiltration.

Les membranes de la microfiltration permettent une filtration rapide, malgré le faible diamètre des pores, cela est dû à leur faible épaisseur et à la forte densité des pores (10^{10} pores/cm^2). Ces membranes ne sont constituées que par 15 à 35% de leur volume par de la matière, le reste étant occupé par des pores.

Figure I.7 : La membrane millipore.

b) Les entonnoirs

Ce sont des instruments en forme de cône, terminés par un tube et destinés à recevoir un matériel filtrant. Deux types d'entonnoirs sont distingués:

- **Les entonnoirs ordinaires**: peuvent être en verre, en porcelaine ou en polycarbonate (figure I. 8).

Figure I.8. L'entonnoir ordinaire.

- **Les entonnoirs spéciaux**: Sont des entonnoirs dont la partie plate est perforée et sur laquelle on place de papier filtre (figure I. 9). Ils peuvent être en verre ou en porcelaine.

a) b)

Figure I.9. Entonnoirs de BUCHNER (a) et de HIRSCH (b).

5.3.5. Les techniques de filtration :

Il y a deux techniques de filtration au niveau de laboratoire.

a) Filtration sous pression normale :

Le mélange est soumis uniquement à la pression atmosphérique. Le liquide passe à travers le support filtrant (Figure I.10), tandis que le solide est récupéré sur le support filtrant.

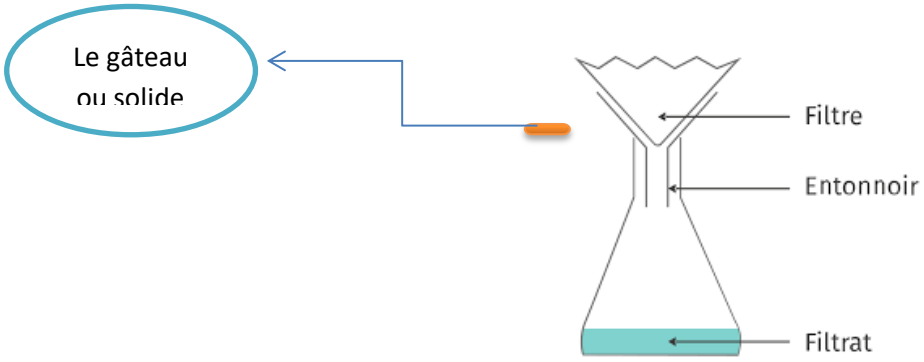


Figure I.10 : montage d'une filtration à pression normale (atmosphérique).

- La filtration gravimétrique présente les inconvénients suivants:
- La filtration est lente.
- La difficulté de récupération de la phase solide isolée, surtout lorsqu'elle est peu abondante.
- La séparation est incomplète: le solide retient une quantité non négligeable de liquide.

b) Filtration sous vide :

Dans ce cas, la filtration se réalise sur un Buchner qui est placées sur une fiole à vide. Cette dernière est reliée directement à une pompe sous vide (voir figure I.11).

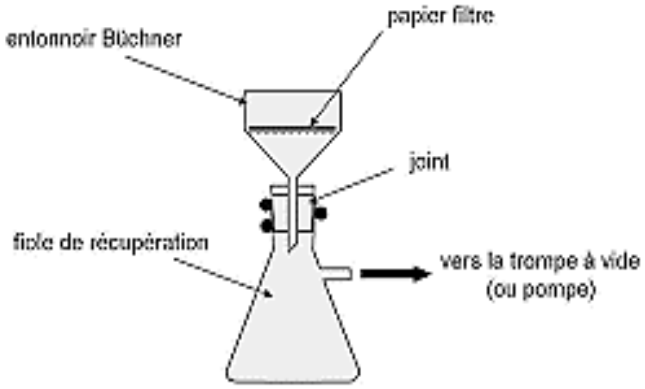


Figure I.11 : Montage d'une filtration sous vide.

5.3.6.La vitesse de filtration :

Le début de filtration Q d'un liquide à travers d'un filtre de surface S est directement proportionnel à la vitesse de filtration V.

$$Q=S\times V$$

5.3.7. Applications de filtration

- Chimie (exemple: gravimétrie)
- Pharmacie (ex: préparations de solutions stériles, échantillons analytiques, la préfiltration de solutions chargées ou pour la préparation de molécules complexes particulièrement pures et fonctionnelles.)
- Biotechnologies (préparation de milieux de cultures, purification et extractionde matériel génétique, cellulaire...)
- Industrie agro-alimentaire (stabilisation, clarification, extraction ou concentration de produits)
- Traitement des eaux (potable, purifiée, stérile, usée

5.4. La Centrifugation

5.1. Introduction

Lorsque la décantation des particules sous l'effort du champ de la pesanteur (la gravité) est lente, on utilise une autre méthode de séparation plus rapide qui est la centrifugation. La centrifugation permet de remplacer l'accélération de la pesanteur (g) par une accélération centrifuge développée par un rotor tournant à grande vitesse (6 à 10000 tours par minute).

5.2. Définition

La centrifugation est une technique qui permet la séparation des composés d'un mélange en fonction de leur densité sous l'action d'une force centrifuge. Elle permet de récupérer un précipité (culot) et un surnageant. Le mélange à séparer peut être constitué de deux phases liquides ou de particules solides en suspension dans un liquide.

5.3. Description de l'appareil :

La centrifugeuse est une appareille équipé d'un axe de rotation (plus la rotation est rapide, plus la centrifugation est efficace), une enceinte et un rotor avec des tubes contenant des échantillons (figure I.12). Elle permet de récupérer un précipité (culot) et un surnageant. Le mélange à séparer peut être constitué de deux phases liquides ou de particules solides en suspension dans un liquide. Les échantillons à centrifuger doivent être équilibrés deux à deux symétriquement placés par rapport à l'axe de rotation. Le choix des centrifugeuses repose sur la vitesse de rotation, le volume de l'échantillon et le type de rotor.

Figure I.12 : La centrifugeuse.

5.4. Principe :

La centrifugation permet de séparer des constituants de taille et de masse très différente contenus dans un liquide. Les constituants contenus dans un échantillon sont soumis à deux forces (figure I.13) :

- La gravité : C'est la force qui s'exerce du haut vers le bas.
- La poussée d'Archimède : C'est la force qui s'exerce du bas vers le haut.

Pour une vitesse de rotation donnée, chaque rotor a une force relative de centrifugation en x.g (force de gravité relative ou accélération) qui peut être exprimée la vitesse de rotation en rotations par minute.

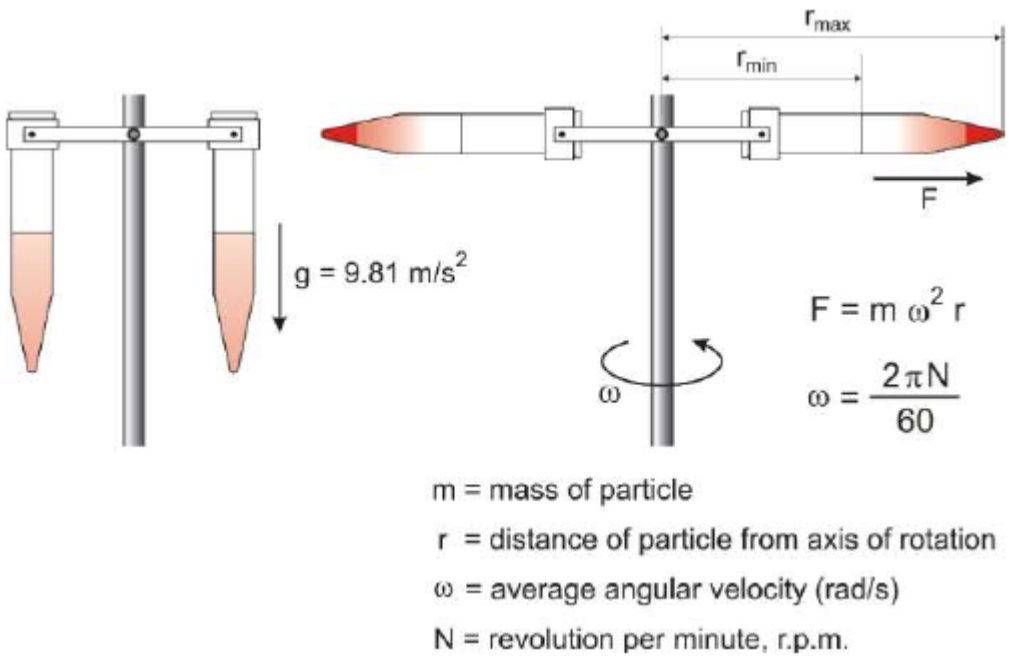


Figure I.13 : Procédure de centrifugation.

Où g est la force relative de centrifugation, r est le rayon de rotation du rotor (en cm) et N (rotations par minute : **rpm**) exprime la vitesse de rotation.

5.5. Choix des centrifugeuses

Certains paramètres sont intéressants à examiner lors du choix d'une centrifugeuse:

- Vitesse de rotation.
- Volume des échantillons.
- Niveau sonore.
- Type de rotor (angulaire ou à oscillations,) et types de tubes adaptés à celui-ci.
- Type de fixation à la paillasse (si nécessaire).

5.6. Applications de la centrifugation

La centrifugation est utilisée aussi bien aux mélanges homogènes qu'aux mélanges hétérogènes.

- Centrifugation préparative: Séparations des constituants de mélanges de nature chimique ou biologique
- Centrifugation analytique : Étude de la centrifugation des macromolécules, c'est la détermination des constantes physiques des macromolécules :
    - Mesure de la constante de sédimentation ; Mesure des coefficients de diffusion et de translation.
    - Détermination des masses moléculaires
    - Détermination de la forme et des dimensions
    - Détermination de la densité des particules

Exemple :

À l'aide d'une centrifugeuse, on peut séparer les globules rouges du plasma sanguin (Figure I.14).

Figure I.14 : La séparation des globules rouges et du plasma sanguin.

Chapitre II. Séparation par rupture de phase

1. Introduction

Nous avons vu dans le chapitre I, les différentes méthodes de séparation pour séparer un mélange hétérogène. Dans ce chapitre, on va discuter certaines méthodes utilisées pour séparer les composants d'un mélange homogène. Les constituants d'un mélange homogène peuvent être séparés par plusieurs techniques. Un raisonnement approprié est basé sur la rupture de phase.

2. Définition

La rupture de phase se fait soit par augmentation de la concentration de l'analyte (évaporation partielle ou totale du solvant), soit par diminution de sa solubilité (précipitation).

3. Principe

- Provoquer une hétérogénéité dans la phase homogène.
- Mélange solide-liquide : provoquer l'apparition d'un solide dans une phase liquide.
- Mélange liquide-liquide : provoque l'apparition deux phases dans une phase liquide.

4. Elimination du solvant :

C'est un processus par lequel on élimine la partie liquide d'un mélange homogène. Pour éliminer un solvant, on peut jouer soit sur les facteurs physiques (la pression, la température, ou sur les factures chimiques (la solubilité de la substance). Il existe deux techniques :

4.1.Elimination du solvant sous pression ambiante

Elle nécessite une élévation importante de température et entraîne ainsi le risque d'oxydation à l'air de substances fragiles, et d'altération de produits thermolabiles.

4.2.Elimination du solvant sous pression réduite

Elle a le double avantage d'opérer par distillation, donc à l'abri de l'air et à une température plus basse que précédemment. Pour réaliser cette étape on utilise l'évaporateur rotatif (figure II.1).

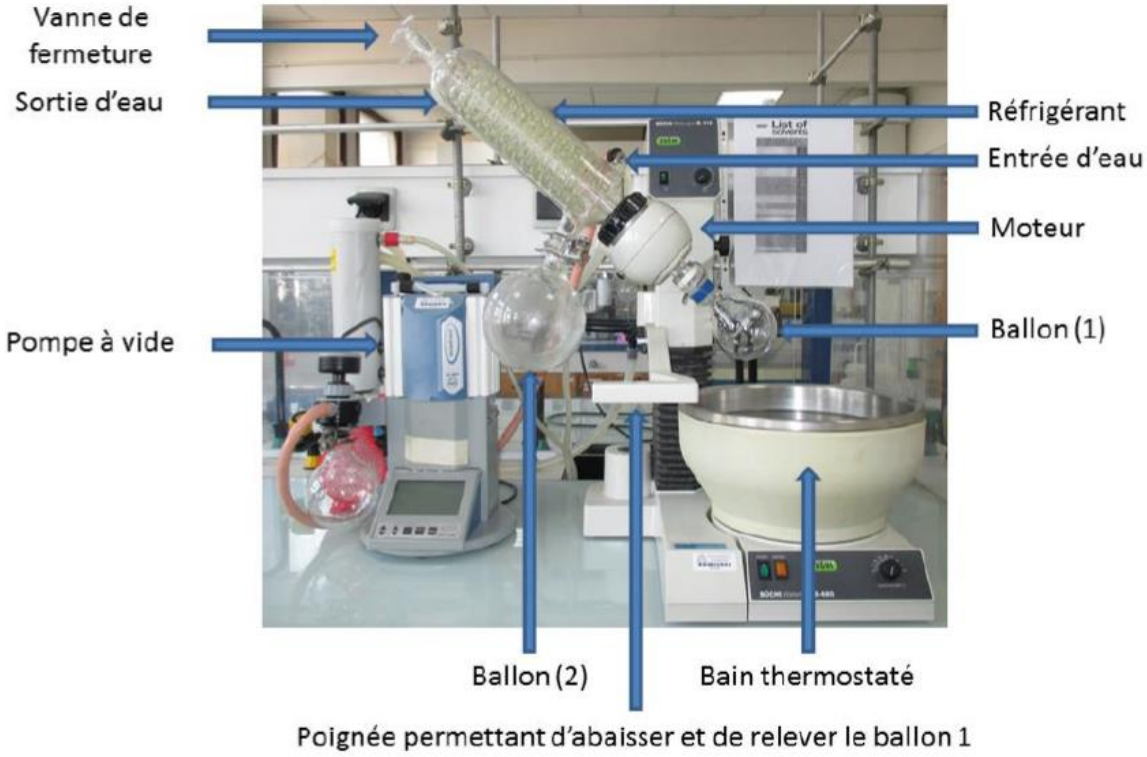


Figure II.1 : Photographie d'un évaporateur rotatif.

Remarque :

- ❖ Si le solvant est sous un faible volume et très volatile, la tension de vapeur est suffisante pour qu'il ait évaporation totale sans chauffage.
- ❖ Dans le cas où l'on veut éliminer les dernières traces de solvant qui restent, on utilise un dessiccateur (avec ou sans vide) contenant un agent susceptible de fixer les vapeurs résiduelles (figure II.2). Ces agents sont variables avec la nature du solvant :

- l'acide sulfurique concentré et l'anhydride sulfurique pour l'eau et les solvants basiques.
- Le silicagel ou le chlorure de calcium uniquement dans le cas de l'eau.
- La potasse ou la soude en pastille pour les solvants acides.

Figure II.2 : Photographie d'un dessiccateur ; (a) sous vide **;** (b) sans vide.

5. Précipitation :

On peut diminuer la solubilité du soluté par des moyens physiques ou chimiques. Son but est de transformer un mélange homogène en un mélange hétérogène facile à séparer par les moyens discutés précédemment. La précipitation chimique consiste à former une phase hétérogène au sein d'une phase homogène par l'ajout d'un autre soluté qui pourra réagir avec l'analyte pour former une substance solide. Les moyens physiques sont :
La modification de la température, l'addition d'un non solvant et le relargage.

5.1. Modification de la température

La plupart des composés solides ont une solubilité qui croit avec la température. Par conséquent si une solution se refroidit et que sa température baisse alors la solubilité des solutés diminue. Si une solution est proche de la saturation alors il est possible qu'un refroidissement provoque une précipitation.

5.2. Addition d'un non solvant

L'addition d'un second liquide miscible au premier et n'ayant aucun pouvoir de dissolution pour la substance, peut entraîner la précipitation de cette substance.

Exemple :

Une solution alcoolique d'acide salicylique précipite par addition d'eau, (l'eau et l'alcool sont miscibles, l'acide salicylique précipite).

Une solution chloroformique de digitaline précipite par addition d'éther de pétrole.

Une solution methanolique d'alcaloïde précipite par addition d'éther éthylique.

5.3. Relargage

C'est une technique qui consiste à séparer une substance en solution de son solvant en introduisant une autre substance plus soluble qui prend sa place. Lorsqu'une substance est en solution, chaque molécule est entourée par des molécules de solvant qui l'empêchent de se grouper. Si on introduit dans la solution une substance plus facilement soluble que la première, celle-ci monopolise les molécules du solvant permettant à la première de se séparer du solvant (phénomène de compétition). Le relargage peut être suivi d'une décantation, une filtration ou d'une distillation.

Parfois deux phases liquides dont l'une est aqueuse ont du mal à se séparer du fait de leurs densités voisines. On sature la phase aqueuse avec du chlorure de sodium et la séparation est facilitée. Cette technique est utilisée pour séparer l'ADN ou les protéines (en ajoutant du sulfate d'ammonium).

5.3.1. Corps relargables

Ce sont surtout des sels minéraux ; ils sont classes dans l'ordre décroissant suivant (séries de Hofmeister) : à titre d'exemple :

$F^- > SO_4^{2-} >$ citrate > tartrate $> Cl^- > Br^-$

$Li^+ > Na^+ > K^+ > NH_4^+ > Mg^{2+}$

Exemple :

La solubilité du chlorure de sodium dans l'eau est d'environ 360 g/L, celle du nitrate d'argent est de 35 g/L mais celle du chlorure d'argent est seulement $1{,}8.10^{-3}$ g/L.

Si l'on ajoute quelques gouttes d'une solution de nitrate d'argent dans une solution de chlorure de sodium alors la concentration massique de $1{,}8.10^{-3}$ g/L sera rapidement dépassée et le chlorure d'argent précipitera. C'est ce phénomène qui est mis à profit dans les tests de reconnaissance d'ion par précipitation.

Chapitre III : Extraction par un solvant non miscible

1. Introduction

L'extraction est l'une des opérations les plus fréquemment réalisées en laboratoire de chimie organique. Le but est d'isoler le produit d'intérêt en le faisant passer dans une phase organique ou aqueuse. On utilise pour cela une pièce de verrerie particulière : **l'ampoule à décanter**. L'extraction n'est possible que si les deux liquides ne sont pas miscibles (c'est-à-dire s'ils forment deux phases distinctes). Bien entendu, le produit d'intérêt doit avoir la meilleure différence possible d'affinité entre les deux solvants.

L'espèce chimique obtenue après l'extraction s'appelle « extrait » et le reste c'est le « Raffinat » où bien « résidu ». En effet, Il existe deux procédés d'extraction : l'extraction solide-liquide et l'extraction liquide-liquide (figure III.1).

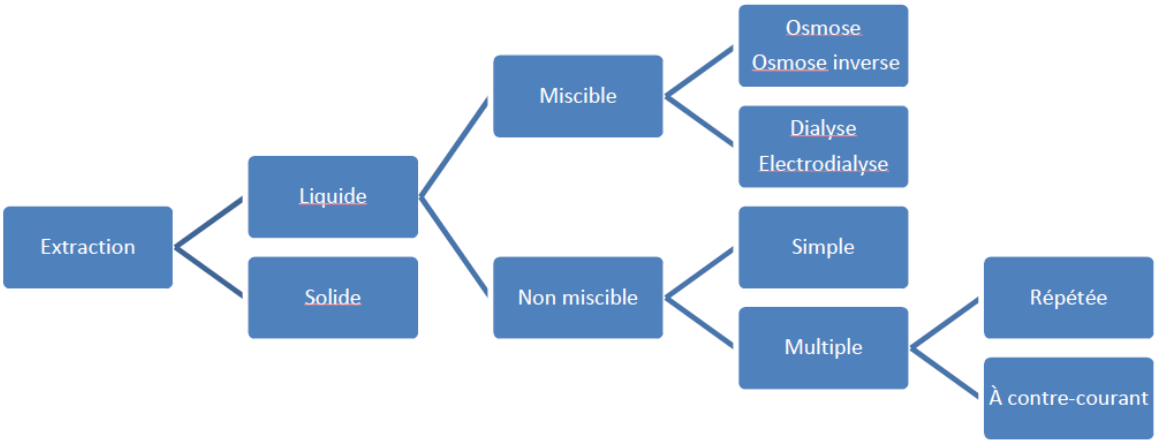


Figure III.1 : Les différents procédés d'extraction.

2. Extraction liquide-liquide

L'extraction liquide-liquide est une opération fondamentale de transfert de matière entre deux phases liquides qui permet de séparer un ou plusieurs constituants en fonction de leur différence d'affinité entre les deux phases. Cette technique permet donc d'extraire une substance dissoute dans un solvant, à l'aide d'un autre solvant, appelé solvant d'extraction ou solvant extractif, dans lequel elle est plus soluble.

Tous les liquides ne se mélangent pas nécessairement, ces liquides sont dits non-miscibles et forme deux phases distinctes superposées en fonction de leur densité, contrairement aux liquides miscibles qui se mélangent bien pour former une solution homogène.

2.1. Principe d'extraction liquide-liquide

Si l'espèce à extraire (E) est initialement contenue dans une solution aqueuse (l'eau), on ajoute un solvant organique (S_2) dans lequel l'espèce est plus soluble dans S_2. La substance passe de S_1 (solvant initial) vers le solvant extérieure S_2. L'extraction se réalise à l'aide d'une ampoule à décanter. Le principe d'extraction liquide-liquide est donné selon la figure III.2. Les deux phases se reposent selon leurs densité, le plus lourd vers le bas « S_1 », le léger vers le haut « S_2+E ».

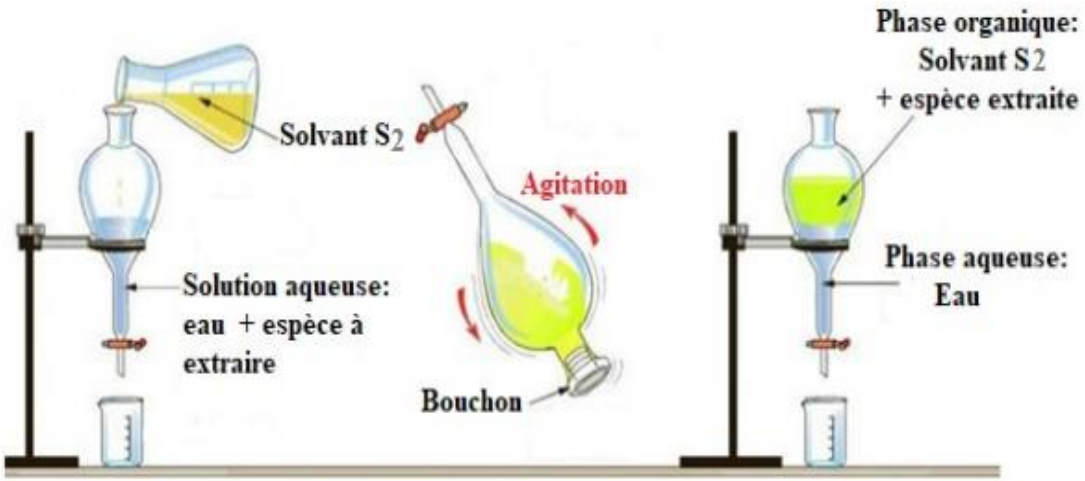


Figure III.2: Schéma d'extraction liquide-liquide.

2.2. Le choix de solvant

Le choix de solvant d'extraction doit avoir ces 3 critères :

1/ L'espèce à extraire (E) doit être très soluble dans le solvant extracteur S_2.

2/ Le solvant extracteur S_2 doit être non miscible à la phase aqueuse (S_1).

3/ Le solvant extracteur S_2 ne doit pas réagir avec l'espèce à l'extraire.

Il existe d'autres critères tels que :

- Son état physique ; il doit être liquide à la température et la pression de l'extraction.
- Facilement éliminés après extraction, ayant un point d'ébullition bas et le plus éloigné possible de celui l'espèce à extraire.
- Sa toxicité, on choisit le solvant le peu toxique que possible.

2.3. Quelques exemples des solvants extracteurs

Le tableau suivant résume quelques solvants extracteurs et leur caractéristiques :

solvant	Point d'ébullition (°C)	Masse volumique g/m^3	avantage	inconvénient
Ether éthylique	**35°**	**0.71**	**Facile à éliminer**	**Très inflammable**
Dichlorométhane	**40°**	**1.33**	**Facile à éliminer**	**Forme une émulsion (peux toxique)**
Acétate d'éthyle	77	**0.90**	**Bon pouvoir de solubilisation**	**Inflammable, modérément difficile à éliminer**
Cyclohexane	**81**	**0.78**	**Peu toxique**	**Facilement inflammable**

Exemple :

On veut extraire un produit C qui se trouve dans une boisson gazeuse à l'aide d'un solvant.

On dispose 3 solvants : dichlorométhane, éthanol, éther éthylique.

Le tableau suivant résume quelque caractéristique de chaque solvant :

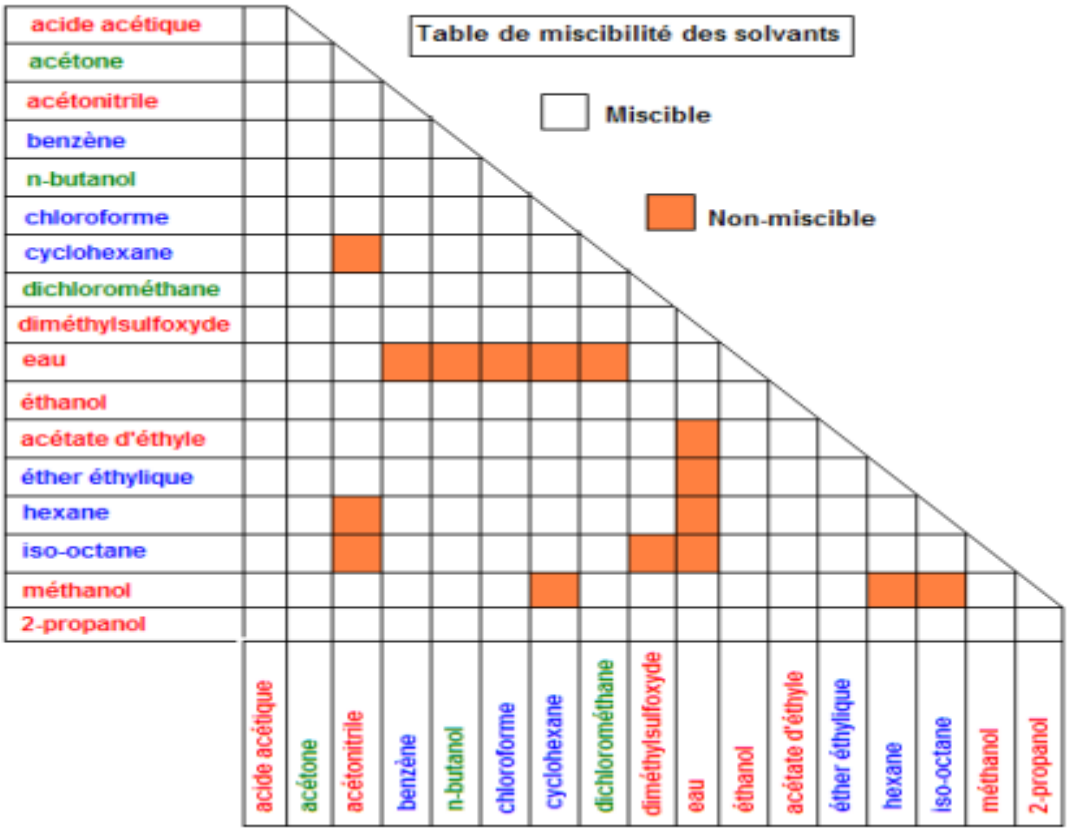
	dichlorométhane	éthanol	éther éthylique
Densité	1.33	0.8	0.71
Solubilité	moyenne	bonne	bonne
Miscibilité avec l'eau	Non miscible	miscible	miscible

Quel est le solvant extracteur qu'on doit choisir ?

Solution :

On doit choisir le dichlorométhane car le solvant répond au critère de choix du solvant extracteur, tel que la solubilité et miscibilité à l'eau.

Tableau III.1 : Tableau de miscibilité des solvants.



2.4. Coefficient de partage K

Lorsque l'on ajoute un composé A dans un milieu comprenant deux phases liquides non miscibles en contact, celui---ci va se répartir dans ces deux phases dans des proportions bien définies qui dépendent de son **coefficient de partage K** entre ces deux phases.

Ce coefficient est une constante thermodynamique d'équilibre définie à une température T et à PH donné, relative à l'équilibre suivant :

$$A_{phase1} = A_{phase2}$$

D'après la relation de Guldberg-Waage :

$$K_P = K_T^0 = \frac{[concentration\ dans\ la\ phase\ 2]}{[concentration\ dans\ la\ phase\ 1]}$$

Le graphe représentant l'équilibre de partage $C_B = f(C_A)$ (avec C_A et C_B sont les concentrations du soluté respectivement dans les phases A et B à l'équilibre) est soit ;

- Une droite dans le cas d'une distribution régulière. Le rapport C_B/C_A est constant et représente le coefficient de partage ($C_B = K_p C_A$) (figureIII.3).
- Une courbe dans le cas d'une distribution irrégulière, cela signifie que le soluté à extraire n'existe pas sous la même forme dans les deux phases A et B (figureIII.3).

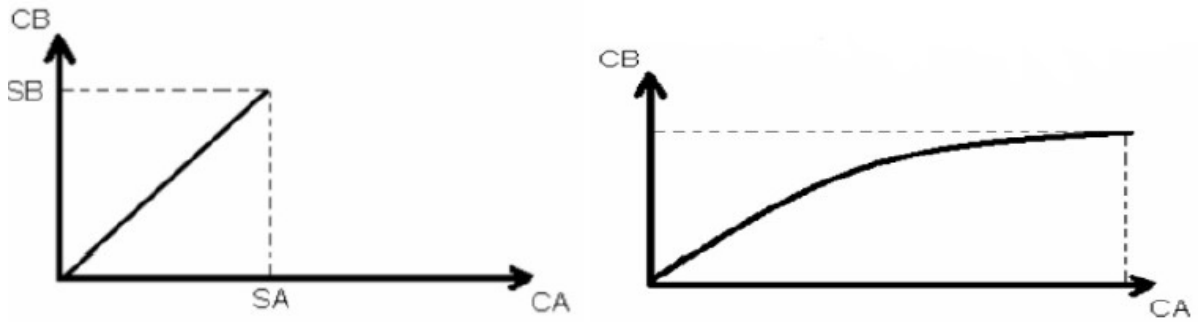


Figure III.3. Graphes de distribution régulière (à gauche), irrégulière (à droite).

Soit un produit **S** qu'on veut extraire d'une phase **A** à l'aide d'un solvant **B**. $\mathbf{m_0}$ est la masse initiale du composé **S** dans la phase **A**, $\mathbf{m_A}$ la masse restante du composé **S** dans la phase **A** après une extraction, $\mathbf{m_B}$ la masse du composé extrait par le solvant B.

On a :

	S_A ⟵ ⟶ S_B	
Avant agitation	m_0	0
A l'équilibre	m_A, $[S]_A$	M_B, $[S]_B$

$$K = \frac{[S]_B}{[S]_A} = \frac{n_B/V_B}{n_A/V_B} = \frac{m_B/V_B}{m_A/V_A} \qquad \text{avec } m_0 = m_A + m_B$$

$$K = \frac{m_0 - m_A/V_B}{m_A/V_A}, \qquad \text{donc} \qquad \mathbf{m_A} = \frac{\boldsymbol{m_0 V_A}}{\boldsymbol{K\,(V_A + V_B)}}$$

L'extraction sera d'autant plus efficace que le coefficient de partage est grand. On ne connaît habituellement pas le coefficient de partage du produit. On utilise souvent le même volume de solvant d'extraction que celui de la phase à extraire ou un volume deux fois supérieur. On effectue normalement 2-3 extractions de la phase aqueuse. On peut vérifier par CCM qu'il ne reste plus de produit dans la phase aqueuse. On peut modifier le coefficient de partage du produit par relargage en ajoutant un peu d'une solution aqueuse saturée en NaCl.

2.5. Coefficient de partage relatif ou corrigé α :

Le coefficient de partage relatif est le rapport des quantités. Q_A et Q_B sont les quantités de soluté S respectivement dans les phases A et B à l'équilibre.

$$\alpha = \frac{Q_B}{Q_A} = \frac{[S]_B.V_B}{[S]_A.V_A} = K\frac{V_B}{V_A}$$

2.6. Taux de distribution D :

Lorsque S se trouve sous plusieurs formes (moléculaire et ionisée) dans une et/ou l'autre des phases, il faudra tenir compte de la somme des concentrations de chaque forme et il convient de parler de la constante de distribution D définie par l'équation suivante :

$$D = \Sigma C_B/\Sigma C_A = \frac{[S]_B\ mol\acute{e}culaires + [S]_B\ ioniques}{[S]_A\ mol\acute{e}culaires + [S]_A\ ioniques}$$

2.7. Rendement d'extraction R :

L'efficacité d'une extraction est évaluée par son rendement. On peut déterminer le rendement (R) expérimentalement ou théoriquement :

A) Détermination expérimentale

On cherche souvent à récupérer la plus grande quantité possible de soluté **S** à l'aide d'un volume donné de solvant extractif. Le rendement d'extraction (R) est la quantité de soluté **S** extrait par le solvant **B** ($\mathbf{Q_B}$) à partir de la quantité initiale présente dans le solvant **A** ($\mathbf{Q_{A0}}$). Plus $\mathbf{Q_B}$ sera proche de Q_{A0}, le rendement d'extraction sera meilleur.

$$R = \frac{\sum Q_B}{\sum Q_{A0}} = \frac{n_{org}}{n_{Total}} = \frac{n_{Tot} - naq}{n_{Total}}$$

Où :

R : rendement de l'extraction

n_{org} : le nombre de mole de la substance dans la phase organique

n_{aq} : le nombre de mole de la substance dans la phase aqueuse

$n_{totale} = n_0$: le nombre de mole de la substance total ou initial

Le résultat peut être donné en valeur absolue (entre 0 et 1) ou en pourcentage (entre 0 % et 100 %).

B) Détermination théorique

Le rendement R d'une extraction est la quantité de matière de A récupérée dans la phase organique (notée B) rapportée à la quantité de matière n_0 de A située initialement en phase aqueuse (notée A). À l'équilibre, on

récupère $n_{org} = [A]_{org}.V_{org} = C_B.V_B$ moles de A dans la phase organique il en reste $n_{aq} = [A]aq.Vaq = C_A.V_A$ en phase aqueuse.

Le rendement est donc :

$$R = \frac{n_{org}}{n_0} = \frac{n_{org}}{n_0} = \frac{n_{org}}{n_{aq}+n_{org}}$$

$$R = \frac{1}{1+\frac{n_{aq}}{n_{org}}}$$

Utilisons par ailleurs : $n_{org} = C_B.V_B$ et $n_{aq} = C_A.V_A$

Donc :

$$\frac{n_{aq}}{n_{org}} = \frac{C_A.C_A}{C_B.C_B} = \frac{1.V_A}{K_p.V_B}$$

Ainsi :

$$R = \frac{1}{1+\frac{1}{K_P}.\frac{V_{aq}}{V_{org}}}$$

Le rendement de l'extraction sera d'autant meilleur que :

- La constante de partage K_P est élevée, c'est à dire que A est davantage soluble dans la phase organique que dans l'eau ;
- Le volume du solvant d'extraction V_{org} est élevé.

On a donc a priori intérêt à utiliser un maximum de solvant d'extraction pour augmenter le rendement afin de recueillir la quantité maximale de A.

C) Amélioration du rendement R

Pour améliorer le rendement, il faut faire plusieurs extractions avec des fractions de ce volume qu'en une seule fois. Pour démontrer cette hypothèse, on calcule le rendement d'extraction consécutif à n extractions. Si on note α le rendement d'une seule extraction.

- Effectuons une première extraction :

$$\alpha = \frac{1}{1+\frac{1}{K_P}.\frac{n.V_{aq}}{V_{org}}}$$

- Initialement, on a une quantité n0 de A à extraire.

L'extraction n°1 extrait $\alpha.n_0$ et il reste $n_1 = (1-\alpha)\, n_0$ de A dans la phase aqueuse

L'extraction n°2 extrait αn_1 et il reste $n_2 = (1-\alpha)\, n_1 = (1-\alpha)^2\, n_0$.

Après la n-ième extraction : il reste donc dans la phase initiale = $(1-\alpha)^n\, n_0$ moles de A.

Le reste se retrouve dans les phases organiques que l'on rassemble pour retrouver le volume V_{org} contenant $n_0 - (1- \alpha)^n n_0$ moles de A.

- D'où le rendement global :

$$\mathbf{R = 1 - (1- \alpha)^n}$$

Donc, **α** dépend de **n**.

D) Relation entre la masse restante et le nombre des extractions

Elle est donnée par la relation suivante :

$$\mathbf{m_{reste} = m_0 \left[\frac{V_A}{K_P.V_B + V_A}\right]^n}$$

Avec :

$\mathbf{m_{reste}}$: masse restante du composé x dans le solvant A après n extraction.

Exemple :

Soit 100 g(m_0) d'un composé dans l'eau (50 ml), avec un coefficient de partage de 1.

Comparons:

- Cas N°1 : V_B= 50 mL, on effectue 4 extractions

$m_{A4} = m_0 \left[\frac{1}{2}\right]^4 = \frac{m_0}{16}$ = 6,25 g ; il reste 6 ,25 g de composé à extraire.

- Cas N°2 : VB= 100 ml, on effectue 2 extractions

$m_{A2} = m_0 \left[\frac{1}{3}\right]^2 = \frac{m_0}{9}$ = 11,1 g ; il reste 11 ,1 g de composé à extraire.

Dans les deux cas, le volume total de solvant d'extraction est identique, mais la quantité de produit restant à extraire est près de deux fois plus faible dans le premier cas.

En conclusion :

- Le rendement d'extraction dépend du solvant et du soluté et par conséquent de la constante de distribution, du volume de solvant d'extraction et du nombre d'opérations effectuées.
- il vaut mieux faire plusieurs extractions avec faibles volumes qu'un seul avec un grand volume.

2.8. Récupération du soluté

Deux étapes sont essentielles pour la récupération du soluté :

1. en premier lieu, il faut laver la phase organique, afin de revenir à un milieu neutre.

2. en second lieu, il faut évaporer solvant d'extraction et sécher le produit. L'opération d'évaporation est généralement réalisée au rotavapor.

Chapitre IV. Séparation par changement d'état

1. Introduction

L'état sous laquelle se présente un corps dépend essentiellement de l'organisation des atomes où des molécules que constituant ce corps, il existe 3 états (solide-liquide-gaz) .Le changement d'un état à un autre dépend de deux facteurs tel que: la température et la pression. La relation entre ces trois états est représenté par un simple graphe qui s'appelle diagramme de phase (figure IV.1), le diagramme est diffèrent pour chaque substance, il est partagé en 3 courbes qui sont relie à un point s'appelle « point triple ». Il est possible de séparer les différents constituants d'un mélange homogènes par l'utilisation d'une méthode repose sur le changement d'état de l'un des constituants par exemple: la vaporisation, la liquéfaction, la distillation, la cristallisation, la lyophilisation….

Dans ce chapitre nous présentons deux techniques : la distillation et la sublimation.

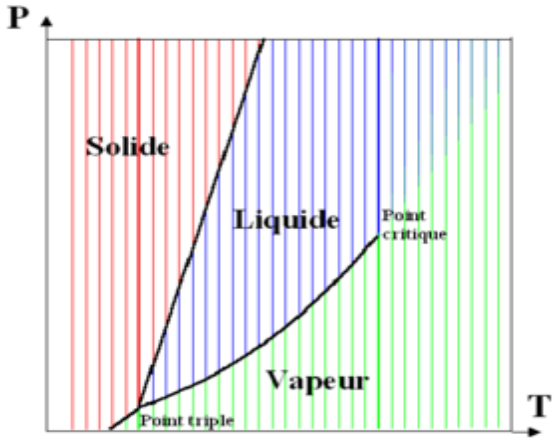


Figure IV.1 : exemple d'un diagramme de phase.

2. Principe :

La séparation par changement d'état consiste à faire passer l'un des constituants du mélange homogène à l'état de vapeur. En utilisons la distillation, si le mélange initial est un liquide, et la sublimation, s'il est solide.

- **La sublimation** : met à profit le passage de l'état solide à l'état gazeux, en abaissant la pression et en élevant la température.
- **La distillation** : met à profit le passage de l'état liquide à l'état gazeux, d'un mélange liquide en utilisant les volatilités différentes de ces constituants.

3. La distillation

La distillation est une opération de transfert de matière ayant pour but de séparer les constituants d'un mélange liquide homogène. Elle consiste en l'ébullition d'un mélange liquide suivie de la condensation des vapeurs obtenues, en un liquide «pur» ou en fractions liquides plus ou moins riches en constituants du mélange

vaporisé. Elle se base sur la différence de volatilité entre ces constituants. C'est l'une des opérations de séparation les plus employées dans le domaine de l'agroalimentaire, la chimie et de la pétrochimie.

La distillation permet de séparer les constituants d'un mélange solide-liquide (S –L) ou liquide-liquide (L –L).

Il existe deux types de distillation: Distillation simple et distillation fractionnée.

3.1. Distillation simple

C'est une technique utilisée pour séparer les constituants d'un mélange homogène liquide ou d'un mélange hétérogène comportant au moins une phase liquide. En utilisant cette technique, on fait appel à la propriété de point d'ébullition. La distillation ressemble à l'évaporation. La seule différence est que la vapeur est récoltée par condensation au contact d'une surface froide. Elle repose sur deux changements d'état inverses : la vaporisation et la liquéfaction. Elle nécessite un montage un peu complexe (voir figure IV.2). Le mélange homogène liquide est chauffé grâce au chauffe ballon jusqu'à atteindre le point d'ébullition du liquide le plus volatile. Ce liquide se vaporise donc et monte le long de la colonne puis la vapeur est condensé (**distillat**) en passant à l'intérieur du réfrigérant grâce à un circuit externe dans lequel circule en permanence de l'eau fraîche. Le deuxième liquide n'atteint pas sa température d'évaporation et reste sous forme liquide dans le contenant initial (**résidu**). En contrôlant la température avec un thermomètre en haut de la colonne, on sélectionne les corps que l'on souhaite récupérer dans la fiole placée à la sortie du réfrigérant. Le bulbe du thermomètre est disposé tout près du tube à dégagement pour mesurer la température de la vapeur à condenser. D'habitude on ajoute au ballon de petits morceaux de pierre ponce pour réguler l'ébullition.

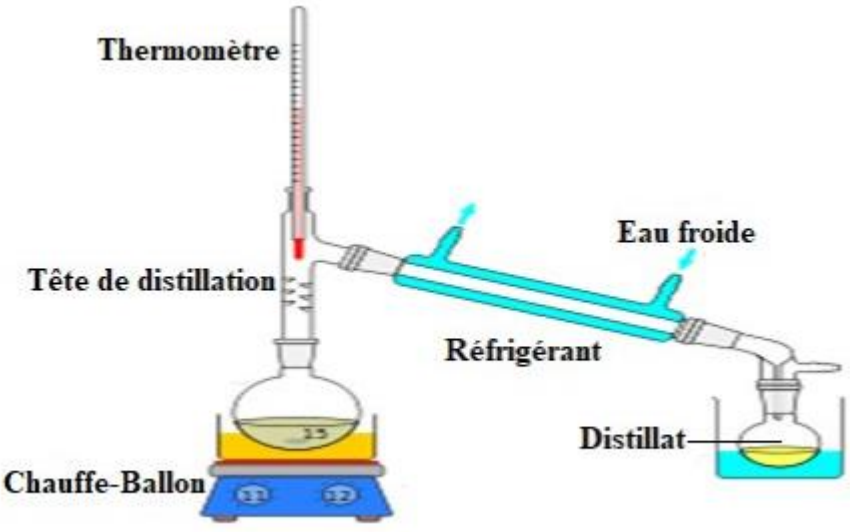


Figure IV.2 : Montage de distillation simple.

3.2. Distillation fractionnée

Elle concerne un mélange de plusieurs liquides miscibles, elle utilise une colonne de séparation (ou colonne de Vigreux) pour séparer les différents constituants du mélange en fonction de leurs températures d'ébullition au niveau de chaque plateau de cette colonne.

3.2.1. Principe

Par simple distillation, on ne peut séparer de façon satisfaisante un mélange d'eau et d'éthanol. Cela s'explique par la différence relativement faible entre leurs points d'ébullition
(100 °C pour l'eau et 78 °C pour l'éthanol). Quand le mélange est chauffé à 78 °C, l'eau et l'alcool s'évaporent tous deux. Cependant, la présence de la colonne de fractionnement (figure IV.3) fournit des surfaces suffisamment froides pour que le composant le moins volatil de la vapeur, l'eau, s'y condense. Finalement, en théorie, seul le composant le plus volatil, l'alcool, atteint le haut de la colonne et passe dans le réfrigérant. En réalité, de la vapeur d'eau réussit toujours à accompagner l'alcool. En recommençant plusieurs fois à partir du distillat, on arrivera cependant à des concentrations assez fortes en alcool.

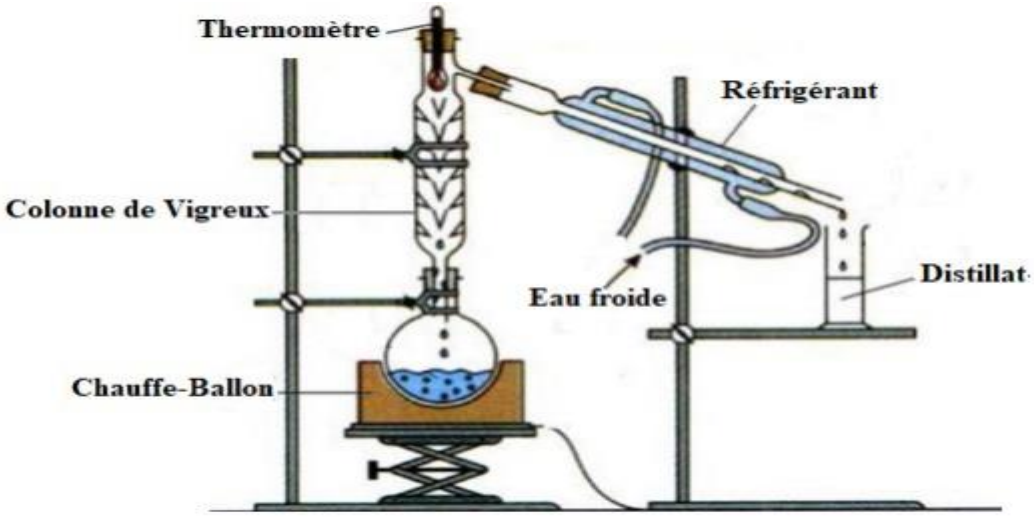


Figure IV.3: Schéma d'une distillation fractionnée.

3.3. Sublimation

La sublimation sépare un mélange de solides dont l'un sublime. Quelques substances changent directement, du solide à la vapeur lors du chauffage sans passer par l'état liquide (figure IV.4). Ce changement s'appelle la sublimation. Lors du refroidissement, la vapeur d'eau redevient directement solide. L'iode est un solide qui sublime. Si un mélange d'iode et de sable est chauffé dans un bécher, l'iode passe directement du solide à la vapeur. La vapeur redevient solide directement sur une surface froide. Le sable n'est pas affecté par la chaleur et reste dans le bécher.

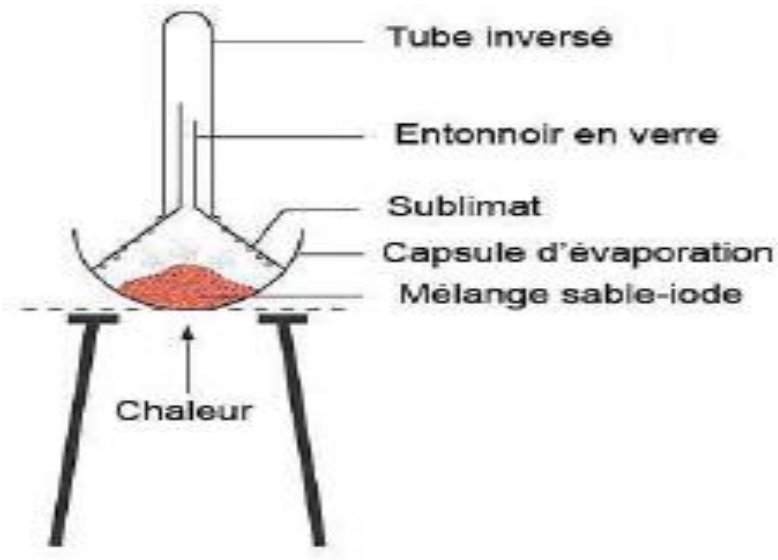


Figure IV.4 : Protocole de sublimation.

3.4. La lyophilisation

La lyophilisation, autrefois appelée cryodessiccation, est un procédé de séchage à froid permettant de retirer l'eau contenue dans un produit. Il se réalise en deux étapes : congélation du produit puis sublimation. Cette dernière se faisant en maintenant le produit sous vide à une température basse. Le produit obtenu est appelé lyophilisat. Le terme "lyophile" signifie en grec "ami des solvants", en effet le lyophilisat ayant une structure très poreuse il présente une

grande affinité pour les solvants aqueux. Cette structure lui permet le plus souvent de se dissoudre ou de se laisser pénétrer par un solvant avec une grande rapidité. Pour obtenir de nouveau le produit initial, une 3ème étape de réhydratation est nécessaire.

3.4.1. Technique de la lyophilisation

Cette opération est réalisée en trois phases:

1. Congélation du produit entre – 30°C et – 50°C ;

2. Dessiccation primaire ou sublimation: Durant cette étape dite de sublimation, effectuée sous vide, l'eau contenue dans le produit passe de l'état solide (glace) à l'état gazeux (vapeur). Cette opération se déroule à une température supérieure à – 20°C.

3. Dessiccation secondaire ou séchage final: Cette étape du procédé s'effectue toujours sous vide à une température n'excédant pas +50°C. L'humidité résiduelle finale du produit est comprise entre 4 et 6 %.

La durée moyenne d'un cycle de lyophilisation est comprise entre 60 et 72 heures.

3.4.2. Avantages

- Conservation de la qualité des aliments sensibles à la chaleur
- Réhydratation rapide grâce à la structure poreuse des poudres
- Humidité résiduelle très faible

3.4.3. Applications

- Produits biologiques (protéines, enzymes, microorganismes...)
- Actifs pharmaceutiques et cosmétiques
- Produits alimentaires

CHAPITRE V : Méthode chromatographiques

1. Définition

La chromatographie est une méthode physique d'analyse basée sur la séparation de constituants d'un mélange ; les différents constituants de ce mélange appelés solutés sont séparés et entraînés par un fluide (un liquide ou gaz) que l'on appelle phase mobile ; ils interagissent ou au contraire n'interagissent pas avec une phase fixe que l'on appelle phase stationnaire qui exerce sur eux un effet retardateur.

L'origine du mot chromatographie vient peut-être de la séparation de composés colorés puisque chroma en grec, signifie couleur et graphein signifie écrire.

2. Historique

La chromatographie est une science très ancienne. Aristote décrit les propriétés que possèdent certaines terres pour purifier l'eau de mer. Au XVIème siècle, le strasbourgeois Brunswig purifiait de l'éthanol en faisant passer la vapeur à travers une éponge imprégnée d'huile d'olive et réalisait une expérience de chromatographie gaz-liquide, 400 ans avant la découverte de cette technique. En 1931, la publication de Kuhn et Lederer sur la séparation des isomères du carotène et de la xanthopylle apparue. En effet, c'est Kuhn qui, en 1938 reçut le Prix Nobel sur la chromatographie en phase mince. En 1952, les travaux de Martin ont mis en évidence la chromatographie d'échange ionique et en 1941 la naissance de la chromatographie de partage par Martin-Synge. En 1955 la chromatographie gaz-liquide sur le marché et en 1965 l'apparition la chromatographie liquide moderne (HPLC). L'excellente séparation des molécules, aussi bien les grosses que les petites rend la chromatographie une technique largement répandue.

3. Classification des techniques chromatographiques

Les méthodes chromatographiques se classent en trois façons :

3.1. Classification selon la nature physique des phases

- ❖ Selon la nature de la phase mobile on distingue :
- la chromatographie en phase liquide (CPL)
- la chromatographie en phase gazeuse (CPG)
- la chromatographie en phase supercritique (CPS)
- ❖ Selon la nature de la phase stationnaire on distingue :
- la chromatographie liquide/solide (CLS)
- la chromatographie liquide/liquide (CLL)
- la chromatographie gaz/solide (CGS)
- la chromatographie gaz/liquide (CGL)

3.2. Classification selon le mécanisme de rétention

Cette classification repose sur la nature de la phase stationnaire et son interaction avec les molécules à séparer. On distingue ainsi : la chromatographie d'adsorption, de partage, d'échange d'ions, d'exclusion et la chromatographie d'affinité.

3.3. Classification selon la technique mise en jeu

Selon la technologie mise en jeu on distingue :

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

4. Terminologie

4.1. Chromatogramme

Un chromatogramme est un diagramme montrant l'évolution du signal du détecteur (par rapport à la concentration en soluté) en fonction du temps d'élution (plus rarement du volume d'élution). Ce graphique est utilisé à la fois en analyse qualitative et quantitative.

Analyse qualitative : permet l'identification des composés par la position du pic

Analyse quantitative : évaluer la concentration ou la masse d'un composé en utilisant l'aire des pics

4.2. Elution

L'élution est l'entraînement d'un soluté à travers la phase stationnaire par le mouvement de la phase mobile. En chromatographie liquide solide, la phase mobile peut être appelée éluant.

5. Applications de la chromatographie

La chromatographie est un outil puissant et polyvalent pour séparer des espèces chimiques très voisines. Elle peut également être utilisée tant pour l'identification qualitative que pour l'analyse quantitative d'espèces individuelles.

6. Présentation des méthodes chromatographiques

Il existe différents types de chromatographie suivant la méthode de séparation utilisée, parmi ces techniques on cite :

- la chromatographie en couche mince (CCM).
- la chromatographie en phase gazeuse (CPG).
- la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).
- la chromatographie sur colonne

- la chromatographie d'adsorption
- la chromatographie de partage
- la chromatographie d'échange d'ions

Les différentes techniques exposées ci-dessus sont très différentes sur le plan technologique et matériel utilisé mais elles ont de nombreux points communs sur le principe de fonctionnement. Une CCM nécessite une feuille de papier, un solvant et une cuve en verre. La CPG, ou la HPLC nécessite des appareils de technologies poussées de coût élevé.

6.1. La chromatographie sur couche mince (CCM)

6.1.1. Définition

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

6.1.2. Principe

Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. En outre, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant. Cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. Les composés se déplacent donc alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile, l'action de rétention de la phase stationnaire étant principalement contrôlée par des phénomènes d'absorption.

6.1.3. Appareillage

La figure V. 3 représente les principaux éléments d'une séparation CCM.

La cuve chromatographique : un récipient habituellement en verre de forme variable ; fermé par un couvercle étanche (figure V. 3 a).

La phase stationnaire : une couche d'environ 0,25 mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant est fixé sur une plaque de verre ou une feuille de matière plastique ou

d'aluminium à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté, l'amidon ou polymère organique (figure V. 3 b).

L'échantillon : environ 1 µl de solution diluée (2 à 5% de mélange à analyser) déposé en un point repère au-dessus de la surface de l'éluant.

L'éluant (phase mobile): un solvant pur ou un mélange, il migre lentement le long de la plaque en entrainant les composants de l'échantillon (figure V. 3 c).

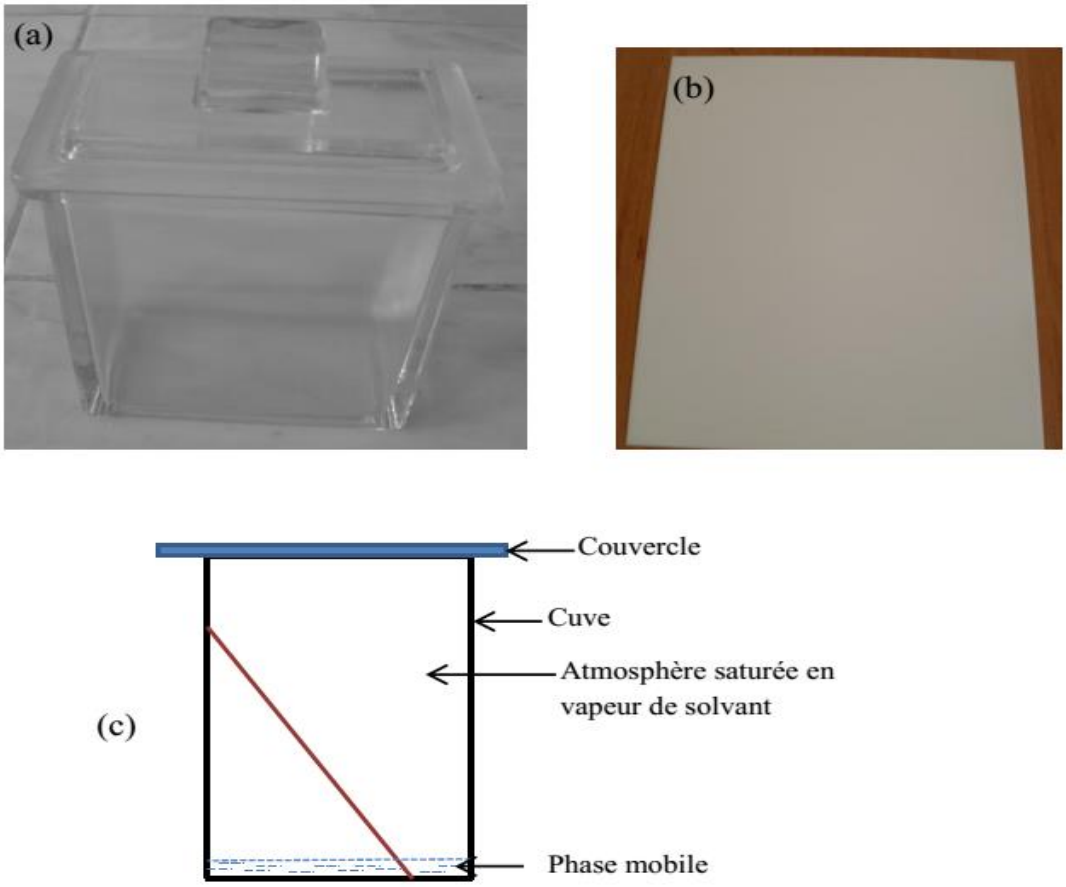


Figure V.3 : (a) Cuve chromatographique (b) Plaque CCM (c) Schéma d'un montage CCM.

6.1.4. Les conditions opératoires

6.1.4.1. La phase stationnaire

Les adsorbants employés en CCM sont : le gel de silice, l'alumine et la cellulose.

Silice : c'est le support le plus courant. Il est conseillé de toujours commencer par celui-là.

Alumine : on l'utilise généralement pour les composés à caractère basique.

Cellulose : on l'utilise pour les composés fortement polaires, comme les sucres ou les acides aminés.

6.1.4.2. L'éluant

L'éluant peut être composé d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants ; il ne doit pas être ni trop polaire (entraînant les composants) ni trop apolaire (empêchant leur migration). Les solvants sont caractérisés par leur différence de polarité et leur non miscibilité.

A l'aide d'une micropipette ou d'un tube capillaire, on dépose une goutte de chaque solution sur une plaque, chacune séparée de l'autre d'environ 1 cm. L'éluant qui aura entraîné le soluté à une distance proche de la moitié de la plaque sera considéré comme bon éluant. Deux facteurs interviennent lors de l'interaction entre l'éluant et le soluté :

1. La solubilité : on doit être en mesure de dissoudre le soluté dans l'éluant pour que la migration se fasse.
2. La polarité de l'éluant va déterminer à quelle vitesse le composé migre.

6.1.4.3. Dépôt de l'échantillon

Une faible quantité de l'échantillon dissous dans un solvant volatil, qui n'est pas forcément le même que l'éluant. On trace sur la plaque à 1 cm du bord inférieur un très fin trait au crayon de papier qui servira à repérer les dépôts ; on veillera surtout à ne pas abîmer la surface de la plaque. L'échantillon est déposé ensuite à l'aide de micropipette ou de tube capillaire en un point sur le trait. Les produits non volatils sont aisément analysables ; les composants de l'échantillon sont volatils : aldéhydes, cétones aliphatiques ou aromatiques, acides monocarboxyliques, amines primaires ou secondaires ; nécessaire de les chromatographies sous forme de sels.

6.1.4.4. Développement de la plaque

La plaque préparée est introduite en position verticale dans la cuve et l'éluant qui en recouvre le fond monte par capillarité, entraînant à des vitesses différentes les constituants à séparer. Lorsque le niveau atteint par le solvant est d'environ 1 cm de l'extrémité supérieure, la plaque est retirée de la cuve (figure V.4).

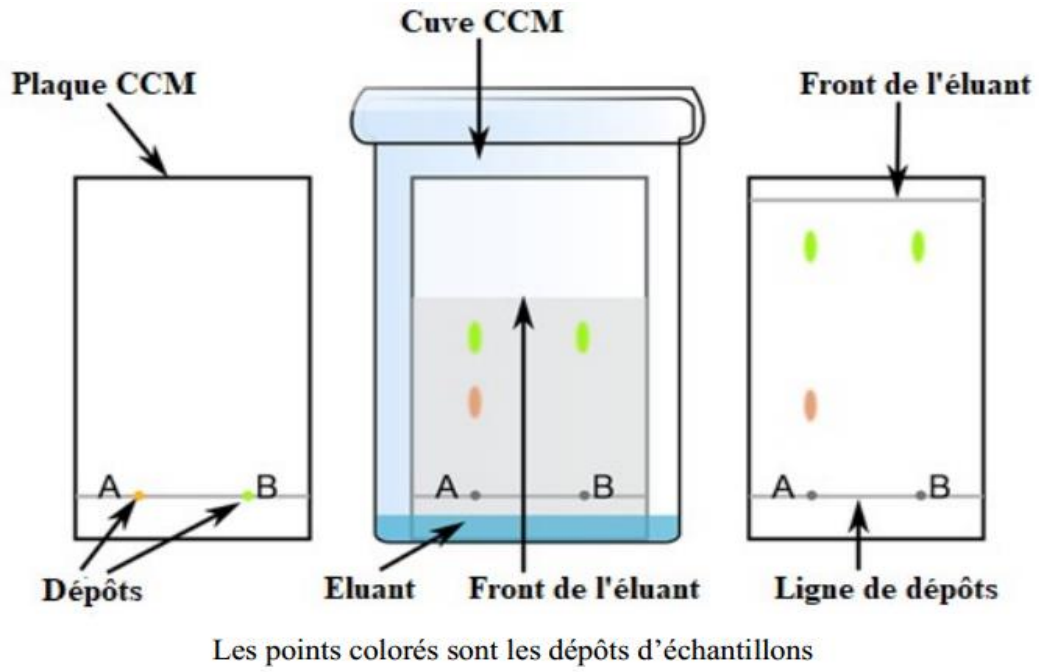


Figure V.4 : Les différentes étapes de la chromatographie CCM.

6.1.5. Révélation

Lorsque les composants de l'échantillon à analyser sont colorés, leur séparation est facilement observable sur la plaque ; dans le cas contraire on doit rendre les taches visibles par un procédé de révélation. Les taches sont ensuite cerclées au crayon. Les méthodes usuelles de révélation sont les suivantes :

- A l'œil nu : si le produit est coloré
- Radiation UV : en exposant la plaque à une source de radiation UV, certains composés apparaissent sous formes de tache brillantes.
- Fluorescence : si un indicateur de fluorescence est incorporé à l'adsorbant ; la plaque entière devient fluorescente lorsqu'elle est soumise à radiation UV. Les composés sont révélés sous forme de taches sombres.
- Iode : l'iode réagit avec un grand nombre de composé organique en formant des complexes jaunes. La révélation est réalisée en mettant la plaque, préalablement séchée en présence de quelque cristaux d'iode dans un récipient ; fermé ensuite pour saturé de vapeur.
- Atomisation : elle consiste à pulvériser un réactif sur la plaque ; ce qui entraîne une destruction ou une altération permanente des composés.

6.1.6. Paramètre de séparation

Chaque substance est caractérisée par sa mobilité appelée rapport frontal (figure V. 5).

$$Rf = \frac{x}{y} = \text{valeur entre 0 et 1}$$

Le rapport frontal ou rétention frontale (R_f) de chaque composé est défini par le rapport :

x : distance parcourue par le composé (mesure au centre de la tache)

y : distance parcourue par le front de solvant

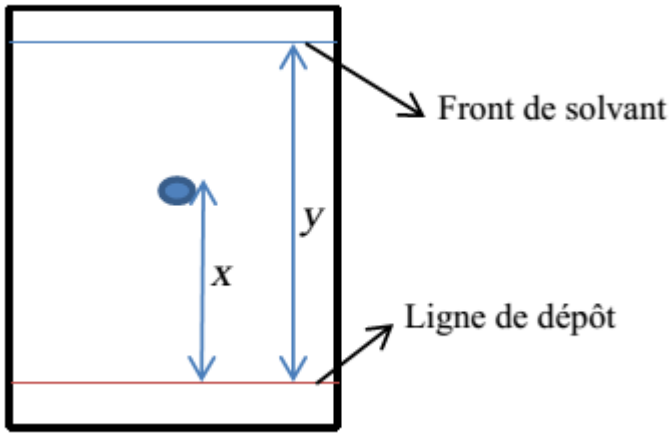


Figure V.5 : Plaque CCM : calcul du rapport

Le R_f d'une substance est une constante et constitue l'une des caractéristiques physiques. On peut donc se servir de cette valeur pour identifier une substance inconnue. Lorsque la polarité de l'éluant augmente, le R_f augmente.

6.1.7. Efficacité d'une plaque CCM

L'efficacité N d'une plaque CCM et la hauteur H de plateau théorique pour un composé est donné par les relations :

$$N = 16\frac{x^2}{w^2} \quad \text{et} \quad H = \frac{x}{N}$$

La résolution est exprimée par la relation :

$$R = 2\ \frac{x_2 - x_1}{w_2 + w_1}$$

W : est le diamètre de spot

Le facteur de rétention k' d'un composé est relié aux distances de migration sur la plaque par la relation suivante :

$$k' = \frac{1}{R_f} - 1$$

6.1.8. Applications

La CCM présente plusieurs applications ; elle permet le contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé organique, le suivi de la réaction chimique ou d'un fractionnement chromatographique sur colonne et la recherche du meilleur solvant, avant d'entamer une séparation sur colonne classique. Elle permet également la purification de petites quantités de produit (jusqu'à 100 mg). La bande qui contient le produit purifié est grattée, puis la silice est extraite avec un solvant.

Le succès de ce mode de chromatographie est dû notamment à la facilité de sa mise en œuvre et à la possibilité de son emploi dans le domaine analytique que dans le domaine préparatif.

6.2. Chromatographie sur Colonne

La chromatographie sur colonne est une méthode préparative qui permet de séparer et d'isoler les constituants d'un mélange. Cette technique est fondée principalement sur des phénomènes d'adsorption et permet de séparer pratiquement tous les mélanges possibles. Il suffit de trouver les bonnes conditions.

6.2.1. Description de la méthode

La phase stationnaire remplit une colonne de longueur et de section variables. Le mélange, en solution très concentrée, est déposé au sommet de la colonne. La séparation des constituants du mélange résulte de l'écoulement continu d'un éluant à travers la colonne par gravité. Dans la technique classique, l'éluant est un solvant unique mais on peut accroître progressivement la polarité de l'éluant de façon à accélérer le déplacement des constituants du mélange.

6.2.2. Phase stationnaire

Une grande surface spécifique de l'adsorbant est souhaitable pour obtenir de meilleures séparations. Les adsorbants les plus utilisés sont :

L'alumine (Al_2O_3) sous forme acide, basique ou neutre. Cet adsorbant ne peut être employé qu'avec des composés organiques stables (l'alumine acide entraîne la déshydratation des alcools tertiaires, l'alumine basique entraîne l'hydrolyse des esters).

L'alumine est un adsorbant polaire ; le constituant le plus polaire sera le plus fortement fixé et c'est le constituant le moins polaire qui sera élué le premier.

Gel de silice (SiO_2), se présente sous forme d'une poudre blanche utilisée en particulier pour séparer des composés organiques qui n'ont pas une stabilité suffisante pour être séparés sur l'alumine. La granulométrie d'un adsorbant employé en chromatographie sur colonne est plus importante que celle d'un adsorbant employé en CCM (80 à 200 μm au lieu de 70 μm). Les adsorbants suivants sont classés selon l'ordre croissant de leurs forces d'interactions avec les composés polaires : papier, cellulose, amidon, sucres, carbonate de sodium, oxyde de magnésium, gel de silice, alumine, charbon activé.

6.2.3. Eluant

L'éluant généralement employé est un mélange de deux solvants. Le plus souvent, au début de l'élution, on commence par le solvant le moins polaire qui entraîne les constituants les moins polaires (les moins retenus par l'adsorbant) ; on augmente ensuite la polarité de l'éluant par addition graduelle du solvant le plus polaire ; on élue ainsi les constituants les plus polaires. Il faut faire des essais sur CCM avec différents éluant pour avoir une bonne séparation entre les produits. Un R_f proche de 0,3 pour le produit le moins polaire.

6.2.4. Vitesse d'élution

La vitesse d'élution doit être la plus constante possible; elle doit être suffisamment lente pour que le soluté soit plus près de l'équilibre entre les phases mobile et stationnaire. Si la vitesse d'élution est trop faible, les constituants diffusent dans l'éluant. Le chromatogramme présente alors des bandes larges et la séparation est médiocre ; une vitesse d'élution élevé n'est autorisée que dans le cas où les substances à séparer ont des polarités très voisines.

6.2.5. Dimension de la colonne

La hauteur de la colonne est égale à sept à dix fois le diamètre intérieur de la colonne. Il faut laisser un espace libre d'environ 10 cm au-dessus de l'adsorbant pour faire couler le solvant. Les colonnes classiques ont à leur base une plaque de verre fritté qui permet l'écoulement libre de l'éluant tout en empêchant le passage de l'adsorbant (Fig.V.6). On peut utiliser une burette, au fond de laquelle on place du coton.

Figure.V.5. Colonne classique

6.2.6. Remplissage de la colonne

L'opération de remplissage de la colonne doit être le plus homogène possible et totalement exempt de toute bulle d'air ou de zone sans phase stationnaire. Les surfaces inférieures et supérieures de l'adsorbant doivent être parfaitement horizontales. Si ces conditions ne sont pas remplies, on aura alors des zones déformées pendant la séparation des composés. Il existe deux modes de remplissage de la colonne.

- **Remplissage par voie humide**:

On prépare dans un bécher, un mélange parfaitement homogène de l'adsorbant et du moins polaire des deux solvants de façon à obtenir une bouillie suffisamment fluide pour couler facilement (on verse l'adsorbant dans le solvant par petites quantités et en agitant). On verse suffisamment de bouillie et on frappe les parois de la colonne pour favoriser le tassement de l'adsorbant.

- **Remplissage par voie sèche:**

On remplit la colonne au deux tiers avec le moins polaire des deux solvants puis on ajoute l'adsorbant en poudre par petites portions successives.

6.2.7. Dépôt de l'échantillon

Si l'échantillon est liquide, il est déposé tel quel. Si l'échantillon est solide, on le dissout dans un minimum du moins polaire des deux solvants. On ajuste d'abord le niveau du solvant pour qu'il soit juste au-dessus de la surface supérieure de l'adsorbant. Ensuite, robinet fermé, on coule l'échantillon (pur ou en solution très concentrée) au sommet de la colonne en essayant de le distribuer de la façon la plus uniforme possible sur les bords de la colonne. On ouvre le robinet un court instant de façon que l'échantillon pénètre dans la colonne et soit adsorbé en une zone cylindrique de faible épaisseur au sommet de la colonne.

6.2.8. Alimentation en solvant

L'alimentation en solvant s'effectue à l'aide d'une ampoule de coulée. On doit s'assurer, durant l'élution, que la surface de l'adsorbant est toujours recouverte de solvant et n'est jamais au contact de l'air. Lorsque débute l'alimentation en solvant, on règle le débit de l'alimentation de façon qu'il soit le même que celui de l'écoulement au bas de la colonne (vitesse de 5 à 50 gouttes par minute). Le volume de chaque fraction recueillie varie de 1 à 50 mL selon les cas. On collecte les fractions et on les analyse (Fig.V.6).

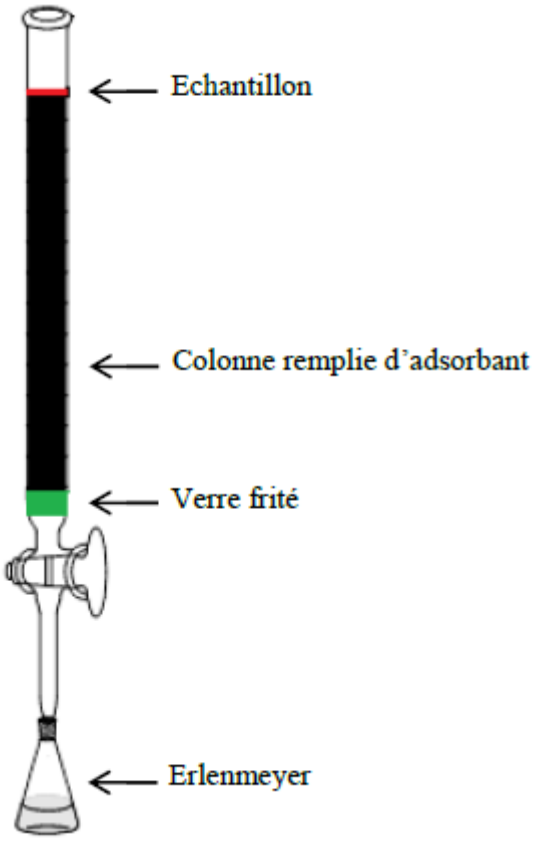


Figure.V.6 : Schéma d'une colonne chromatographique.

6.2.9. Analyse des fractions

Lorsque les composés qui se séparent forment des zones colorées dans la colonne ou sont fortement fluorescents aux U.V, il est facile de les repérer soit directement sur la colonne soit dans les fractions recueillies. La récupération s'effectue alors simplement en réunissant les fractions appropriées et en évaporant le solvant. Si les produits ne sont pas colorés, après une analyse approprié (HPLC, CCM, IR et UV) réunir les fractions correspondant au produit désiré et évaporer le solvant.

La chromatographie sur colonne présente plusieurs inconvénients :

- Elle nécessite une grande quantité d'éluant
- La durée de l'élution est en général très grande (au minimum, plusieurs heures)
- La détection des composés exige une attention constante
- Il est indispensable de coupler cette chromatographie avec d'autres méthodes de façon à pouvoir détecter les constituants du mélange.

Les paramètres influençant la séparation sont :

- ❖ Le diamètre et la hauteur de la colonne

- La quantité de la phase stationnaire et sa granulométrie
- Le débit de l'éluant et sa polarité

6.3. La chromatographie d'adsorption

6.3.1. L'adsorption

L'adsorption est un phénomène physico-chimique qui consiste en la fixation d'une substance à l'état liquide (ou gaz) sur une surface solide. Ce phénomène fait intervenir des forces complexes entre le soluté et l'adsorbant : forces électrostatiques, forces de liaison d'hydrogène et autre. Pour que cette adsorption soit utilisable à des fins préparatoires, il faut que cette fixation soit réversible. La désorption consiste à remettre, à l'aide d'un éluant approprié la substance en solution par rupture des liaisons précédentes.

6.3.2. Définition de la chromatographie d'adsorption

La chromatographie liquide solide appelée aussi chromatographie d'adsorption met en œuvre des phases stationnaires ayant des propriétés adsorbants, principalement les gels de silice poreuse et les gels d'alumine. Cette technique est complémentaire à la chromatographie de partage phase en normale. La séparation est fondée sur les différences d'adsorption des molécules du mélange sur cette phase, donc basée sur l'existence de dipôles dans une structure moléculaire.

6.3.3. Les adsorbants

Les adsorbants sont sous forme de fines granulométries 3 à 20 μm. La séparation est meilleure, mais plus lente si les grains sont fins. Plus un adsorbant est actif, plus il retient fortement les composés polaires. La séparation se fait par ordre croissant de leurs forces d'interaction avec les composés polaires. On distingue :

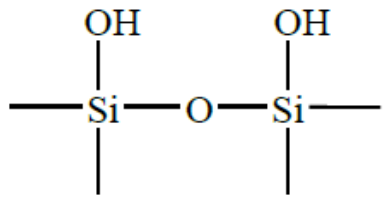
- Les supports pelliculaires : constitués de billes de verre avec un diamètre moyen de 40 μm recouvertes d'une pellicule d'adsorbant de 2-3 μm d'épaisseur.
- Les supports entièrement poreux, caractérisés par une grande capacité (100 fois plus grandes que celle des supports pelliculaires)

La surface spécifique des adsorbants correspond à leur surface d'adsorption par unité de masse. Elle est liée à leur granulométrie et à leur porosité. Une grande surface spécifique est souhaitable car elle permet d'obtenir de meilleures séparations. Les adsorbants les plus couramment utilisés sont :

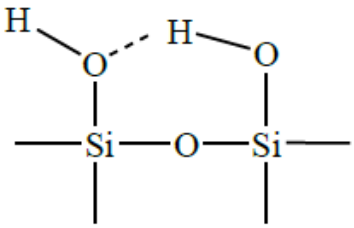
❖ **Silice (SiO_2)**

La silice provient de la déshydratation de l'acide silicique, elle se présente sous forme d'une poudre blanche de très fine granulométrie. Le mécanisme de rétention sur cet adsorbant résulte de la présence à la surface, de groupes silanols (-OH) et de groupes siloxanes (-O) qui expliquent sa polarité, son caractère acide et la possibilité de former des liaisons hydrogènes.

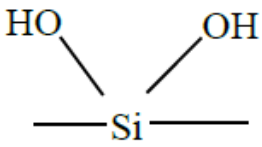
Les groupes silanol sont de trois types :



silanols libres



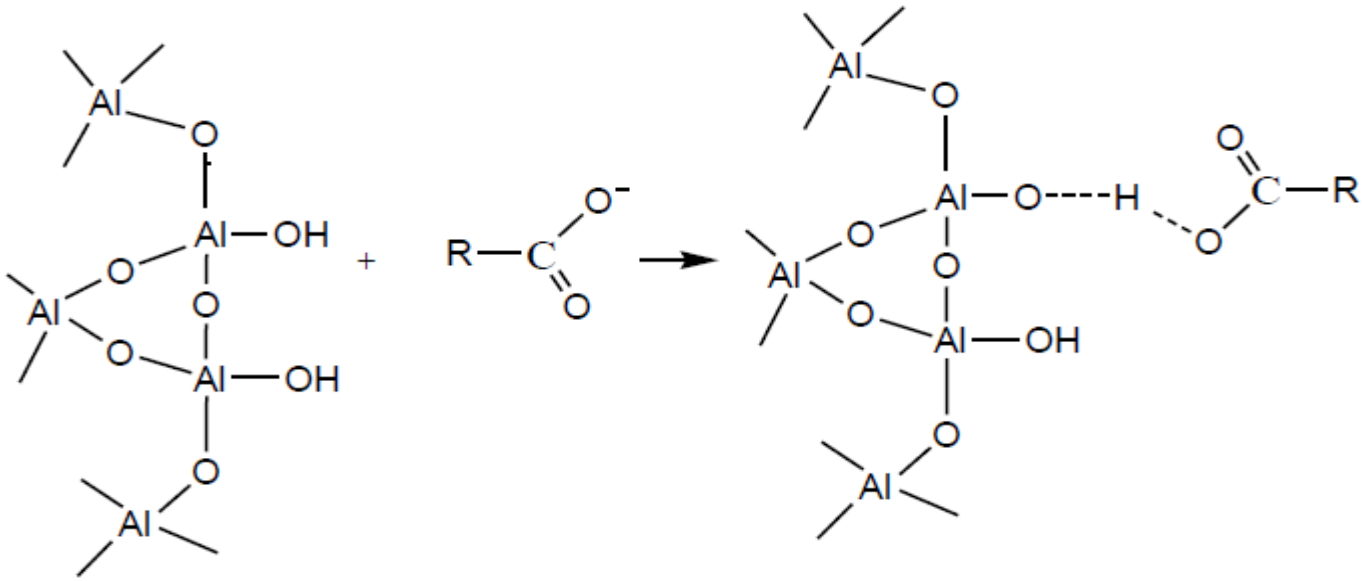
silanols lié à liaison hydrogène



silanols géminaux

❖ **Alumine (Al_2O_3)**

cet adsorbant est très utilisé car il présente de très bonnes propriétés d'adsorption, il s'obtient par déshydratation de l'hydroxyde $Al(OH)_3$; cet adsorbant est dit basique. L'alumine convient bien pour la séparation de solutés acides (acides carboxyliques).



Les molécules polaires sont toujours plus adsorbées que les molécules non polaires. Les groupements fonctionnels classés selon un ordre de polarité décroissante sont fournis dans la liste ci-dessous :

Amides > amines > acides carboxyliques >alcools > cétones > esters > composés nitrés >éthers > hydrocarbures aromatiques > hydrocarbures non saturés > hydrocarbures saturés.

La silice convient pour les solutés qui sont des bases (les amines aliphatiques et aromatiques). Inversement, l'alumine convient bien pour la séparation des solutés acides comme : les phénols et les acides carboxyliques. Pour ces deux supports les molécules polaires sont toujours les plus adsorbés.

Pour des molécules très polaires la chromatographie d'adsorption n'est pas adéquate car il y a une très forte rétention d'où la nécessité d'utiliser la chromatographie de partage.

6.3.4. Phase mobile

Il faut que le soluté soit soluble dans l'éluant pour que la migration se fasse et il est possible de faire des mélanges de solvants pour changer sa polarité. Sous réserve de leur miscibilité et de leur compatibilité avec le système de détection pour obtenir de bonne séparation.

La plupart des séparations chromatographiques s'effectuent en adaptant la polarité de la phase stationnaire à celle du soluté; on utilise par contre une phase mobile dont la polarité est extrêmement différente.

Moins un composé est polaire, moins il s'accroche à l'adsorbant, plus il migre avec l'éluant et plus un composé est polaire, plus il s'accroche à l'adsorbant, moins il migre avec l'éluant. Plus de 90% des séparations en chromatographie d'adsorption utilisent un mélange hexane ou isooctane avec l'éther isopropylique soit le chlorure de méthylène, acétonitrile et méthanol.

6.3.5. Applications

La chromatographie d'adsorption s'applique pour la séparation des composés apolaires de masses moléculaires inférieure à 3000. Elle est très utile pour les isomères, tels que les dérivés du benzène substitués en méta et en para et complémentaire à la chromatographie de partage en phase normale

6.4. La chromatographie d'échange d'ions

La chromatographie ionique (CI) est une technique analytique qui permet l'analyse qualitative (par séparation des espèces présentes) et quantitative des espèces ioniques présentes dans un échantillon liquide dépourvu de matières en suspension.

6.4.1. Principe de la méthode

En chromatographie ionique le mécanisme de séparation se produit par échange d'ions entre une phase stationnaire, qui porte des groupements fonctionnels chargés et une phase mobile. Des gels de silice chimiquement modifiés à l'état solide remplissent une colonne d'acier et servent de phase stationnaire.

Un échangeur d'ions est une substance, généralement poreuse, sur laquelle est greffé (fixé), par liaison covalente, un groupement chimique ionisable. Cette partie chargée peut interagir fortement avec des ions présents dans le mélange chromatographié. Ainsi des molécules chargées peuvent s'adsorber réversiblement sur l'échangeur d'ions, et être ensuite désorbées de la résine, en modifiant la composition ionique du solvant. On peut résumer le processus comme suit : dépôt des substances sur la colonne choisie en fonction des charges des molécules et de la résine, élution des molécules généralement en augmentant de façon graduelle la force ionique et enfin régénération de l'échangeur d'ions (par lavage avec une solution de pH permettant de remettre les charges dans leur valeur initiale).

6.4.2. La phase stationnaire

La phase stationnaire dans la chromatographie ionique est une résine (polymère insoluble préparé sous formes de billes) échangeuse d'ions contenant des groupements chargés positivement ou négativement permettant la rétention des espèces dont on désire obtenir la séparation. Le soluté ionique ou ionisable interagit avec les groupes de charges opposées de la phase stationnaire.

- l'échangeur d'ions comporte deux parties : Les groupements fonctionnels qui lui confèrent ses propriétés et la matrice (support fixe) sur laquelle ces derniers sont greffés.

Les groupements fonctionnels sont fixés par des liaisons covalentes sur la matrice; ils sont de deux types :

Les échangeurs de cations portent des groupements chargés négativement (-) Résine anionique (échangeur de cations) : l'échange se fait suivant l'équation :

$$\text{Résine-G}^- / \text{H}^+ + \text{cation}^+ \rightleftharpoons \text{Résine-G}^-/\text{cation}^+ + \text{H}^+$$

- les échangeurs d'anions portent des groupements chargés positivement (+)

Résine cationique (échangeur d'anions): l'échange se fait suivant l'équation :

$$\text{Résine-G}^+ / \text{OH}^- + \text{anion}^- \rightleftharpoons \text{Résine-G}^+/\text{anion}^- + \text{OH}^-$$

Chaque type d'échangeur se divise en deux groupes :

1. échangeur fort : reste pleinement chargé entre pH 3 et 10

2. échangeur faible : reste chargé dans une gamme de pH restreint.

Le groupement sulfonate $-SO_3^-$ est un échangeur cationique fort. L'affinité de la résine sulfonate pour un cation augmente avec la charge de celui-ci et entre anions de même charge, l'affinité augmente avec le Z de l'élément. L'ordre d'affinité pour un groupement sulfonate est :

$Ba^{+2} > pb^{+2} > Sr^{+2} > Ca^{+2} > Cd^{+2} > Cu^{+2} > Co^{+2} > Zn^{+2} > Mg^{+2} > Tl^{+1} > Ag^{+} > Cs^{+} > Rb^{+} > K^{+} > NH_4^{+} > Na^{+} > H^{+} > Li^{+}$

L'acide carboxylique ($G- = COO^-$) chargé à partir de pH 4,5 est un échangeur cationique faible. Le groupement ammonium quaternaire $-NR_3^+$ est un échangeur anionique forts car leur capacité d'échange est constante et indépendante du pH. L'ordre d'affinité pour l'ammonium quaternaire est :

$Citrate > SO_4^{-2} >$ oxalate$> I^- > NO_3^- > Br^- > SCN^- > Cl^-$ > formiate > acétate > $OH^- > F^-$

On utilise les échangeurs d'anions forts pour séparer des acides faibles (acides carboxyliques) et les échangeurs faibles pour séparer des acides forts. Le même type de raisonnement s'applique aux échangeurs de cations. En générale la résine préfère les ions porteuses de la charge la plus grande et pour les ions de plus petite dimension. Le pH agit sur la rétention, surtout pour des échangeurs anioniques ou cationiques faibles.

Exemple :

- ✓ Diminuer le pH, diminue l'ionisation des échangeurs des cations faibles.
- ✓ Augmenter le pH, peut diminuer l'ionisation d'échangeurs des anions faibles
- ✓ Echangeurs anioniques ou cationiques forts, pas d'influence du pH sur temps de rétention.

6.4.3. Les supports

Les supports peuvent être de deux types: minéraux comme la silice et organiques comme la résine polystyrénique, cellulose, dextrane. Les caractéristiques des supports sont :

Porosité : le support est un polymère plus ou moins réticulé. La porosité dépend du taux de pontage : un polymère très réticulé a des pores de petite taille et convient pour des petites molécules.

Granulométrie : le support est commercialisé sous forme de grains de diamètre variant de 30 à 800 µm (chromatographie basse pression) celui des colonnes HPLC a une granulométrie de 5-10 µm (supports totalement poreux) ou légèrement supérieure (supports pelliculaires, en couche de 1 µm sur des billes de verre). Les échanges sont d'autant plus rapides et efficaces que les grains sont petits.

Capacité de rétention : c'est la quantité maximale d'ions que peut fixer l'échangeur d'ions, exprimée en mEq/g (milliéquivalent par gramme) de résine sèche ou en mEq/mL de poidsde résine humide. Elle dépend de la densité du support en groupements fonctionnels et il faut en tenir compte pour ne pas trop charger une colonne. L'affinité d'un échangeur pour un ion donné dépend de plusieurs facteurs:

1. de la charge des groupements fonctionnels, qui elle-même dépend : de leur nature (pKa)

- ♦ du pH de la solution : un tampon maintient le pH constant tout au long de l'analyse. Il maintient une charge identique sur la résine. L'ion du tampon utilisé, ayant le signe contraire à la charge de la résine, est présent au moment du dépôt de l'échantillon (conditionnement)
- ♦ de la densité de charge de l'ion considéré, qui dépend: de la nature de l'ion (pKa, pHi)
- ♦ de la taille de l'ion (l'ion est d'autant plus fixé qu'il est chargé, ou/et qu'il est petit)
- ♦ de la concentration des ions : Les concentrations agissent sur la position de l'équilibre. Une concentration élevée en ions, même de faible affinité, pourra éluer l'ion fortement retenu.

2. de l'accessibilité des groupements fonctionnels (porosité et granulométrie)

6.4.4. La phase mobile

La phase mobile est une solution aqueuse de force ionique donnée (généralement un tampon de pH). On peut éluer avec une solution de composition constante (conditions isocratiques) ou avec un gradient de pH et (ou) de force ionique, pour décrocher successivement les différents ions fixés sur l'échangeur. Toutefois, il peut être nécessaire d'utiliser des mélanges de solvants polaires (méthanol-eau) afin d'optimiser une élution ou faciliter la solubilité de certain solutés. Le pH est paramètre principal de rétention. Pour un acide faible, une augmentation de pH se traduit par :

$$AH \rightleftharpoons A^- + H^+$$

par un déplacement de l'équilibre vers la gauche, l'acide AH étant peu (ou pas) retenu. Avec les acides aminés, on utilise une colonne échangeuse de cations (polystyrène sulfoné). On se place initialement dans des conditions de pH (≈2) pour lesquelles tous les acides aminés sont sous la forme :

$$\begin{array}{c} {}^{+}NH_3\text{-}CH\text{-}COOH \\ R \end{array}$$

6.4.5. Détection

Un détecteur de conductivité est souvent utilisé avec ce type de chromatographie vu la nature ionique des analytes. Chaque ion peut donner un signal de conductivité, selon sa concentration en solution et sa conductivité (figure.V.7). Une colonne de neutralisation ou de suppression de l'éluant est habituellement combinée à ce type de détecteur afin de supprimer la conductivité de l'éluant sans affecter celle de soluté donc transforme les ions de l'éluant en une espèce moléculaire peu dissociée.

La détection par ampérométrie est appropriée pour les solutés, dont les produits d'oxydation se déposent à la surface des électrodes de mesure. Il s'agit notamment d'hydrates de carbone (sous forme ionique à des valeurs élevées de pH) ainsi que la plupart des composés sulfurés comme les thiols. La détection photométrique

concerne la plupart des acides et amines aromatiques ou hétérocycliques comme l'acide benzoïque, l'aniline ainsi que les nitrates, les iodures et sulfites.

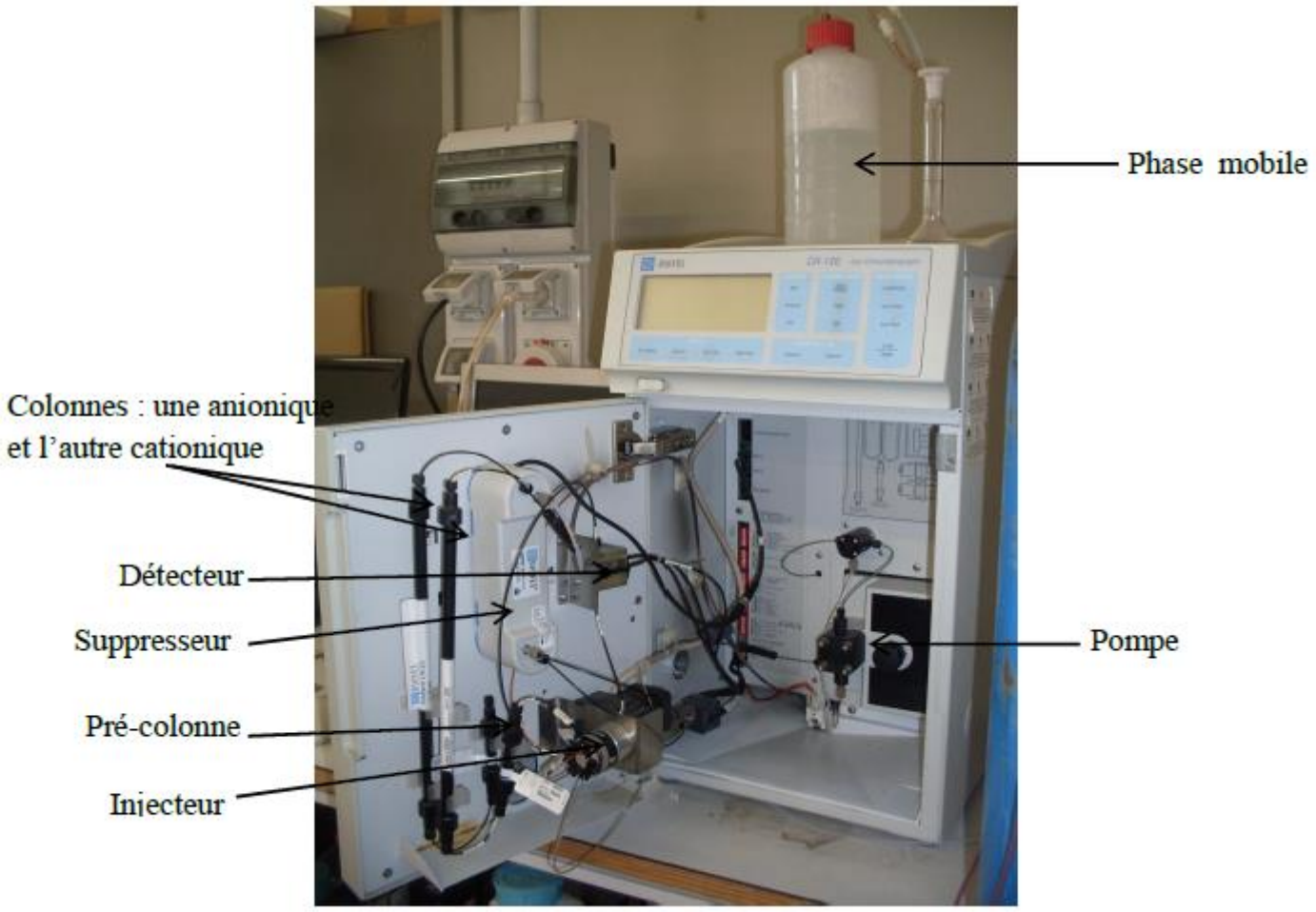


Figure.V.7. Les composants d'un chromatographe ionique (appareil Dionex)

6.4.6. Applications

La chromatographie d'échange d'ions est utilisée pour séparer des molécules ionisables, quelle que soit leur taille: ions minéraux (tous les cations alcalins, alcalino-terreux ou métalliques), acides aminés, peptides, protéines, nucléotides, acides nucléiques, glucides ionisés et lipides ionisés. C'est une méthode analytique de référence en analyse des eaux, et est adaptée aux milieux biologiques.

6.5. Chromatographie de partage

La chromatographie de partage fonctionne par partage de solutés entre deux phases non miscibles ; l'une mobile et l'autre stationnaire. La phase stationnaire est un liquide qui imprègne un support en principe inerte ou est greffée par liaison chimique covalente sur ce support. Cette technique s'apparente à l'extraction liquide/liquide basée sur les différences de solubilités dans deux phases non miscibles, mais dans ce cas une des deux phases est immobilisée sur un solide dont les particules ont des diamètres très petits. Il s'établit un équilibre qui dépend de la solubilité relative du soluté dans les deux solvants donc du coefficient de partage.

L'équilibre de répartition du soluté entre les deux phases mobile et stationnaire s'exprime par l'équation:

$$\mathbf{K}=\frac{C_S}{C_M} \text{ et } \mathbf{k'}=\frac{V_S}{\mathbf{VM}}$$

K : coefficient de distribution ou de partage qui dépend de la nature des constituants.

k' : facteur de capacité

V_S: volume de la phase stationnaire contenue dans la colonne

V_M : volume de la phase mobile contenue dans la colonne

C_M et C_s: concentrations respectives du soluté dans la phase mobile et dans la phase stationnaire.

La séparation de deux ou plusieurs corps sera d'autant efficace que leurs coefficients de partage respectifs seront différents.

Il y'a deux modes de chromatographie de partage :

Mode a. La phase stationnaire est polaire (mode normal) et la phase mobile est un solvant non polaire.

Si on a deux composés qui sont mal séparé en phase normale, donc on doit augmenter le temps de rétention en diminuant la force de la phase mobile donc diminuer la polarité de la phase mobile.

Mode b. La phase stationnaire est apolaire (mode inverse) et la phase mobile est un solvant polaire. L'ordre d'élution dépend de la polarité des solutés :

Le temps de rétention augmente avec une augmentation de la polarité du produit étudié.

Si on a deux composés qui sont mal séparé en phase inverse, donc on doit augmenter le temps de rétention en augmentant la force de la phase mobile donc augmenter la polarité de la phase mobile.

Dans le cas d'un échantillon composé de solutés de polarités différentes l'utilisation d'un gradient d'élution est recommandée.

6.5.1. Support

Ce sont des solides très finement divisés qui présente une très grande surface, afin de retenir sous un petit volume une grande quantité de phase liquide.

Parmi les supports les plus utilisés, on peut citer :

- Le gel de silice
- Terre diatomées
- La poudre de cellulose et un certain nombre de polymères synthétiques dérivés du vinylbenzène.

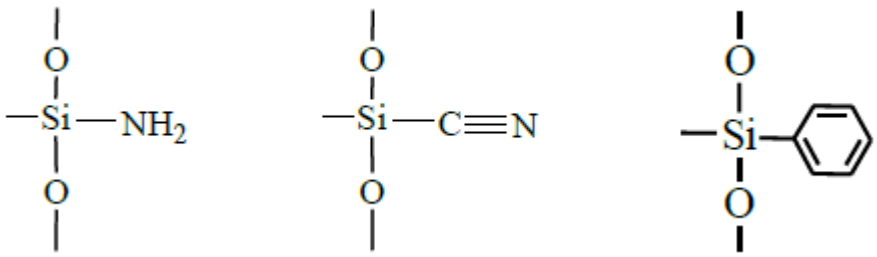
6.5.2. Phase stationnaire

On peut subdiviser la chromatographie de partage en chromatographie liquide-liquide et liquide-phase greffée ; la différence résidant dans la manière dont on fixe la phase stationnaire sur les particules du support. Dans la chromatographie de partage liquideliquide, le liquide est fixé par adsorption physique sur la surface du support, alors qu'il est attaché par liaison chimique dans la chromatographie à phase greffée. On a développé l'usage de phase stationnaire chimiquement liées (greffées) en raison de leur plus grande stabilité.

Selon la polarité de la phase stationnaire et mobile on peut distinguer :

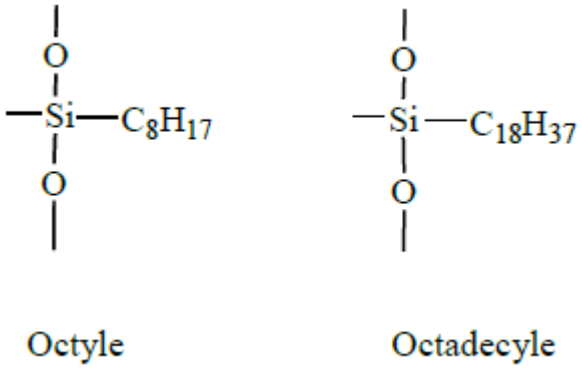
- **Phases greffées polaires (phase normale)**

La présence de fonctions particulières sur le greffage (-CN, -NH_2,…) peut apporter une sélectivité intéressante. De plus, il est possible de travailler avec un gradient de force éluant, donc d'analyser en une seule fois des mélanges contenant des composés de polarités très différentes. En chromatographie à phase normale, le constituant le moins polaire est élué le premier ; l'augmentation de polarité de la phase mobile réduit son temps d'élution.



- **Phases greffées apolaires (phase inverse)**

Ce sont les supports les plus couramment utilisés, principalement avec un greffage alkyl (octadécylsilane ou -ODS ou -C18). Dans ces systèmes, le solvant le plus polaire (l'eau) est le moins éluant et la force éluante de la phase mobile est augmentée par ajout d'un solvant organique (méthanol, acétonitrile), le constituant le plus polaire est élué le premier et l'augmentation de polarité de la phase mobile allonge son temps d'élution.



Octyle Octadecyle

6.5.3. Phase mobile

L'éluant doit être immiscible à la phase stationnaire. La polarité de la phase mobile a une grande influence sur le coefficient de partage des solutés, elle est constituée d'un mélange :

Eau/ solvant organique, en proportion variable.

La phase aqueuse : l'eau est le solvant le plus polaire

Le solvant organique : Il existe un grand nombre mais les plus employés sont l'acétonitrile et le méthanol. Il est parfois intéressant de modifier la polarité de la phase mobile en lui ajoutant, en mode normale, une substance plus polaire ou en mode inverse une substance moins polaire.

Le pouvoir éluant croissant des solvants est le suivant:

Ether de pétrole < cyclohéxane < tétrachloroéthène < trichloroéthane < dichlorométhane < étherdiéthylique < trichlorométhane < éthanoate d'éthyle < pyridine < propanone < éthanol < eau < acide éthanoïque.

6.5.4. Applications

De nombreux pesticides de polarité variée peuvent être analysés par chromatographie de partage en phase inverse. Elle convient également à la séparation de molécules très polaires, mal séparés par chromatographie d'adsorption.

6.6. La chromatographie liquide haute performance (HPLC)

6.6.1. Introduction

La chromatographie liquide haute performance appelé (CLHP) ou (HPLC) est une technique instrumentale qui permet de séparer les composants d'un mélange non volatile, thermosensible, de polarité élevée afin de les identifier et les quantifier. Elle met en œuvre, selon la nature de la phase stationnaire, des phénomènes de partage, d'adsorption, d'échange d'ions ou d'exclusion. Son développement très rapide, à partir de 1970, réside dans le fait qu'elle n'a pas les inconvénients de la chromatographie liquide classique ; cette dernière a toujours été peu utilisée, en raison de la lenteur de la séparation ; de l'absence de détecteur qui aurait permis de suivre facilement le développement de chromatogramme et la quantité considérable d'échantillon nécessaire.

6.6.2. Principe

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. C'est ce que l'on a appelé la chromatographie liquide sous haute pression (HPLC). Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme. Le signal du détecteur est amplifié et enregistré, la température du four est maintenue constante.

Quatre types sont couramment employés en fonction de la nature de la phase stationnaire.

- Chromatographie d'adsorption
- Chromatographie de partage: c'est la plus utilisée des techniques avec une phase stationnaire apolaire
- Chromatographie d'échange d'ions
- Chromatographie d'exclusion : également appelée à "perméation de gel".

6.6.3. Appareillage

Schéma du principe du fonctionnement du chromatographe en phase liquide haute performance (HPLC) est représenté dans la figure V.6.

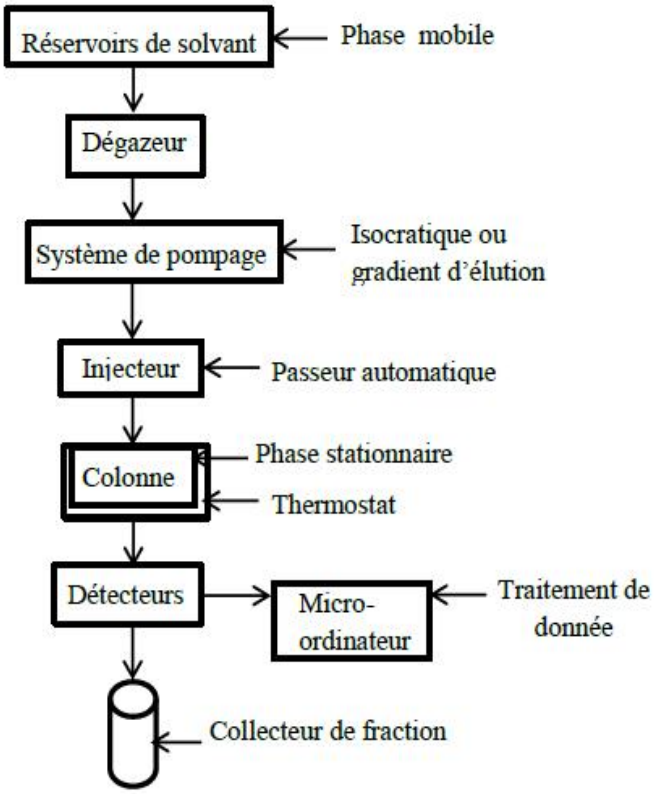


Figure V.6 : Schéma d'un système d'HPLC (Appareil Dionex).

a) Réservoir de solvants (éluant)

Le solvant utilisé doit nécessairement :

- Maintenir la stabilité de la colonne
- Etre compatible avec le détecteur
- Solubiliser suffisamment l'échantillon et ne pas gêner sa récupération.

Il est recommandé de toujours employer des solvants traité spécifiquement pour HPLC. Ils doivent être dégazé et filtré avant usage sur filtre spécial (0,45 µm). Le choix du solvant constitue habituellement la partie la plus difficile de ce type de chromatographie. Il est préférable de faire quelques essaies en CCM.

b) Dispositif de dégazage

Durant le pompage, dans la chambre de mélange ou dans la colonne elle-même, si les solvants ne sont pas dégazés, l'air dissout dans le liquide soumis à de forte pression, forme des bulles à l'intérieur du système, c'est l'inconvénient majeur pour le fonctionnement de la plupart des détecteurs en particulier ceux qui utilisent des propriétés optiques. En règle générale, plus le liquide est polaire, plus la tendance de l'air à se dissoudre est

forte. Il convient donc d'éliminer au maximum l'azote et l'oxygène qui peuvent être présents. Le dégazage de la phase mobile se fait par barbotage d'hélium, par ultrasons ou par un dégazeur.

c) Pompe

Elle est munie d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. Elle permet de travailler:

- ❖ en mode isocratique, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.
- ❖ en mode gradient, c'est-à-dire éluant de composition variable. L'élution gradué lors de la séparation de mélanges complexes permet, en modifiant la composition de l'éluant, d'optimiser les facteurs de capacité et de réduire les temps d'analyse. Les pompes les plus utilisées sont les pompes de types piston avec lesquelles les débits sont constants, la pression peut atteindre environ 500 bars.

d) Injecteur

L'injection d'un volume précis de l'échantillon en tête de colonne doit se faire à l'aide une vanne (boucle d'échantillonnage) (figure V.7) : on introduit d'abord l'échantillon dans une boucle de volume connu (position chargement ou Load) après rotation de la vanne de 60° d'un levier qui permet d'inverser le sens de circulation dans la boucle (position Inject), la phase mobile entraîne l'échantillon en tête de la colonne ; le volume injecté est constant, cela permet donc de travailler en étalonnage externe pour une analyse quantitative. Le volume prélevé avec la seringue est donc toujours largement supérieur à celui de la boucle. Aujourd'hui on utilise des injecteurs automatiques.

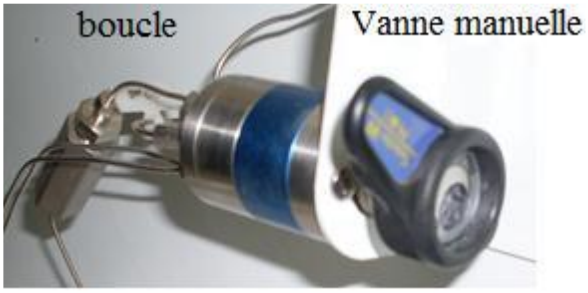


Figure V.7 : Injecteur à boucle.

e) Colonne

Les colonnes HPLC sont généralement courtes et droites en acier inoxydable se caractérise par leur géométrie (diamètre intérieur de 4 mm et une longueur de 5 à 30 cm) et par la nature des phases qu'elles contiennent (figure V.8). Elles doivent capables de résister aux fortes pressions. Le débit de la phase mobile ne peut dépasser quelques mL/min. Ces colonnes ont l'avantage de la rapidité de l'analyse, consomment moins de solvant et conduisent à une meilleure résolution de l'analyse. Dans la plupart des analyses une précolonne ou

colonne de garde qui ne diffère de la colonne analytique que par sa très faible longueur (1 à 2 cm pour une colonne de 25 cm) permet de protéger la colonne et d'en augmenter la durée de fonctionnement.

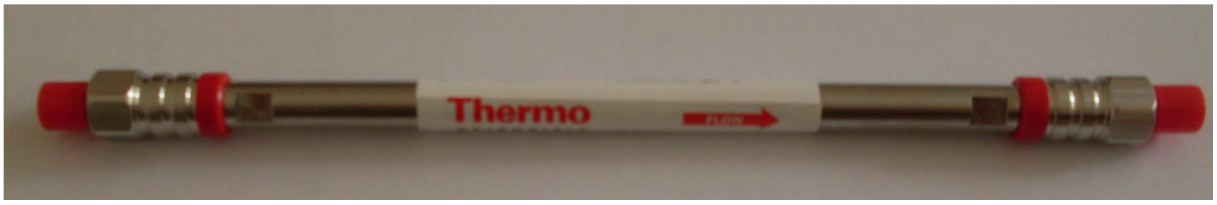


Figure V.8 : Colonne HPLC.

f) Détecteurs

Le détecteur suit en continu l'apparition des solutés. Pour détecter, on utilise différents phénomènes physico-chimiques. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps. Généralement, on compare le signal obtenu pour la phase mobile et le soluté à celui de la phase mobile seule.

Il existe plusieurs détecteurs utilisés en HPLC :

- ❖ réfractomètre différentiel
- ❖ UV à barrette de diodes
- ❖ Electrochimique
- ❖ fluorimétrique...

Ainsi que différents types de couplage :

- o Spectrométrie infrarouge
- o Spectrométrie de masse
- o Résonance Magnétique Nucléaire...

6.6.4. Applications

La HPLC est utilisée pour séparer et doser des espèces diverses d'analytes : inorganiques, organiques et biologiques.

6.7. La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique très répandue, dont les premières applications sont maintenant vieilles de plus de 60 ans. Son développement qui n'a cessé depuis, est dû à son extrême sensibilité, à sa polyvalence, à la rapidité de mise au point des analyses nouvelles et aux possibilités d'automatisation, qui augmentent encore plus son intérêt. La séparation sur la colonne se faisant sur des composés qui doivent être à l'état gazeux, l'analyse des liquides ou solides impose de pouvoir les transformer à l'état de vapeur par chauffage. C'est sans doute la principale contrainte à laquelle il faut penser avant de choisir cette technique, puisqu'elle limite son emploi à l'étude des composés moléculaires thermostables et

suffisamment volatils. La très grande sensibilité des détecteurs permet de déceler des quantités de l'ordre du picogramme pour certains composés. Les applications sont très nombreuses dans tous les domaines et les développements de la chromatographie gazeuse à grande vitesse ou multidimensionnelle rendent cette technique toujours plus attractive.

6.7.1. Définition

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique de séparation applicable aux composés gazeux ou susceptible d'être volatilisés par élévation de température sans décomposition (dont la masse moléculaire M<300) ; les constituants peuvent différer par leur nature et leur volatilité. La séparation exige des quantités de l'ordre de mg seulement ; parfois même de µg.

On distingue selon la phase stationnaire :

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

6.7.2. Principe de la technique et appareillage

En CPG, la phase mobile est un gaz, ce fluide traverse une colonne renfermant des granulés poreux qui constitue la phase stationnaire. Lorsque un échantillon à analyser est injecté et vaporisé ; ces constituants sont entrainés à des vitesses inégales par la phase mobile, à la sortie de la colonne se trouve un détecteur relié à un enregistreur. L'appareillage employé pour effectuer la séparation est un chromatographe dont la figure V.9 présente schématiquement les principaux éléments.

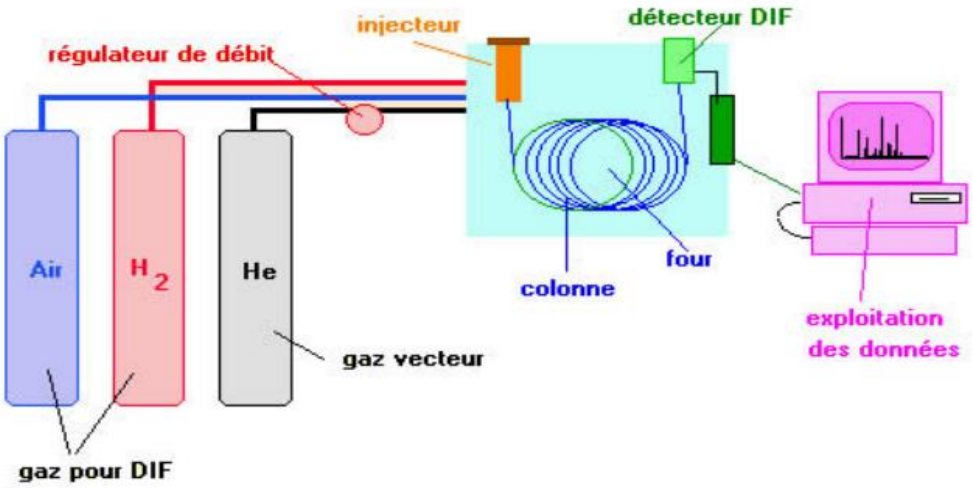


Figure V.9 : Schéma simplifié d'un chromatographe en phase gazeuse.

DIF : Détecteur à ionisation de flamme.

A. Gaz vecteur (phase mobile)

L'élution est assurée par un flux de gaz inerte appelé gaz vecteur ou porteur (phase mobile). Le gaz vecteur doit être pur, inerte (il ne doit pas réagir avec les constituants du mélange à séparer) et le moins miscible possible avec la phase stationnaire. L'hélium est le gaz porteur le plus courant, bien que l'on utilise aussi l'argon, l'azote et l'hydrogène. Le choix du gaz vecteur est conditionné par l'efficacité de la séparation et la sensibilité du détecteur.

- Catharomètre : N_2, H_2, He
- Capture d'électron : N_2 ou H_2
- ionisation de flamme : N_2

Il n'y a pas d'interaction entre le soluté et la phase mobile en CPG.

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

B. Échantillons

Les limites de sensibilité sont, selon les appareils, de l'ordre du nanogramme et même du picogramme. Le traitement de l'échantillon varie selon les substances analysées :

- Lorsque les solutés sont directement volatilisables, les substances sont solubilisées dans

un solvant et chromatographiées.

- Lorsque les solutés ne sont pas volatils à la température du chromatographe ou bien sont décomposés à cette température, il faut les transformer en dérivés volatils stables : les acides aminés sont ainsi estérifiées par le butanol, les acides gras estérifiés par le méthanol, les oses réduits en alditols, puis acétylés,…

C. Injecteur

Le système d'injection permet l'introduction de l'échantillon dans le chromatographe, par l'intermédiaire d'une micro-seringue dont la capacité varie habituellement de 1 à 10 μL. Le système d'injection joue plusieurs rôles, que l'échantillon se trouve sous forme solide, liquide ou gazeux:

- Rôle d'interface qui permet d'introduire l'échantillon dans le chromatographe
- Rôle de système de vaporisation (dans le cas d'un échantillon liquide ou solide)
- Rôle d'organe de transfert dans la colonne chromatographique.

Il y'à plusieurs mode d'injections :

❖ **Injection par vaporisation directe**

L'introduction du mélange se fait par l'intermédiaire d'une micro seringue dont le volume varie généralement de 1 à 10 µl et dont l'aiguille a un diamètre de l'ordre de 0,15 mm à travers un diaphragme, ou septum, en élastomère dans une chambre à vaporisation instantanée située au sommet de la colonne. La chambre d'injection est habituellement maintenue à environ 50°C au-dessus du point d'ébullition du constituant le moins volatil de l'échantillon. Ce système est conçu pour les colonnes remplies.

❖ **Injection « split/splitless »**

Les systèmes d'injection pour colonnes capillaires sont:

- les diviseurs d'entrée ou splitter (split)
- le splitless

Il s'agit d'injecteurs pouvant fonctionner suivant deux modes, avec ou sans division (encore appelés split ou splitless).

En mode split : le gaz vecteur arrive avec un grand débit dans la chambre de vaporisation ; une vanne de fuite sépare le courant gazeux en deux parties dont la plus petite est la seule à pénétrer dans la colonne. Seulement 1% de l'échantillon injecté passe réellement sur la colonne. L'autre partie (99%) s'échappe par un système de fuite. Ce mode est utilisé dans le cas des colonnes capillaires à faible débit.

L'inconvénient de ce mode d'injection est l'évaporation sélective des composés les plus volatils avec modification de la composition réelle de l'échantillon injecté.

Le mode splitless : la solution injectée est volatilisé puis entraîner dans les premières spires de la colonne capillaire où elle se condense. L'injecteur est ensuite balayé par le gaz vecteur qui élimine l'excès de solvant. Ce procédé est réservé aux échantillons très dilués.

D. Four

Le four est une enceinte thermostatée dans laquelle se trouve la colonne possédant un système de ventilation (figure V.10). Au lieu de maintenir la température constante on peut l'astreindre à suivre une loi de variation donnée, généralement linéaire, pour obtenir une chromatographie à température programmée.

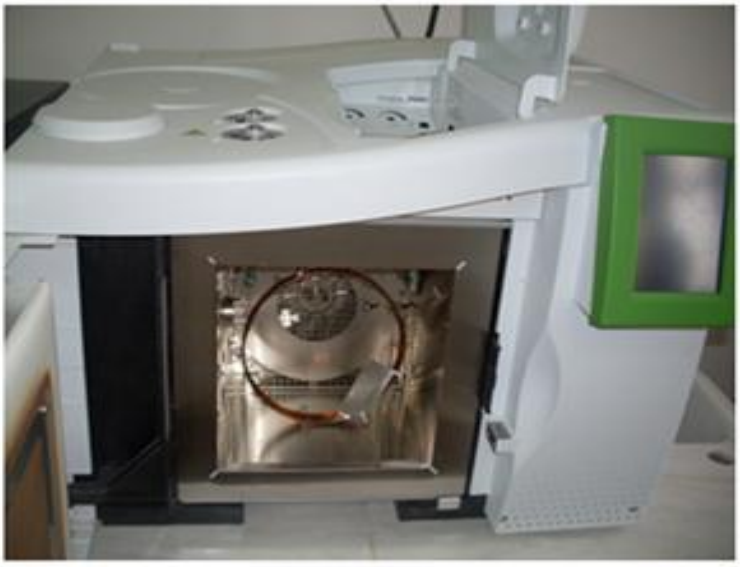


Figure V.10. photo d'un four de chromatographie en phase gazeuse.

E. Colonne

On distingue deux types de colonnes.

- **Colonne remplie (à garnissage)**

Existant depuis les débuts de la CPG, elles sont faites avec des tubes spiralés le plus souvent en acier ou plus rarement en verre, de diamètre intérieur de 2 à 6 mm, ont une longueur comprise entre 1 et 3 m et sont enroulées sous forme hélicoïdale. Elles sont remplies d'un support poreux, inerte et stable à température élevée, imprégné de 5 à 20% de phase stationnaire (figure V.11 et 12). Le support le plus utilisé est la terre de diatomées (silicates fossiles).

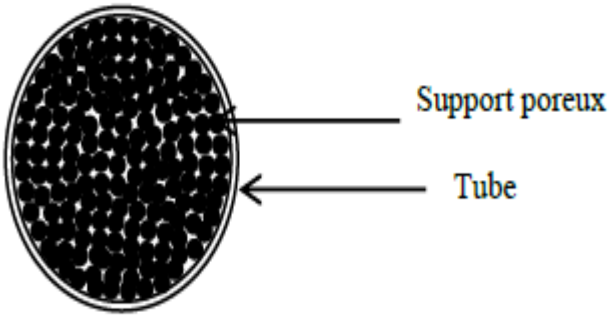


Figure V.11. Colonnes remplies.

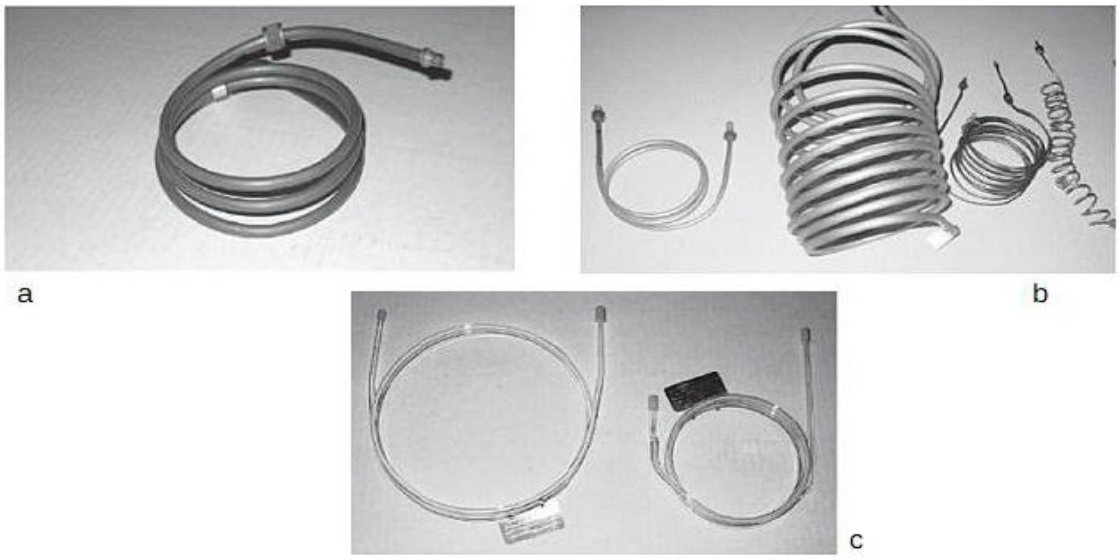


Figure. V.12. Photo colonnes remplies : a) en Cuivre; b) en Aluminium c) en Verre.

- **Colonne capillaire**

Les colonnes capillaires ont un diamètre interne variant entre 0,05 et 0,35 mm et une longueur comprise entre 10 et 50 m enroulés on spirale. Elles sont revêtues d'une couche de polymère ou d'un film d'aluminium et sont enroulées sur un support métallique cylindrique léger, en forme de cage. Il n'y a alors pas de remplissage: la phase stationnaire ou l'adsorbant est déposée ou greffée sur la paroi interne de la colonne (sur la figure V. 13) on observe la phase stationnaire déposée sur le métal). La faible quantité de phase stationnaire permet des analyses rapides mais impose l'injection d'une quantité très faible d'échantillon <1µg.

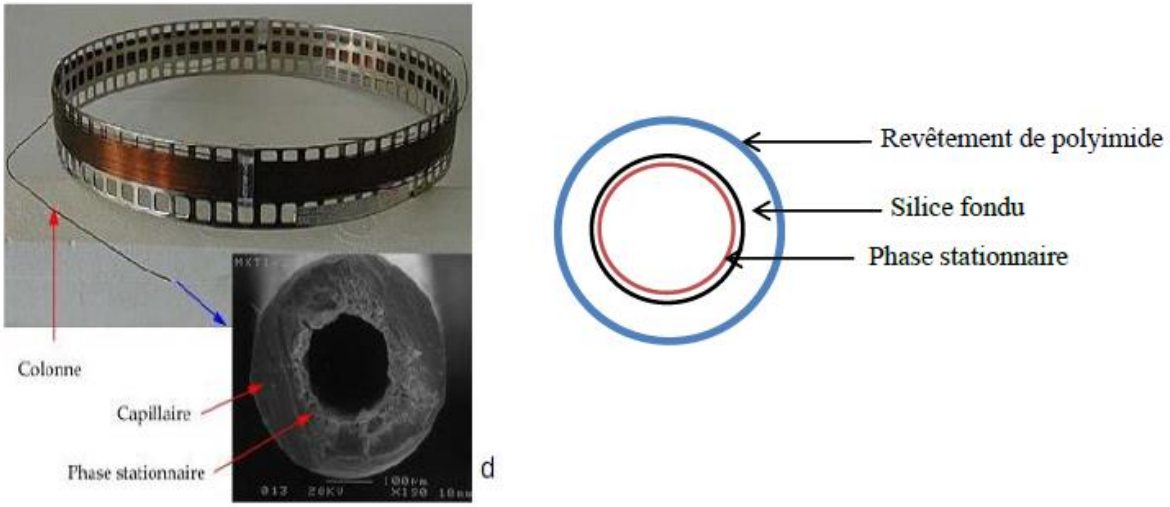


Figure V.13. Photo, schéma d'une colonne capillaire et microphotographie électronique à balayage de son extrémité.

F. Phase stationnaire

Les phases stationnaires les plus courantes, sont classées par ordre de polarité croissante et leurs noms commerciaux (tableau V.1).

Tableau V.1 : Exemples des phases stationnaires adaptés à analyses quelques molécules en CPG.

Molécules	**Exemples**	**Phases stationnaires**
Non polaires	Hydrocarbures normaux (n-alcanes)	SPB-octyl, Poly(méthylsiloxane), SE-30, SPB-5, PTE-5, SE-54
Polaires	Alcools, éthers, thiols, amines, acides carboxyliques, esters et cétones	Poly(méthylphénylsiloxane) Poly(cyanopropylméthylsiloxane) PEG, Carbowax 10, 20M
Polarisables	Alcènes aromatiques	Poly(cyanopropylsiloxane) Poly(cyanopropylphénylsiloxane) TCEP

G. Les systèmes de détecteurs

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

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

Caractéristiques d'un détecteur idéal

- Bonne sensibilité la sensibilité des détecteurs actuels sont comprises enter (10^{-8} et 10^{-15} g soluté/s).
- Bonne stabilité et reproductibilité.
- Réponse linéaire sur plusieurs décades de concentrations.
- Domaine de température de fonctionnement compris entre la température ambiante et au moins 400°C.
- Une préservation de l'intégrité de l'échantillon.

6.7.3. Applications

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est utilisée dans des domaines très variés, tels que la parfumerie, l'oenologie, l'industrie pétrolière, la biologie, la chimie fine et l'industrie des matières plastiques. Elle sert surtout pour l'analyse de liquide thermiquement stables et assez volatils (point d'ébullition < 250°C) et pour séparer les petites molécules avec des quantités de l'ordre de quelque picogrammes. Elle est utilisée aussi dans :

❖ Dosage en toxicologie:

- Recherche de toxique en intoxication aiguë (méthanol, EG…)
- Dosage des drogues: amphétamines, opiacés, cannabinoïdes
- Contrôle anti-dopage
- Dépistage de toxicomanie

❖ Agroalimentaire:

- Recherche et dosage des pesticides
- Recherche et dosage des nitrosamines (nitrites)

7. Etude théorique de la chromatographie

7.1. Caractéristiques de l'élution

La représentation graphique de l'élution d'un composé (figure V.14), exprimée en concentration en fonction du temps ou en fonction du volume de l'effluent est une courbe de distribution typiquement gaussienne. La mesure de la concentration peut s'effectuer par la mesure de l'absorbance, la fluorescence, etc…

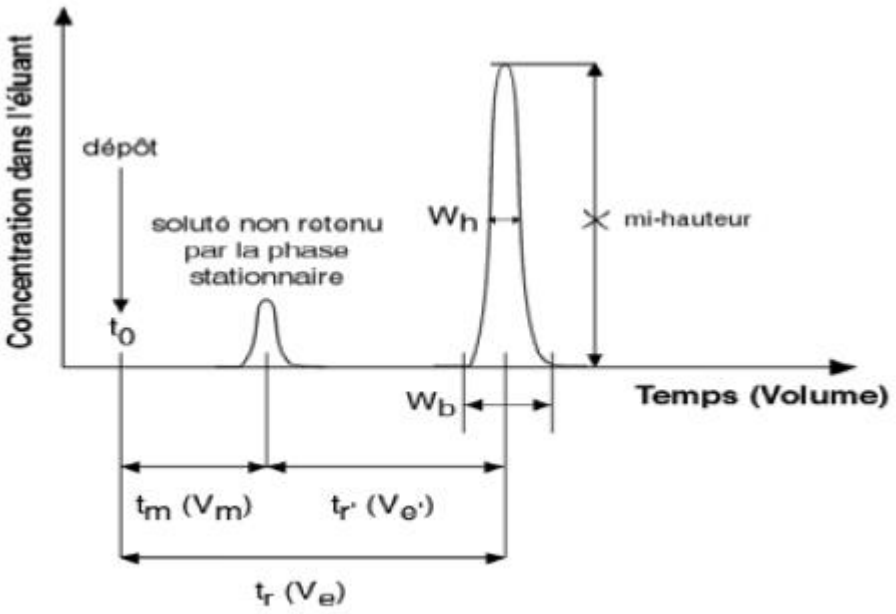


Figure V.14 : Représentation graphique de l'élution d'un composé (chromatogramme).

Avec :

t_0 : correspond au début de l'injection,

V_m : volume mort de la colonne,

t_m : temps mort,

V_e : est le volume d'élution d'un composé (aussi appelé Vr pour volume de rétention),

t_r : est le temps de rétention (ou encore d'élution te) d'un composé.

$V_{e'}$: est le volume d'élution réduit,

$t_{r'}$: est le temps de rétention réduit,

W_b (ω): largeur du pic à la base

W_h (δ): largeur du pic à mi-hauteur.

7.2. Le temps mort

Le temps mot (t_m) est le temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire de la colonne, pour parcourir le trajet entre l'entrée et la sortie de la colonne (ou temps mis par la phase mobile pour traverser la colonne).

7.3. Le temps de rétention

Le temps de rétention (t_r) est le temps mis par les molécules d'un composé à analyser (soluté) pour parcourir le trajet entre l'entrée et la sortie de la colonne. Le temps de rétention est caractéristique d'une espèce pour des conditions d'analyse données et peuvent servir à l'analyse qualitative. La surface et la hauteur d'un pic est fonction de la quantité du constituant. Le temps de rétention est indépendant de la quantité d'échantillon injectée. Il est fonction de la nature et la vitesse de la phase mobile (figure V.13).

7.4. Le temps de rétention réduit

Le temps de rétention réduit ($t_{r'}$) représente le temps passé par le soluté dans la phase stationnaire.

$$\mathbf{t_r' = t_r - t_m}$$

7.5. Le volume de rétention

Connaissant le débit D de la phase mobile, supposé maintenu constant, on définit le volume

de rétention (V_r) par la relation suivante :

$$\mathbf{V_r = t_r \times D}$$

$$\mathbf{V_r = t_r \times u.s.\varepsilon}$$

u: vitesse linéaire moyenne de la phase mobile

s : sélection droite de la colonne

ε: porosité de la phase stationnaire (≈ 0,75 pour la silice poreuse)

Le volume de la phase mobile dans la colonne (encore appelé volume mort) peut être calculé d'après le chromatogramme, à condition d'introduire un soluté non retenu par la phase stationnaire. Cette grandeur est exprimée par :

$$\mathbf{V_m = t_m \times D}$$

De même, il est bien entendu possible de déterminer un volume d'élution réduit $V_{e'}$ en soustrayant au volume d'élution V_e le volume mort V_m.

$$V_e' = V_e - V_m$$

Le volume de la phase stationnaire désigné par V_S est calculé en retranchant du volume total interne de la colonne vide le volume de la phase mobile.

7.5. Vitesse linéaire moyenne du soluté et de la phase mobile

La vitesse linéaire moyenne de progression du soluté v est égale à :

$$\mathbf{V = L/t_r}$$

L : longueur de la colonne

La vitesse linéaire moyenne de la phase mobile u est égale à :

$$\mathbf{u = L/t_m}$$

7.6. Coefficient de distribution

Soit K, le coefficient de distribution du composé entre la phase stationnaire et la phase mobile : $\mathbf{K = \frac{C_S}{C_m}}$

Avec C_S : concentration à l'équilibre du soluté dans la phase stationnaire et C_M : concentration à l'équilibre du soluté dans la phase mobile.

7.7. Le facteur de capacité

Le facteur de capacité (ou facteur de rétention) k' exprime le rapport de la quantité de soluté dans la phase stationnaire à la quantité de soluté dans la phase mobile. Ce facteur sans dimension, peut être relié au temps de rétention par l'expréssion:

$$\mathbf{k' = (t_r - t_m)/t_m}$$

k' est aussi le rapport du temps passé par une espèce dans la phase stationnaire au temps passé par cette même espèce dans la phase mobile.

De faibles valeurs de k' indiquent des composés peu retenus. Des valeurs élevées de k' indiquent des composés fortement retenus, en pratique $1 < k' < 10$.

Le temps et le volume de rétention sont liés au facteur de capacité par les relations :

$$\mathbf{tr = t_m(1 + k')}$$

$$\mathbf{Vr = V_m(1 + k')}$$

7.8. Notion d'efficacité

La largeur d'un pic est caractéristique de l'efficacité de la séparation : plus le pic est fin plus la chromatographie est efficace. L'efficacité est mesurée par le nombre de plateaux théorique N_{th}.

7.8.1. Model des plateaux théoriques

Sur le modèle de la distillation, on considère que la colonne de chromatographie est constituée par un empilement de plateaux appelés plateaux théoriques (figure V.15). Un plateau théorique est défini comme le plus petit volume de colonne où l'équilibre de distribution du soluté entre phases fixe et mobile est réalisé, ou, en d'autres termes, un volume dans lequel la distribution du soluté entre les deux phases est toujours celle définie par K'.

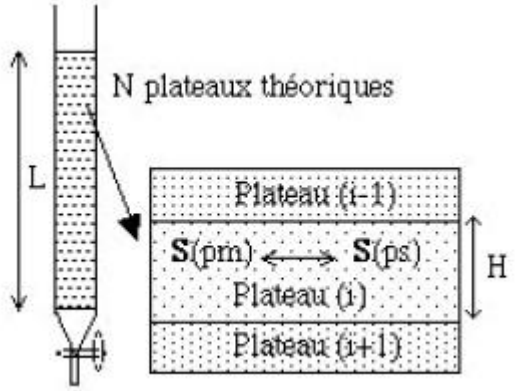


Figure V.15 : Model des plateaux théoriques.

On définit V_h comme étant le volume équivalent de phase mobile dans le plateau théorique et N le nombre de plateaux théoriques dans la colonne. **Le volume d'élution V_e est alors égal à $N.V_h$.** On peut représenter la

migration du soluté à travers la colonne, comme le déplacement dans la phase mobile (en équilibre avec la phase fixe) d'une couche très mince de soluté le long de la colonne.

L'effet de diffusion brownienne (et de la diffusion de soluté entre les phases fixe et mobile), qui est relativement rapide dans la phase mobile se superpose à ce mouvement. Ceci explique que **plus un composé est retenu dans la colonne**, plus la diffusion est efficace et **plus le pic d'élution est large**, ce qui explique que l'on cherche en général à accélérer l'élution… en dehors du fait que l'on gagne du temps par la même occasion.

La forme du pic (figure V.15) permet de déterminer certains paramètres tels que la largeur à mi-hauteur (δ) ou la largeur à la base (ω). Ces paramètres permettent de calculer le nombre de plateaux d'une colonne, caractéristique qui reflète l'efficacité de cette colonne.

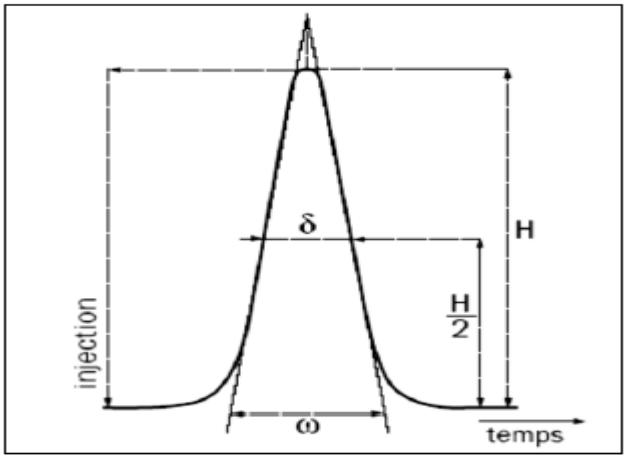


Figure V.15 : Représentation graphique d'un pic d'élution.

Il est possible de démontrer (mais nous le ferons pas) que W_b (ω), la largeur du pic à la base (ω) (Figure V.16), est égal à :

$$\omega = \frac{4.t_r}{\sqrt{N}}$$

Donc, **plus le nombre de plateaux est important, plus le pic est fin,** par contre**, plus le temps de rétention est grand, plus la pic est large**. (Ce qui correspond bien à ce que nous venons de discuter ci-dessus).

Surface des pics : La surface des pics, c'est-à-dire l'intégrale de l'aire sous la courbe d'un pic d'élution, permet de mesurer la concentration d'une substance, pour autant que la réponse du système soit proportionnelle à la concentration de l'échantillon.

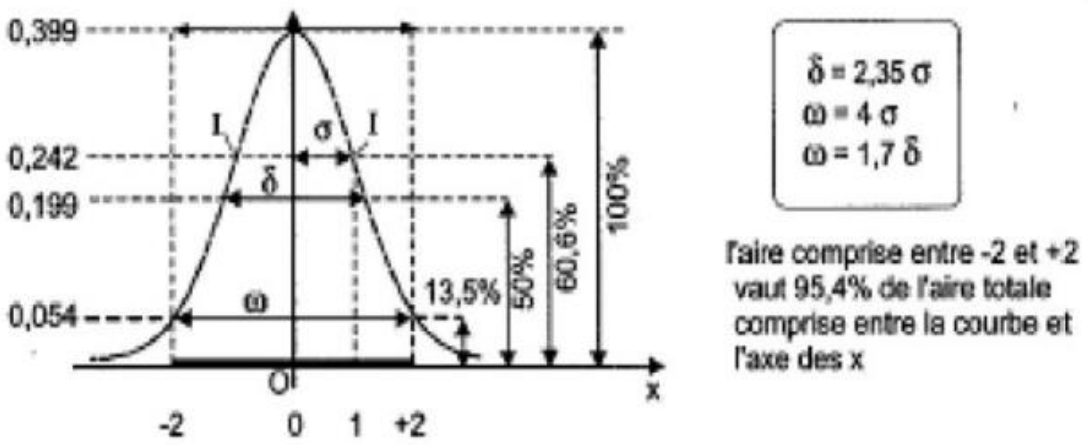


Figure V.16 : Caractéristique d'un pic idéale.

4σ correspond au « volume du pic » soit 95 % du composé injecté. Par suite des propriétés de la courbe de Gauss (ω = 4σ), il en résulte l'équation :

$$\mathbf{N = 16 \left(\frac{t_r^2}{\omega^2}\right)}$$

Les pics étant assez souvent déformés à la base, cette dernière est rarement employée, on utilise de préférence la formule :

$$\mathbf{N = 5{,}54 \left(\frac{t_r^2}{\delta^2}\right)}$$

δ : largeur du pic à mi-hauteur

7.8.2. Efficacité réelle (nombre de plateaux théoriques effectifs)

N est très utilisé en HPLC. Pourtant il serait d'utiliser N_{eff} (nombre de plateaux effectifs) puisqu'il dépend vraiment du temps passé dans la phase stationnaire.

$$\mathbf{N = 16 \left(\frac{t_r'^2}{\omega^2}\right) = 5{,}54 \left(\frac{t_r'^2}{\delta^2}\right)}$$

7.8.3. Hauteur équivalent à un plateau théorique H

Pour comparer entre elles des colonnes de différentes longueurs, on définit la hauteur équivalente à un plateau théorique (H ou HEPT).

$$\mathbf{H = L/N}$$

L : la longueur de la colonne et N : le nombre de plateaux théoriques.

7.9. Qualité de la séparation

7.9.1. Facteur de sélectivité

Pour caractériser la distance séparant les sommets de deux pics on utilise le facteur de sélectivité ou de séparation α. Ce facteur est égal au rapport des facteurs de capacité de deux solutés dont on veut réaliser la séparation. Il s'exprime par :

$$\alpha = \frac{(t_{r2} - t_m)}{(t_{r1} - t_m)} = \frac{k'_2}{k'_1}$$

Avec $k_2' > k_1'$

Il s'agit du rapport des temps de rétention réduits

k_2': facteur de capacité du composé 2

k_1': facteur de capacité du composé 1

$\alpha = 1$; aucune séparation ne s'effectue aussi le temps de rétention est le même. La sélectivité doit être supérieure à 1. Deux composés ne peuvent être séparés sauf s'ils ont $k' \neq 0$.

Remarque

Si $\alpha = 1$, cela signifie que le système utilisé ne permet pas de séparer les composés analysés. La valeur minimale de α est 1,1. En dessous, il vaut mieux changer d'éluant ou de phase stationnaire, α ne prend pas en compte la largeur des pics.

La figure V.17, résume les facteurs caractérisant deux pics adjacents.

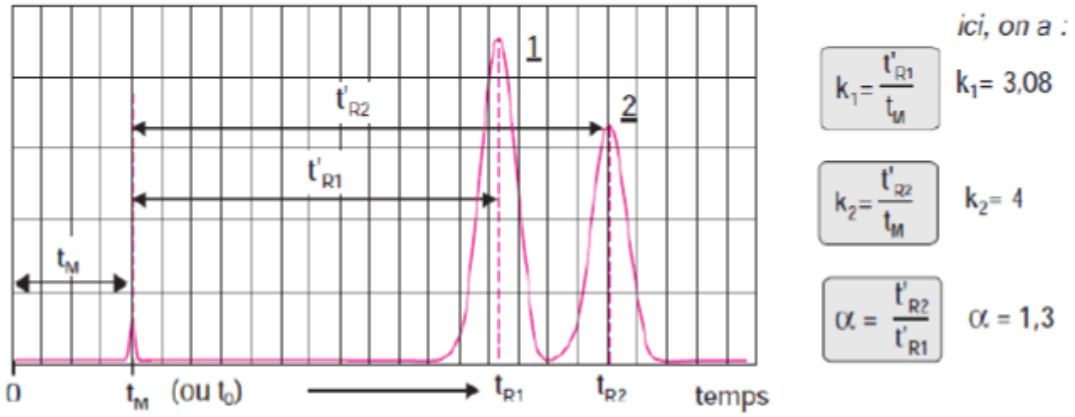


Figure V.17 : Facteurs de rétention et de séparation entre deux composés adjacents.

7.9.2. Coefficient de résolution (R)

Le but d'une analyse chromatographique est d'obtenir des pics séparés. En optimisant les conditions analytiques, il est possible d'améliorer l'allure du chromatogramme. Le paramètre de résolution R quantifie la

qualité de cette séparation. Bien qu'on la mesure, en général, sur deux pics contigus, elle peut être calculée sur n'importe quel couple de pics.

$$\mathbf{R = 2.\frac{t_{r2}-t_{r1}}{\omega_1+\omega_2}}$$

La Figure V.18 indique l'influence de valeur de R sur la séparation de deux pics d'intensité égale, et on peut dire en générale si :

- R< 1 : mauvaise résolution
- 1 < R < 1,4 : résolution acceptable
- 1,4 < R < 1,6 : résolution optimale
- R> 1,6 : résolution trop bonne car le temps d'analyse est rallongé

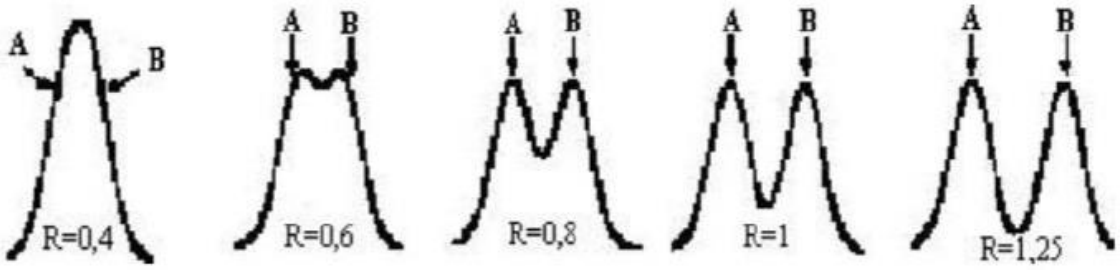


Figure V.18: Influence du terme R sur la séparation de deux pics d'intensité égale.

7.10. Modèle cinétique de la chromatographie

Ce modèle issu de la mécanique des fluides a été mis au point par Van Deemter en 1956 pour la chromatographie en phase gazeuse. Ce physicien a mis au point l'équation qui relie H (HEPT) aux caractéristiques physiques de la colonne et de la phase mobile.

$$H = A + {}^{B}/_{u} + C.u$$

La courbe représentant l'équation de Van Deemter est donc une hyperbole ou A, B, C sont des constantes (figure V.19).

u : vitesse moyenne de la phase mobile (gaz vecteur).

A : est l'influence de la diffusion turbulente due aux hétérogénéités dans l'écoulement.

B : est un facteur de la diffusion moléculaire dans la phase mobile.

C : dépend de la résistance au transfert de masse en phase liquide

Le tracé de la courbe HEPT en fonction de la vitesse moyenne du gaz vecteur, permet de déterminer le débit minimum donnant la meilleure efficacité de la colonne.

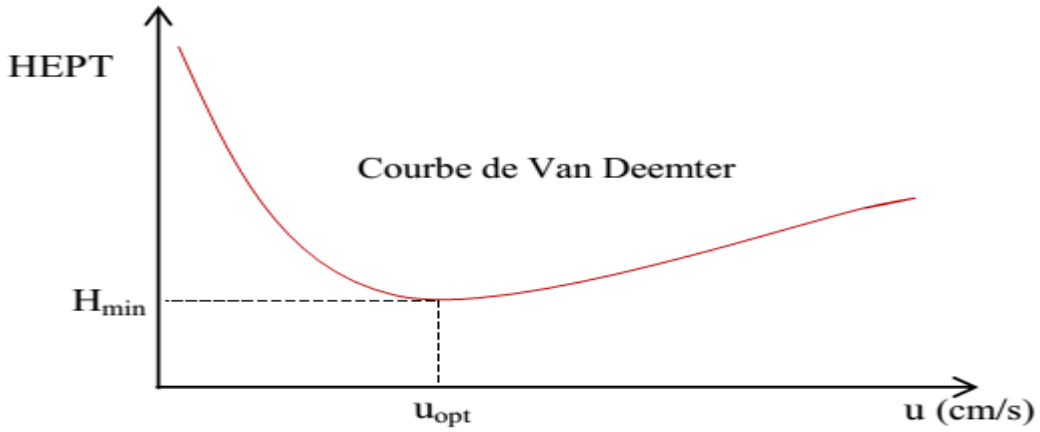


Figure V.19 : Courbe de Van Deemter. Variation de la hauteur d'un plateau théorique en fonction de la vitesse moyenne du gaz vecteur.

Aux faibles valeurs de u, le terme B/u prédomine (la courbe devient asymptote à une droite de pente négative) et explique la perte d'efficacité vers les très faibles vitesses. Aux grandes vitesses, le terme C.u prédomine (la courbe devient asymptote à une droite de pente positive) et explique la perte d'efficacité aux très grandes vitesses. Dans la région intermédiaire, le terme A est prépondérant et H passe par un minimum (H_{min}). Elle montre que la variation de H en fonction de u passe par une valeur minimale calculée en cherchant la valeur de u correspondant à l'annulation de la dérivée première de cette fonction :

$$\mathbf{u_{opt}} = \sqrt{\frac{B}{C}}$$

Chapitre VI : L’électrophorèse

1. Introduction

L'électrophorèse est une méthode de **séparation de particules chargées** électriquement par migration différentielle sous l'action d'un **champ électrique**.

L'**électrophorèse** et la chromatographie sont les principales techniques utilisées pour la séparation et la caractérisation des molécules. Elle a quelques applications en chimie, mais elle est principalement utilisée en biochimie ou biologie moléculaire pour la séparation des protéines ou celle des acides nucléiques.
L'origine de cette méthode a été imaginée par S.E. Linder et H. Picton 1892.

2. Description

La technique de l'électrophorèse est fondée sur le déplacement et la migration des particules chargées ou d'ions sous l'effet d'un champ électrique. Du fait de leurs caractéristiques propres et en fonction des conditions de l'électrophorèse, ces ions auront des vitesses de migration différentes, ils vont donc se séparer les uns des autres.
Les molécules anioniques (-) migrent vers l'anode (+) et les molécules cationiques (+) se déplacent vers la cathode (−).
Sur les acides nucléiques, les charges sont portées par les groupements phosphates du squelette.
Sur les protéines, la situation est plus complexe et il existe différents types de groupements ionisables :

- Ceux pouvant acquérir une charge négative :
    - Les fonctions acide carboxylique (-COOH) de l'acide glutamique, de l'acide aspartique et de l'extrémité C terminal de la chaîne polypeptidique ;
    - La fonction thiol (-SH) de la cystéine;
    - Les fonctions alcool (-OH) de la sérine, de la thréonine et de la tyrosine.
- Ceux pouvant acquérir une charge positive :
    - La fonction guanido d'arginine ;
    - La fonction imidazole de l'histidine ;
    - La fonction amine ($-NH_2$) de la lysine et de l'extrémité N-terminale de la chaîne polypeptidique ;

La charge nette d'une protéine dépend donc en général de sa composition en acides aminés et du pH.

2- Principes de fonctionnement

Les molécules à séparer sont déposées sur un support dont chaque extrémité est en contact avec une solution tampon. Dans chaque solution tampon se trouve une électrode. Les électrodes sont reliées à un générateur de

courant (figure.1). Lorsque le générateur envoie du courant, les molécules chargées se déplacent sur le support en direction de l'électrode de signe opposé à leur charge.

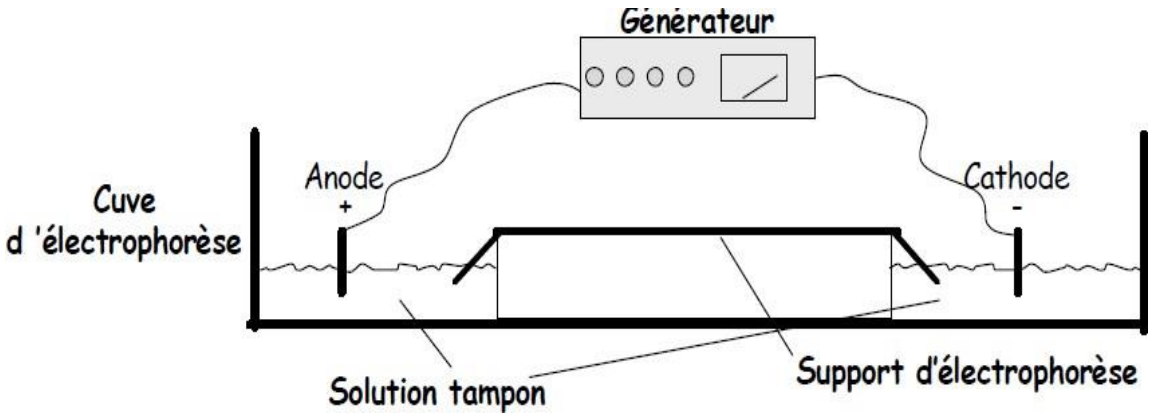


Figure.1. Une installation d'électrophorèse capillaire.

3. Principes de la migration électrophorétique

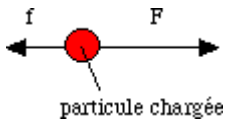
La migration dépend de plusieurs facteurs :

A) De la mobilité électrophorétique **U**, qui est fonction de la charge et de la géométrie de la particule. Une particule de charge électrique **Q**, placée dans un champ électrique **E**, est soumise à une force **F** qui l'entraîne vers l'électrode de signe opposé : $\mathbf{F = Q \cdot E}$

Des forces de frottement f, dues à la viscosité du milieu η, s'opposent à la migration de la particule, et ce d'autant plus que la particule est grosse (r = rayon) et que la vitesse de migration (v) est grande :

$$\mathbf{f = 6\,\Pi \cdot \eta \cdot r \cdot v}$$

(N.B. Le coefficient de viscosité dépend de la température)



Il arrive un moment où ces deux forces s'équilibrent, et la particule se déplace alors à vitesse constante; on peut alors écrire:

$$\mathbf{Q.E = 6\,\Pi \cdot \eta \cdot r \cdot v} \qquad \text{soit} \qquad \mathbf{v = Q \cdot E / 6\,\Pi \cdot \eta \cdot r}$$

On définit pour chaque particule sa mobilité μ, de manière indépendante du champ électrique, par la relation :

$\mu = v/E$ (= vitesse de migration pour un champ électrique de 1 Volt/cm)

soit encore: $\mu = Q / 6 \Pi . \eta . r$

La mobilité est une caractéristique de chaque particule; il est donc possible d'effectuer une séparation en se basant sur cette propriété. La charge **Q** est fonction du pH isoélectrique de la particule et du pH du solvant : on appelle **pH isoélectrique** d'une particule (PHi) **le pH pour lequel cette particule ne migre pas dans un champ électrique**.

La différence **pH - PHi** détermine le **signe de la charge Q** d'une particule et son **intensité** : plus cette différence est grande en valeur absolue, plus la charge est importante:

si pH > phi	charge nette négative (anion)	migration vers l'anode
si pH < phi	charge nette positive (cation)	migration vers la cathode
si pH = phi	charge nette nulle	pas de migration

B) du **champ électrique E : E = v / μ**

C) des **courants liquidiens :**

- le **courant d'électroendosmose :** Ce courant accélère ou ralentit la migration des molécules, suivant qu'elles migrent vers la cathode ou vers l'anode.

- les courants d'**évaporation** : le passage du courant s'accompagne d'un échauffement du support (par effet Joule), ce qui entraîne l'évaporation de l'eau de la phase liquide; on utilise alors des cuves réfrigérées.

D) de la **durée de migration**, qui influe sur la distance de migration : **d = v . t**

(**d** = distance, **v** = vitesse , **t** = temps de passage du courant)

Cette formule n'est pas applicable dans le cas de l'électrophorèse sur support, car les molécules effectuent un trajet non linéaire dans les microcanaux du support poreux.

E) de **facteurs liés à la nature du support** : adsorption, texture...

4. Les différentes types d'électrophorèses

Le choix du support est dicté par la nature des molécules à séparer et selon le support on distingue deux types d'électrophorèse :

Support liquide => électrophorèse en veine liquide

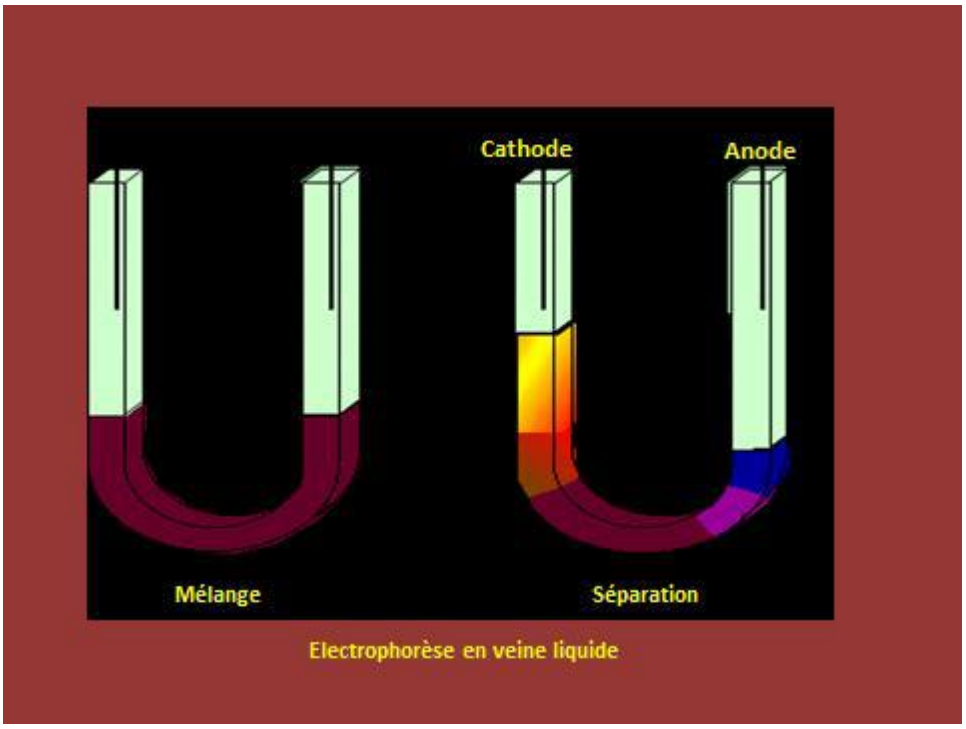
Support poreux =>électrophorèse de zone : il y a différents supports d'électrophorèse de zone:

- Papier
- Acétate de cellulose

- Semi-solide (les gels): gel de polyacrylamide, gel d'agarose, gel d'amidon, gel de silice ...

4.1. L'électrophorèse libre, en veine liquide :

Selon **Tisélius** (1937), est réalisée dans un tube en U de section carrée (ceci afin de pouvoir réaliser des mesures optiques au travers du tube, comme avec une cuve de spectrophotomètre) : la séparation n'est pas totale, mais les frontières qui se forment sont mises en évidence par des méthodes optiques (absorption UV, indice de réfraction, fluorescence...). Cette méthode est utilisée en recherche pour mesurer la mobilité électrophorétique et pour vérifier la pureté des protéines.



4-2- L'électrophorèse sur support ou électrophorèse de zones

L'équipement nécessaire pour l'électrophorèse est une unité d'électrophorèse et un générateur de courant électrique. L'électrophorèse peut se faire sur un système vertical ou horizontal.

4.2.1. APPLICATIONS

1-électrophorèse sur papier et acétate de cellulose

2-électrophorèse sur gel de polyacrylamide :

- PAGE
- SDS-PAGE
- Focalisation isoélectrique (FIE)
- électrophorèse bidimensionnelle

3-électrophorèse sur gel d'agarose :

- électrophorèse sur gel d'agarose
- électrophorèse en champ pulsé

4-électrophorèse capillaire

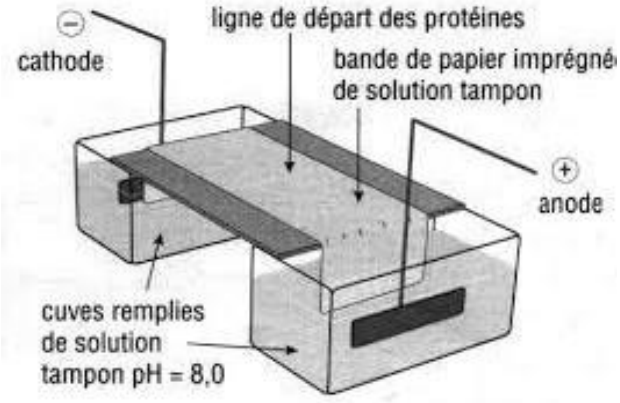
1-Électrophorèse sur papier et sur acétate de cellulose

Papier: Habituellement employé dans un montage horizontal, plus rarement vertical, il servait surtout à séparer des acides aminés ou d'autres petites molécules chargées. Le dépôt et la migration des échantillons se font en surface. La présence de charges sur la cellulose qui constitue le papier interfère un peu avec la migration. Il est de moins en moins utilisé sauf, quelques fois, pour la séparation des acides aminés sous très haut voltage.

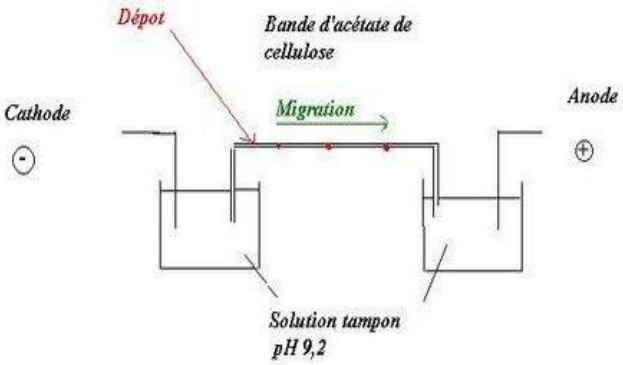
Acétate de cellulose: Il s'agit d'un dérivé acétate d'une forme purifiée de cellulose. Elle se présente sous la forme d'une mince et fragile feuille. Le dépôt et la migration se font en surface sur un montage horizontal. On s'en sert beaucoup pour séparer grossièrement des protéines. La faible résolution ne permet que la séparation de grands groupes de protéines. Son faible coût et sa grande facilité d'emploi la rendent utile pour la séparation des protéines sériques, particulièrement en biochimie clinique pour le diagnostic de maladies. Mais même dans ce secteur, on le remplace par des méthodes où la matrice est de l'agarose.

La révélation des fractions peut être **globale** (rouge Ponceau, Amido-schwartz, vert de lissamine, bleu de Coomassie) ou **spécifique** (révélation des lipoprotéines avec un colorant des lipides, révélation d'une activité enzymatique...).

La **lecture** peut se faire **à l'oeil nu** (analyse qualitative) ou par **densitométrie** (enregistrement de l'absorbance en fonction de la distance de migration) ; dans ce cas, l'**intégration** des pics permet une analyse quantitative des fractions; ou encore le dosage peut être effectué après **élution** des fractions.



Électrophorèse sur papier



Électrophorèse sur acétate de cellulose

2- Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

2-1- Électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE)

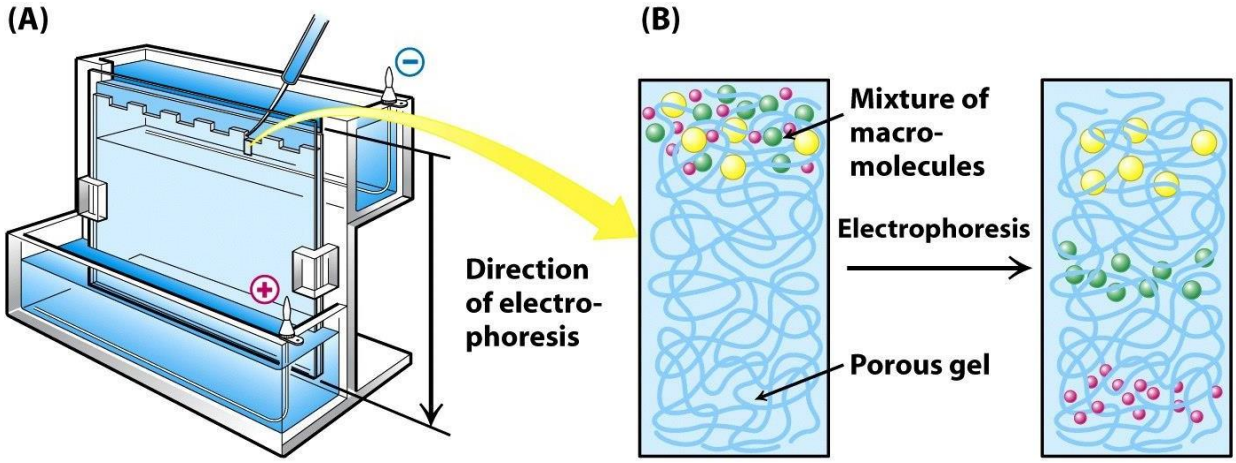
L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou PAGE (*polyacrylamide gel electrophoresis*) est une application de l'électrophorèse de zone, elle est très utilisée pour l'étude des protéines ou pour les acides nucléiques de petite taille (le séquençage de l'ADN).

La méthode PAGE est actuellement la méthode la plus utilisée en immunologie et en analyse des protéines, pour visualiser différentes protéines séparées en bandes distinctes en fonction de leur poids moléculaire. Celles-ci peuvent alors être transférées sur membrane de nitrocellulose pour être mises en contact avec des anticorps spécifiques. Cette technique s'appelle le Western blot.

Les techniques traditionnelles de séquençage de l'ADN utilisent les gels de polyacrylamide pour séparer des fragments d'ADN (ceux-ci possèdent un pouvoir résolutif de 1 paire de bases).

Le polyacrylamide est un gel finement réticulé, que l'on fabrique au moment de l'emploi en mélangeant de l'**acrylamide** (CH_2=CH-CO-NH_2),qui polymérise en donnant des chaînes linéaires, et du **bisacrylamide** (CH_2=CH-CO-NH-CO-CH=CH_2) qui forme des ponts entre les chaînes; on obtient ainsi un réseau, dont les mailles sont de taille variable en fonction des proportions d'acrylamide et de bisacrylamide utilisées; le gel obtenu se comporte donc comme un **tamis moléculaire** (les macromolécules migrent d'autant moins vite qu'elles sont plus grosses).

Typiquement, les gels de séparation sont faits à 6 %, 8 %, 10 %, 12 % ou 15 %. Un gel de concentration définie est coulé en haut du gel. Des pistes individuelles sont réalisées par l'utilisation d'un "peigne" qui sépare le gel en portions égales destinées à la migration de chaque échantillon. Le pourcentage choisi dépend de la taille de la protéine que l'on veut identifier. Plus le poids connu est petit, plus le pourcentage devra être élevé.



Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

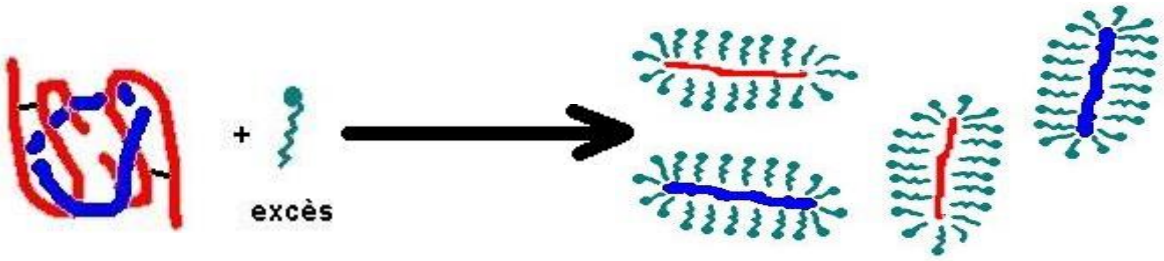
2-2- Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

SDS– PAGE : sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis

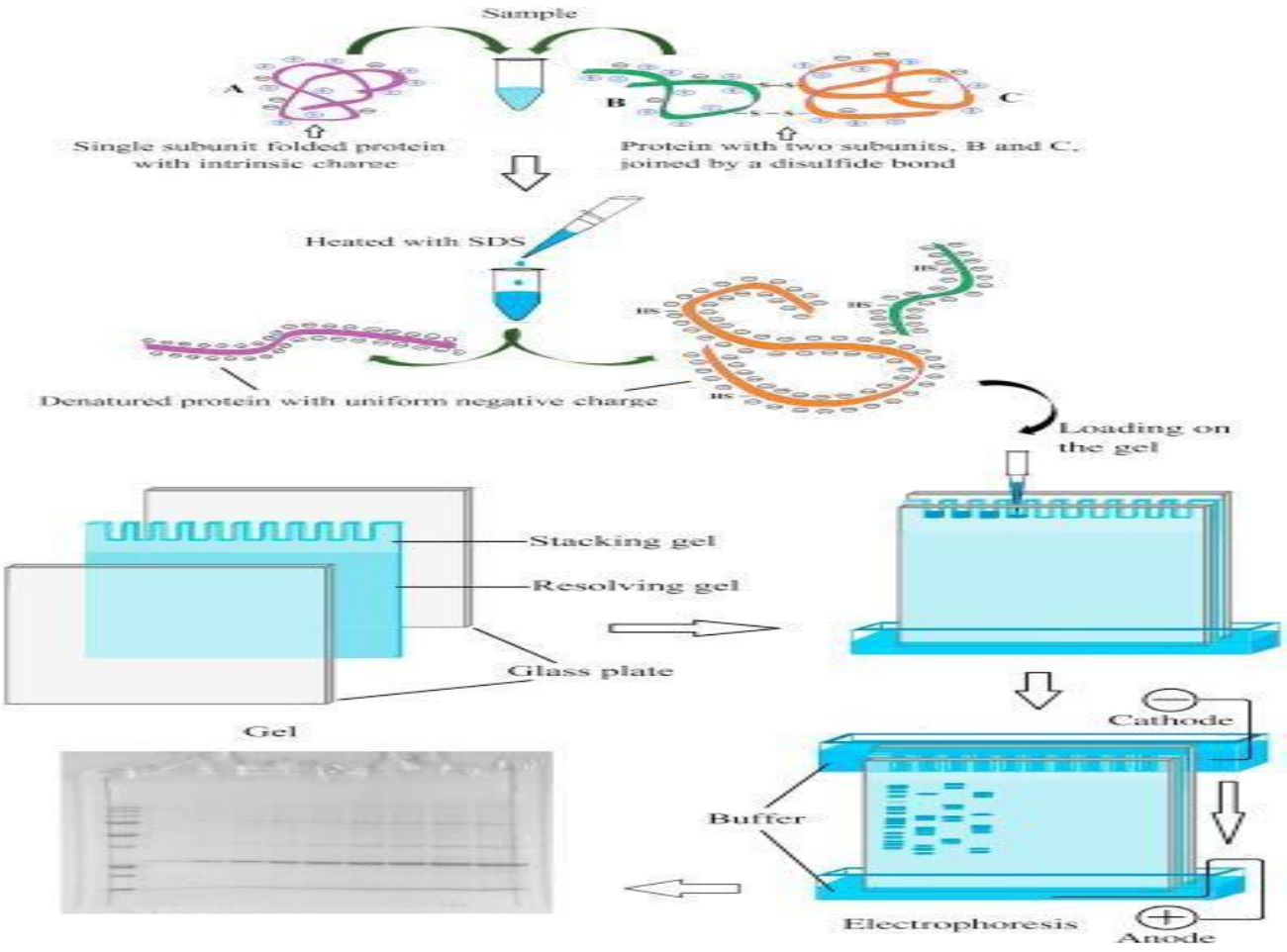
Cette méthode de séparation, par rapport à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide classique, est une méthode dénaturante en raison de l'ajout de laurylsulfate de sodium (ou SDS)

Dans ce gel dénaturant, on retrouve ce SDS qui se lie aux protéines selon un ratio approximativement constant (~1 molécule de SDS pour 2 acides aminés). Le SDS est un détergent fort possédant une longue chaîne hydrocarbonée hydrophobe et une extrémité chargée négativement. Il interagit avec les protéines par sa portion hydrocarbonée en liant leurs régions hydrophobes. En se liant à la protéine, le SDS empêche son repliement et lui confère une charge nette négative. **La structure native de la protéine est donc dénaturée, et une charge apparente négative est alors conférée à la protéine.** Cela signifie que seul le poids moléculaire des protéines sera le facteur de leur séparation. Ceci permet sa migration dans la matrice à l'aide d'un courant électrique et la séparation des protéines s'effectue uniquement en fonction de leurs poids moléculaires (les protéines ayant un poids moléculaire plus faible migreront plus rapidement).

Lorsque les protéines ont été séparées, leur visualisation peut être effectuée en les colorants directement : bleu de Coomassie, méthodes aux sels de cuivre, au nitrate d'argent ...Après transfert (technique dite **western blot**) sur une membrane, on révèle sélectivement certains polypeptides en utilisant des anticorps marqués grâce à la SDS-PAGE, il est possible de déterminer assez finement la présence d'une protéine donnée dans un échantillon protéique. Une protéine sera caractérisée par une masse moléculaire donnée.



Soit, par exemple, une protéine formée par l'assemblage de 4 sous unités polypeptiques, 2 unités symbolisées par et 2 unités symbolisées par . La "chaîne rouge" possède des ponts disulfures (-S-S-) symbolisés par des traits noirs. Soit symbolisant le SDS. Chaque unité polypeptidique est isolée, dénaturée, réduite, sous forme de micelle SDS-unité. Toutes les micelles ont la même densité de charge.



2-3- Electrofocalisation (IEF — IsoElectric Focussing)

La focalisation isoélectrique est une méthode permettant de séparer des protéines qui ne diffèrent que par une seule charge.

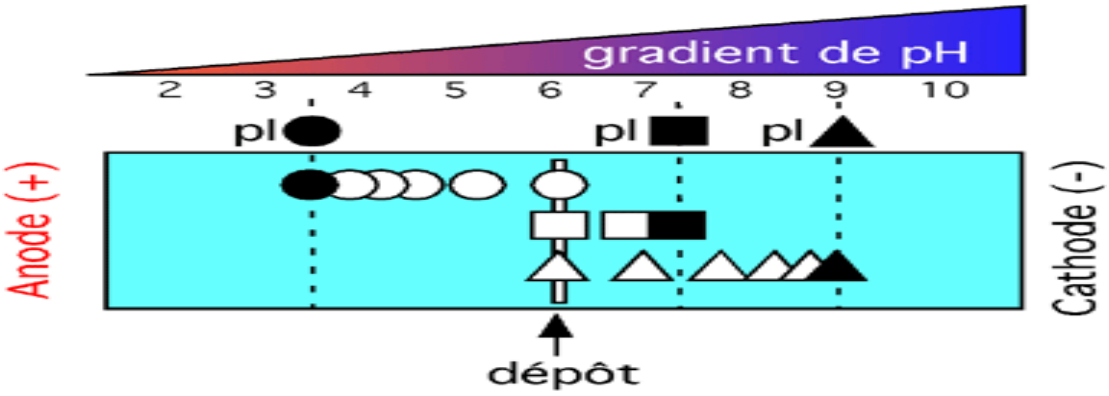
Le principe de base de la focalisation isoélectrique (FIE) est de créer un gradient de pH dans lequel pourront se déplacer les protéines soumises à un champ électrique. Les protéines migreront dans ce champ électrique. Arrivées au pH correspondant à leur pi, elles s'immobiliseront puisque leur charge nette sera nulle. De cette façon, il est possible de séparer les protéines d'une préparation selon leur pi.

On peut créer un tel gradient de pH avec des polyélectrolytes portant un certain nombre de groupes ionisables positivement ou négativement (amines, carboxyles ou sulfates) et possédant un certain pouvoir tampon. Ces molécules sont appelées ampholytes. Si on soumet ces ampholytes à un champ électrique borné par une solution d'un acide fort à l'anode et par une solution d'une base forte à la cathode, ils migreront et se distribueront par ordre de pi. Leur capacité tampon aidera à maintenir autour d'elles une petite zone de pH égal à leur pi. Une série d'ampholytes ayant donc chacun un pi couvrant une certaine gamme de pH créera donc un gradient continu de pH. Si on fait migrer une petite quantité de protéines dans ce système, après ou durant sa formation, elles migreront aussi et s'immobiliseront à leur pi.

La durée de la focalisation est beaucoup moins critique que celle d'une électrophorèse ordinaire. En effet dans une FIE les protéines ne risquent pas de sortir du gel puisqu'elles s'immobiliseront au point où elles

auront atteint leur pi. Il faut seulement que la migration dure suffisamment longtemps pour que les ampholytes aient le temps de migrer correctement et que protéines aient le temps d'atteindre leur pi. À 2 mA, on estime le temps requis à environ 1 heure.

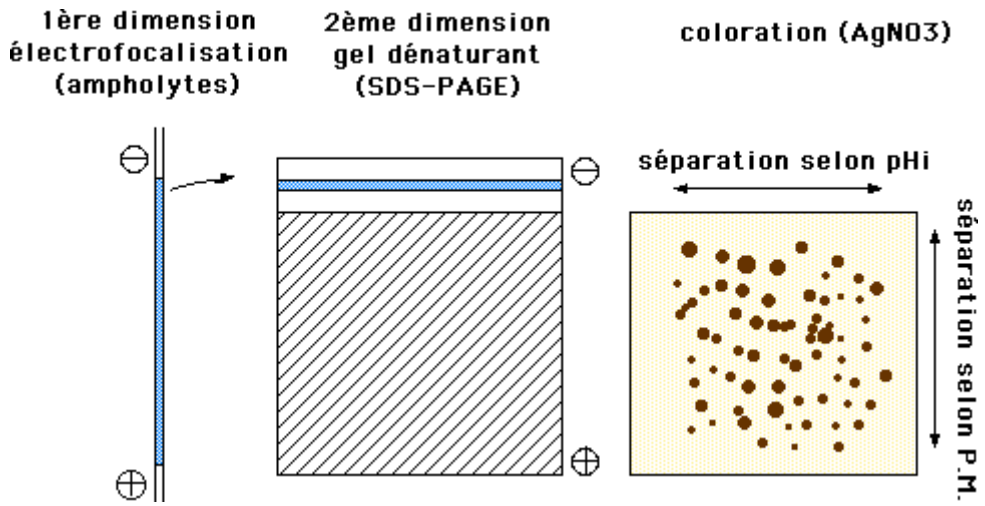
Les procédures de coloration sont similaires à celle d'une électrophorèse en gel de polyacrylamide. Il faut cependant éliminer les ampholytes du gel, car elles peuvent se colorer. On fait donc précéder la coloration par trempage dans un bain d'acide trichloracétique 5 ou 10% pour les faire diffuser hors du gel tout en fixant les protéines sur place.



2-4- Électrophorèse bidimensionnelle

On sépare selon le phi dans une dimension (IEF) et selon la masse molaire dans l'autre dimension (PAGE-SDS); on sépare ainsi environ 1000 protéines dans le sérum.

La méthode la plus puissante d'analyse d'un mélange complexe de protéines est sans contredit l'électrophorèse bidimensionnelle (E2D), développée initialement par O'Farrel (1979). Il s'agit de la combinaison d'une FIE, qui sépare selon le pi, suivi d'une électrophorèse dénaturante SDS, séparant selon le poids moléculaire. Dans un premier temps, on sépare donc le mélange selon le pi dans un gel cylindrique ou plat. On découpe ensuite la bande verticale du gel plat ou on récupère le cylindre de gel. On laisse incuber dans un tampon contenant les éléments du tampon de gel de tassement d'un système dénaturant au SDS. On dépose ensuite cette bande horizontalement sur un gel de tassement et on la soumet à l'électrophorèse, permettant une séparation selon le poids moléculaire. Cette approche permet donc de séparer un mélange selon deux paramètres complètement indépendants, lui donnant une capacité de résolution inégalée. Ainsi, une FIE ou une SDS-PAGE peut séparer environ 60 à 100 composantes. Combinant ces deux méthodes dans une E2D, on peut résoudre au-delà de 1000 polypeptides.



2-3- Électrophorèse sur gel d'agarose

Elle est peu utilisée dans le cas des protéines, car dans ce domaine les gels de polyacrylamide donnent toute satisfaction. Cependant, des gels d'agarose sont destinés à des applications spécifiques pour révéler un type donné de constituant (ex. lipoprotéines) ou certaines enzymes, ainsi que pour les techniques de révélation par anticorps. L'é**lectrophorèse sur gel d'agarose est surtout utilisée pour la séparation des acides nucléiques.** Elle est utilisée.

– soit à des fins analytiques: pour séparer et identifier des fragments d'ADN, pour déterminer leur taille, pour en estimer la quantité

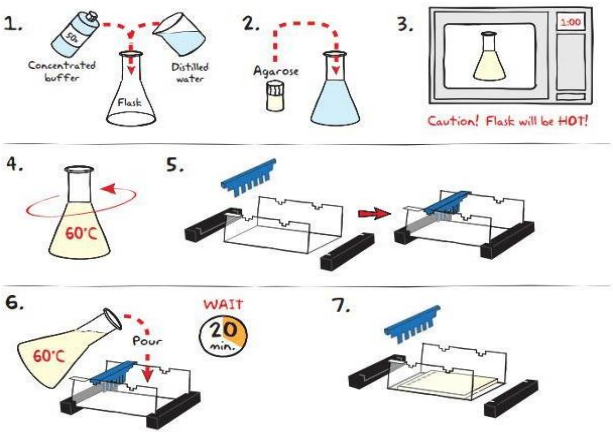
-soit à des fins préparatifs, pour purifier un fragment d'AND de taille connue.

La taille des fragments qu'il est possible de séparer est comprise entre 0,2 et 50 kb. Les fragments d'ADN sont facilement détectés sur le gel grâce au bromure d'éthidium (BET).On peut ainsi visualiser en lumière UV des quantités très faibles d'ADN (de l'ordre de 5-10 ng). L'électrophorèse en gel d'agarose est donc une technique très sensible; elle est de plus rapide et simple à mettre en œuvre.

Le gel d'agarose,

L'agarose est un colloïde naturel extrait d'une algue, c'est un polysaccharide linéaire. L'agarose est très fragile et se détruit facilement sous l'effet de manipulations. Les gels d'agarose ont de grands « pores » et sont utilisés essentiellement pour séparer les grandes molécules d'une masse moléculaire supérieure à 200 kDa.

Les gels d'agarose sont obtenus en mettant la poudre d'agarose déshydraté en suspension dans un tampon aqueux, puis en faisant bouillir le mélange jusqu'à ce que l'agarose se transforme en une solution claire. Celle-ci est ensuite versée sur un moule et mise à refroidir à température ambiante jusqu'à formation d'un gel rigide. En durcissant, l'agarose forme une matrice dont la densité est déterminée par sa concentration.



❖ **Dépôt d'échantillon et migration**

Les échantillons d'ADN à charger sur le gel d'agarose sont tout d'abord mélangés à un tampon de chargement exemple, du xylène cyanol, du bleu de bromophénol, du vert de bromocrésol, etc. qui permet de suivre le front de migration. Les puits situés à gauche et à droite du gel devraient, dès lors, être remplis avec un ADN marqueur d'une taille connue. Un marqueur contient généralement un nombre défini de fragments d'ADN connus, ce qui permet de déterminer plus facilement la taille des ADN inconnus.

Le dépôt se fait du côté cathode et le système est soumis à une migration sous un courant de 60 à 120 volts

Les acides nucléiques chargés négativement sont déposés du côté de la cathode et migrent vers l'anode dans le champ électrique. La migration des fragments d'ADN dépend de leurs tailles ; plus le fragment à une taille élevé, moins la migration électrophorétique par rapport au puits d'inclusion est importante. À l'inverse les fragments de petite taille ont une distance de migration plus élevée.

Après la migration, le gel est soumis au rayon UV. Les molécules de bromure d'éthidium fixées aux ADN émettent une lumière visible et photographiable et permettent de visualiser les fragments amplifiés sous forme de bandes fluorescentes de même taille. Ce contrôle permet aussi de vérifier si une éventuelle contamination de l'ADN est survenue au cours de la PCR grâce au puits contenant le blanc.

5-3-1- Électrophorèse en champs pulsés

Cette technique est utilisée pour l'électrophorèse des molécules d'ADN de haut poids moléculaire (15 -100 kb). Le temps nécessaire à l'orientation est d'autant plus grand que la molécule d'ADN est longue. Il devient alors possible de séparer les molécules en fonction de leur **longueur**. Cette méthode s'avère très utile dans les analyses du génome des procaryotes et des eucaryotes.

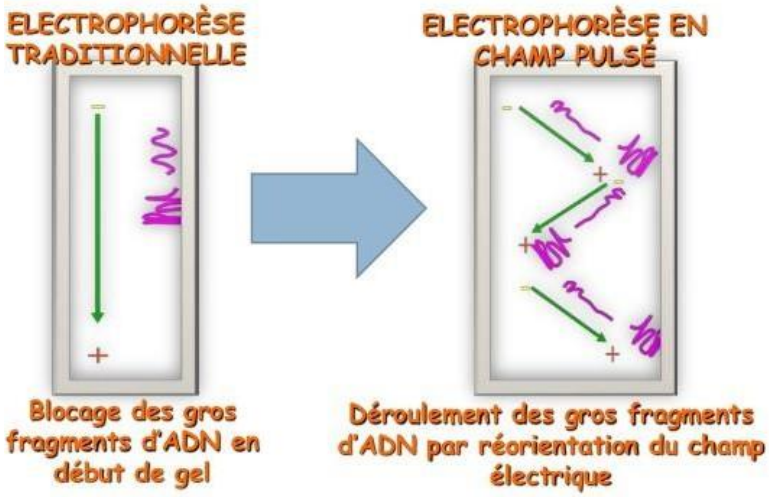
Ce type d'électrophorèse a été développé par Schwartz et Cantor en 1984 afin de séparer les grandes molécules d'ADN (> 50 kb) que l'électrophorèse classique en gel d'agarose ne permet pas de résoudre, même en diminuant au maximum la concentration d'agarose (en dessous de 0.4% les gels sont impossibles à manipuler).

La porosité d'un gel d'agarose classique est inférieure au micron alors que la longueur d'une molécule d'ADN de 50 kb complètement étirée est d'environ 18 microns.

Le principe de l'électrophorèse en champ pulsé consiste à alterner l'orientation du champ électrique au cours du temps. Chaque changement de champ électrique réoriente la molécule d'ADN dans le gel augmentant ainsi la probabilité que la molécule d'ADN soit orientée de façon à passer à travers les mailles du gel.

Pour ce type d'électrophorèse, il n'est pas possible d'utiliser des ADN purifiés par les techniques classiques, car ces techniques les cassent en fragments d'une taille inférieure à 100 kb. Pour éviter la cassure mécanique des molécules d'ADN, les cellules sont incluses dans des blocs d'agarose.

La cartographie de restriction à grande échelle nécessite des enzymes qui coupent rarement l'ADN et le fractionnement des grands fragments de restriction par électrophorèse sur gel en champ pulsé

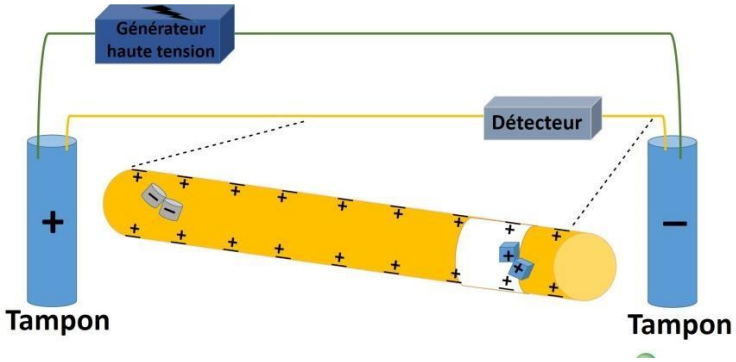


5-3- Electrophorèse capillaire (CE)

C'est une technique récente qui commence à se développer et qui offre essentiellement les avantages de la **rapidité**, de la très grande **résolution** et, partant, de la très grande **sensibilité** de la détection.

En électrophorèse traditionnelle, les éléments chargés électriquement se déplacent dans le liquide conducteur sous l'influence d'un champ électrique. Introduite dans les années 1960, la CE a été conçue pour séparer des espèces chimiques selon leur rapport charge / taille à l'intérieur d'un petit tube capillaire rempli d'un électrolyte

L'électrophorèse capillaire représente une famille de techniques qui utilisent des capillaires étroits (diamètre interne de 10 à 200 mm) pour réaliser avec une très grande efficacité la séparation électrophorétique de molécules de tailles très variables. Le domaine d'application de cette technologie est très vaste et elle permet d'analyser des macromolécules complexes telles que les protéines et les acides nucléiques ou des solutés de petite taille comme les médicaments organiques, les anions et cations inorganiques. Des voltages très importants (plusieurs dizaines de kV) sont utilisés pour séparer les molécules sur la base de leur différence de rapport charge/taille. L'instrumentation est relativement simple et comporte les éléments principaux suivants : un générateur de haut voltage, deux réservoirs de tampon et un capillaire que traverse un système optique de détection relié à un module d'acquisition des données *(figure 1)*. L'ensemble de l'instrument est contrôlé par un ordinateur.



Série d'exercices

Exercice01 :

Sur la paillasse, on réalise les différents mélanges indiqués dans le tableau ci-dessous.

- Les mélanges suivants seront-ils homogène ou hétérogène ? et quelles sont les méthodes de séparations ?

Mélange	Eau+ huile	Eau+ éthanol	Eau+ argile	Eau+ colorant
Prévision de l'homogénéité ou de l'hétérogénéité du mélange				
Méthode de séparation				

Exercice02 :

i. Il est possible de calculer le temps nécessaire pour qu'une particule se décante.

Le tableau suivant donne ce temps en fonction de la taille de la particule dans certain volume d'eau.

Diamètre de la particule en mm	Exemple de particules	Temps mis pour décanter
10	gravier	1 seconde
1	sable	20 secondes
0,1	Sable fin	2 minutes
0,001	argile	20 heures

- Comment varie le temps mis par une particule pour décanter en fonction de son diamètre?

ii. Une particule solide de forme sphérique de rayon r et d'une masse volumique ρ_p es plongée dans un liquide de masse volumique ρ_l et de viscosité η.

- Donner une représentation schématique des forces qui s'exercent sur cette particule.
- Trouver l'expression de la vitesse de sédimentation en fonction des différents paramètres indiqué dans l'énoncé. Donnée : $F=6\pi r\eta v$

Exercice03 :

Soit une éprouvette contenant quelques ml d'eau surmontée de quelques ml d'huile par exemple 5 ml, on agitant rigoureusement, on provoque formation des gouttelettes d'huile de rayon de 5µm.

- Qu'appelle –on le mélange obtenu.
- Faire un schéma.
- Calculer le nombre N de gouttelettes formées.

Exercice 04 :

On se propose d'étudier la sédimentation d'une particule contenue dans un liquide par décantation puis par centrifugation. Dans les deux cas, les particules sont considérées comme

sphériques et elles migrent avec des vitesses v_1 et v_2. On notera r_p, le rayon de la molécule, ρ_p sa masse volumique, ρ_L celle du liquide, g l'accélération de la pesanteur et y l'accélération due à la rotation, Ꞷ vitesse de rotation du rotor et R bras de la centrifugeuse.

1- Calculer v_1 et N (nombre de rotation par minute).
2- Quelle serait la durée t_1 (en seconde et en heures) nécessaire pour que la molécule sédimente sur une distance de 1mm pour le 1er cas.

Données :

ρ_L= 1,05.10^3 kg/m^3 ; ρ_p= 1,35.10^3 kg/m^3 ; η_L=4.10^{-3} Pa.s ; g=9,81 m/s^{2,} r_p=5 nm; R= 6 cm; Ꞷ= 1,57.10^3 rad/s.

Exercice 05

On veut extraire un produit solide A qui se trouve dans un mélange liquide après une réaction chimique.

1- Quel type de mélange obtenu ? quelle est la technique de séparation utilisée ?
2- Quelle est l'influence de la surface du filtre sur le débit volumique de filtration, justifier votre réponse ?
3- Calculer le rendement du produit A, sachant que la masse de A= 6,6g.

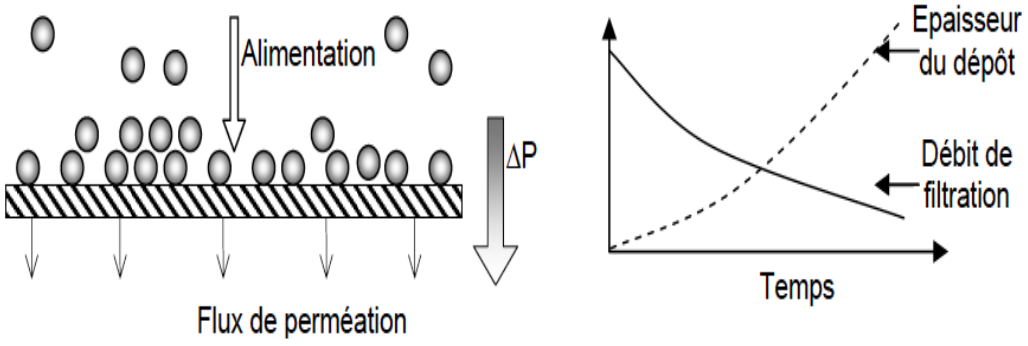
Données :

Masse molaire de A= 304,9 g/mol ; nombre de mole de A= 4,62.10^{-2} mol.

Exercice 06 :

1-Que ce qu'elle représente la figure donnée ci-dessous ?

2-Interpréter le graphe.



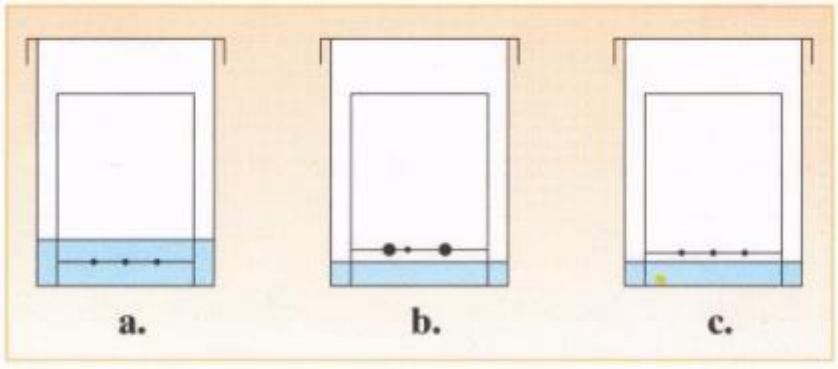
Exercice 07 :

On veut extraire l'acide benzoïque A d'une boisson au coca à l'aide d'un solvant. On dispose 3 solvants : dichlorométhane, éthanol et éther éthylique.

solvant	eau	dichlorométhane	ethanol	Ether éthylique
Solibilité de A	faible	moyenne	bonne	bonne
densité	1	1,34	0,8	0,6
Miscibilité avec l'eau	/	Non miscible	miscible	Non miscible

1- Quel solvant faut-il- choisir ? justifier votre choix.
2- Faire un schéma du principe.

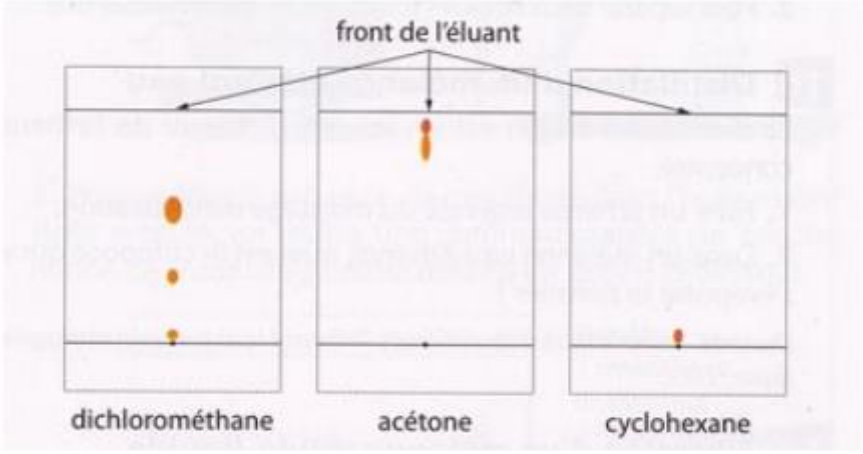
Exercice 08 :



1. Parmi les schémas de mise en œuvre d'une chromatographie suivants, trouver celui qui correspond aux bonnes conditions opératoires ?
2. Justifier la réponse.

Exercice 09 :

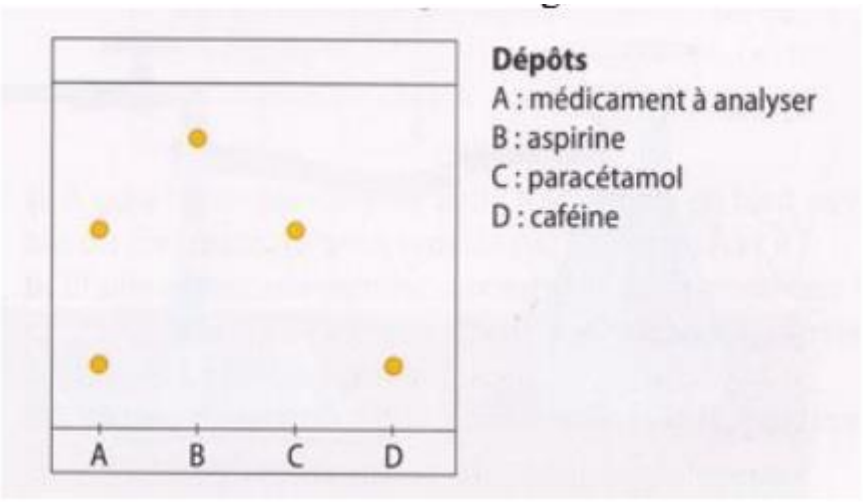
Lors de l'analyse d'un médicament, on a réalisé différentes chromatographie sur couche mince avec trois éluant différents. Les chromatogrammes obtenus sont données ci-dessous.



1. Quels sont les éluants qui ne conviennent pas ? Justifier.
2. De combien de corps purs ce médicament est-il composé ?

Exercice 10 :

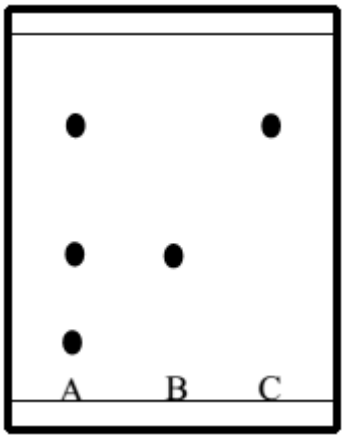
Afin d'identifier les principes actifs d'un médicament, on a réalisé la CCM dont le chromatogramme est le suivant :



1. Combien de composants possède le médicament à analyser.
2. Quels sont les produits purs et les mélanges ?
3. Quels sont les composés chimiques présents dans le médicament.

Exercice 11 :

On réalise la chromatographie de trois encres. Une encre noire, notée A, une encre verte, notée B et une encre bleue, notée C. Le chromatogramme obtenu est donné ci-dessous.



1. En analysant le chromatogramme que pouvez-vous dire sur les encres testées ?
2. Déterminer le rapport frontal de la tache correspondant à l'encre C.

Exercice 12 :

Un échantillon contient deux composés A et B séparé par CCM sur de la silice. Après migration, la révélation conduit à deux taches. La migration du front de solvant dans cette expérience est de 6 cm.

- Calculer R_f, N et H pour chacun des composés.
- Calculer le facteur de résolution entre les deux composés A et B.

Sachant que : x_A= 31 mm et w_A= 1,5 mm x_B= 26 mm et w_B= 2,2 mm

Exercice 13 :

Calculer le facteur de séparation entre deux composés 1 et 2 dont les volumes de rétention sont respectivement égaux à 6 et 7 ml. Le volume mort de la colonne utilisé est de 1ml.

Exercice 14 :

Une colonne tubulaire ouverte utilisée pour la séparation d'un mélange a un diamètre intérieur de 0,25 mm. On utilise une vitesse d'écoulement volumétrique de 1,0 ml/min.

Calculer la vitesse d'écoulement linéaire en cm/s à la sortie de la colonne.

Exercice 15 :

Les coefficients de l'équation de Van Deemter sont déterminés à :

$A = 10^{-3}$ cm, $B = 0{,}144$ $cm^2.s^{-1}$, $C = 10^{-3}$ s

a) Quelle est la vitesse linéaire moyenne de la phase mobile qui minimise la hauteur d'un plateau théorique?

b) Quel serait la hauteur minimale équivalente à un plateau théorique de la colonne ?

Exercice 16 :

Un mélange de deux composés A et B est séparé sur une colonne de 2 m.

Calculer la résolution de la colonne.

Données expérimentales :

trA = 300s ω_A = 18,5s

trB = 320s ω_B = 21,5s

trm = 60s

Exercice 17 :

Un mélange de trois acides-aminés : l'arginine, la cystéine et l'acide aspartique, est soumis à une chromatographie sur une résine polystyrénique substituée par des groupements sulfonate ($-SO_3^-$). Les pH isoélectriques de l'arginine, la cystéine et l'acide aspartique sont respectivement : 3,00 ; 5,0 ; 10,8 à 25°C. On dépose ces 3 acides aminés sur la colonne, à pH 2, puis on élue en amenant progressivement le pH à 7 et à 11.

Quel est l'ordre d'élution des acides aminés? (On considérera que les interactions acide aminé-résine sont uniquement d'ordre électrostatique).

Exercice 18 :

Un mélange de trois acides aminés : acide aspartique (pHi = 2,87), Arginine (pHi = 10,76) et Leucine (pHi = 6), est soumis à une chromatographie sur colonne échangeuse de cations.

L'élution est effectuée à l'aide d'un tampon à pH = 6.

Dans quel ordre peut-on prévoir la sortie de ces acides aminés ?

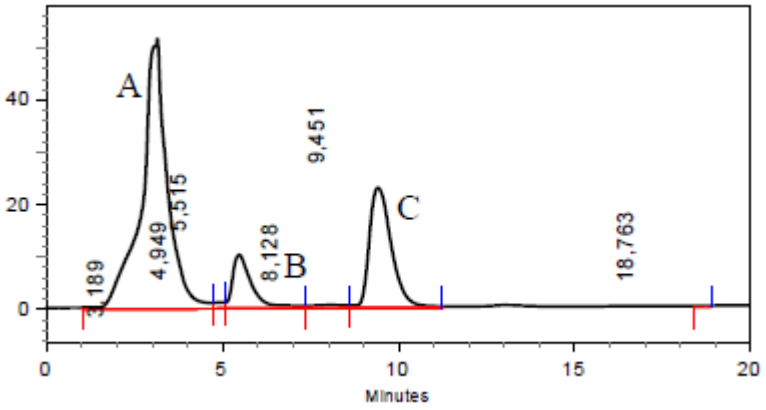
Exercice 19 :

On se propose de doser l'aspartame, la caféine, la saccharine et l'acide benzoïque dans diverses boissons par CLHP.

- Proposer un type de phase stationnaire pour ce dosage.
- A quels pics correspondent les composés suivants : benzène, éther diéthylique et n-hexane.

Les conditions expérimentales sont: la colonne a 4 mm de diamètre, 150 mm de long. Le débit est de 1mL/min. La phase stationnaire C18 est constituée de greffons de chaînes aliphatiques

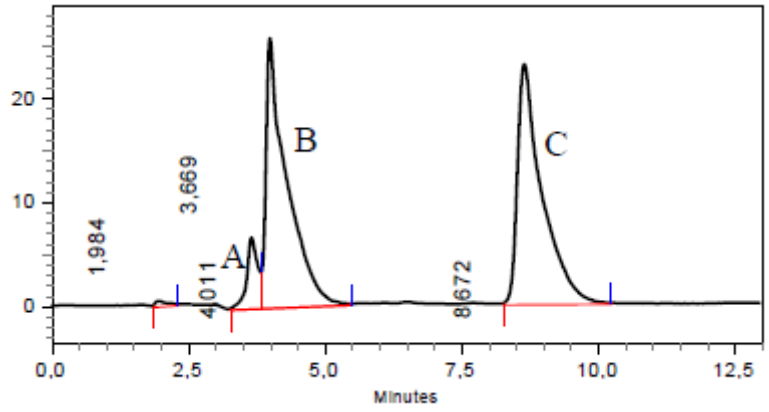
à 18 carbones. L'élution est faite par un mélange isocratique de méthanol (60%) et d'eau (40%).



Exercice 20 :

La séparation suivante a été obtenue par CLHP Shimadzu LC 8A. Les conditions opératoires sont les suivantes:

phase stationnaire greffée C_{18} Supercosil™ LC-18	taille de particule: 5µm
longueur de colonne: 25 cm	température: 20°C
débit: 1mL/min	teneur en eau: 50% teneur en méthanol: 50%
pression en tête de colonne: 50.105Pa	



Produit	Largeur à mi-hauteur $\omega_{1/2}$ (min)
A	0,04
B	0,52
C	0,61

1) Quel est le type de polarité de phase la utilisée ? Justifiez votre réponse.

2) A partir du chromatogramme déterminer :

a) L'efficacité pour les composés A, B et C

b) L'efficacité moyenne de la colonne

c) Le volume mort Vm de la colonne

d) Les facteurs de rétention k'A, k'B et k'C des composés A, B et C.

e) La sélectivité α de la séparation.

f) La résolution R de la séparation.

g) La résolution de Purnel (RP) de la séparation.

h) Si la colonne mesure 30 cm, calculez le temps de rétention du dernier composé, toutes choses égales par ailleurs.

Références bibliographiques :

1. F. ROUESSAC, A. ROUESSAC. Analyse Chimique. 6ème édition Masson Paris (2004).
2. G. MAHUZIER, M. HAMON Abrégé de chimie analytique «méthodes de séparation» tome 2 ; Ed. Masson, Paris, New York, Barcelone, Milan, (1978).
3. M.CHAVANE ; G.J. BEAUDOIN A. JULLIEN; E. FLAMMAND «Chimie organique expérimentale», Modulo Editeur, (1986).
4. G.GUICHON, C. POMMIER «la chromatographie en phase gazeuse», Ed. Gauthier-Villars (1971).
5. J. TRANCHANT, Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse ; 6ème Ed. MASSON ; Paris, New York, Barcelone, Milan, (1-06-1996).
6. STAVROS Kromidas, pratical Problem solving in HPLC, Ed. WILEY-VCH Verdag (2000)
7. R.P BUDHIRAJA, Seapartion chemistry new age international (P) Ltd (2004)
8. Jean-Louis CUQ, Chromatographie liquide, université Montpellier (2007)
9. Z. Kabouche, Cours et exercices de Chromatographie, OPU Constantine (2010).
10. P. Petitjean, O. Henin, S. Ellias, G. Gruau. Application de l'électrophorèse capillaire au dosage des anions et des cations majeurs en solution dans les eaux douces naturelles, cahiers techniques de géosciences Rennes N°2 (2001).
11. D. Christophe, P. Michel, Méthodes d'analyses Spectroscopiques et Chromatographiques. Bourgogne (2003).
12. G. Steve, La chromatographie et l'lectrophorèse