République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche scientifique

Université de Médéa

Faculté des Sciences

Méthodes d'analyse séparatives

Selon le programme pédagogique officiel du 1ère année Master, Chimie Des Matériaux, Chimie)

Dr. Boucherit Nabila

Maître de conférences A

Département science de la matière

Validé par le conseil scientifique de la faculté des sciences à .....

Numéro de série: .....

Année universitaire 2023-2024

Ce polycopié a été expertisé par:

1. ..... (Prénom Nom du 1er expert), ... (grade), ... (Établissement).

2. ..... (Prénom Nom du 2eme expert), ... (grade), ... (Établissement).

3. ..... (Prénom Nom du 3eme expert), ... (grade), ... (Établissement).

Préambule

Ce support de cours constitue une approche de l'approfondissement des méthodes de séparation classiques et instrumentales les plus pratiquées dans la filière de chimie voire en recherche analytique.

Ce cours

Il est concentré vers les principes, les fondements et les aspects techniques des méthodes de séparation bien que chromatographique que les conventionnelles, habituellement utilisées au laboratoire.

Les principes et les techniques contenus dans le présent polycopié, sont visés principalement aux étudiants du deuxième cycle spécialistes en chimie des matériaux, comme il peut servira aux étudiants de master en sciences biologiques et en génie des procédés.

Les méthodes de séparation classiques traités concernent : l'extraction solide*liquide, la filtration, la décantation, la centrifugation et la cristallisation.

Dans le chapitre IV, tous les principes, les lois fondamentales et les méthodes chromatographiques couplées ou individuelles sont détaillées.

Comme une application à la séparation des molécules biologiques, l'électrophorèse sera décrite en cinquième chapitre.

Sommaire

Chapitre I : Décantation-Filtration	
I. Généralités	1
I.1. Corps pur et mélange	1
I.2. Caractéristiques physiques d'une espèce chimique	2
II. Méthodes de séparation	3
II.1. Définitions	3
II.2. Classification	4
III. Sédimentation	5
III.1. Principe	6
III.2. Types de sédimentation	6
III.3. Vitesse de Vitesse de décantation des particules dans un liquide	7
VI. Décantation	9
IV.1. Principe	9
IV.2. Caractéristiques	10
IV.3. Applications	10
V. Filtration	11
V.1. Définition	11
V.2. Classification	11
V.3. Filtration gravimétrique	13
V.4. Filtration sous vide	14
V.5. Filtration sous pression, filtration membranaire	15
V.6. Les filtres	15
V.7. Caractéristiques physiques des filtres	17
V.8. Applications	18
Chapitre II : Extraction sur phase solide	
I. Introduction	19
II. Définitions et terminologie	19
III. Principe	19
IV. Méthodes d'extraction solide-liquide	19
V. Modes d'extraction	21
VI. Mécanisme	21
VII. Efficacité d'extraction	21

VIII. Utilisations	22
Chapitre III : Méthodes de séparation classiques	
I. Introduction	23
II. Distillation	23
II.1. Notions théoriques	23
II.2. Définition	25
II.3. Distillation simple	25
II.4. Rectification	26
III. Cristallisation	27
III.1. Généralités	27
III.2. Théorie de cristallisation	28
III.3. Etapes de cristallisation	29
III.4. Modes de cristallisation	29
III.5. Facteurs influençant la cristallisation	30
III.6. Applications	31
III.7. Recristallisation	31
IV. Centrifugation	31
IV.1. Principe	31
IV.2. Definitions importantes	33
III.3. Types de centrifugation	36
III.4. Appareillage : centrifugeuse	37
Chapitre IV.a : Notions fondamentales de la Chromatographie	
I. Introduction	39
II. Principe	39
III. Classification	40
III.1. Nature physique des phases	40
III.2. Nature des phénomènes	40
III.3. Selon les procédés utilisés	41
IV. Terminologie	41
V. Caractéristiques d'un chromatogramme	41
VI. Calculs chromatographiques	44

VI.1. Facteur de rétention k' (capacité)	44
VI.2. Facteur de sélectivité α ou facteur de séparation	44
VI.3. Nombre de plateaux théoriques (efficacité théoriquqe)	45
VI.4. Nombre de plateaux effectifs (efficacité réelle)	46
VI..5. Résolution (Rs)	46
VI.6. Modèle cinétique de la chromatographie	48
VII. Optimisation d'une analyse chromatographique	48
VIII. Notion de pression (perte de pression ou perte de charge)	49
Chapitre IV.b : Chromatographie planaire	
I. Introduction	51
II. Chromatographie sur couche mince (CCM)	51
II.1. Objectifs	51
II.2. Mécanisme	52
II.3. Constituants d'une CCM	52
II.4. Réalisation d'une CCM	57
II.5. Calculs chromatographiques	59
II.6. Applications	60
III. Chromatographie sur papier	61
III.1. Constituants de la CP	61
III.2. Réalisation d'une CP	62
III.3. Inconvénients de la CP	62
Chapitre IV.c : Chromatographie liquide sur colonne conventionnelle	
I. Introduction	63
II. Principe	63
III. Quelques notions de base	63
IV. Constituants de la chromatographie liquide sur colonne,	63
IV.1. La PS	64
IV.2. La PM	66
IV.3. L'échantillon	68
V. Facteurs dont dépend la séparation	68

VI. Préparation d'un système chromatographique en chromatographie	69
VI.1. Remplissage de la colonne	69
VI.2. Dépôt des produits à analyser	70
VI.3. Elution	70
VII. Propriétés	71
Chapitre VI.d : CPG et Coupage CG/SM/SM	
I. Introduction	72
II. Principe	72
III. Appareillage	73
III.1. Alimentation en gaz vecteur	73
III.2. Système d'injection	74
III.3. Four	76
III.4. Colonnes	76
III.5. PS	78
II.6. Echantillons	81
III.7. Détecteurs	81
IV. Effet de la vitesse de PM sur l'efficacité de la colonne	84
V. Applications	85
VI. Couplage avec la spectroscopie de masse	85
VI.1. Principe	86
VI.2. Conception	86
Chapitre VI.e : HPLC et Coupage HPLC/ICP/MS	
I. Introduction	93
II. Principe	93
III. Conception d'un appareil de CLHP	93
IV. Couplage HPLC-ICP-MS	100
IV.1. Principe	101
IV.2. Qq définitions	101
IV.3. Conception de l'installation couplage HPLC – ICP-MS	101
V. Quelques applications	105
Chapitre V : Electrophorèse	

I. Introduction	106
II. Principe	106
II.1. Mobilité électrophorétique, (μ)	106
II.2. Le champ électrique E	108
II.3. Courants liquidiens	108
II.4. Durée de migration	108
II.5. Facteurs liés à la nature du support	108
III. Types d'électrophorèse	109
III.1. Electrophorèse de zone	109
III.2. Electrophorèse de focalisation isoélectrique	111
Références bibliographiques	

Chapitre I : Décantation-Filtration

I. Généralités

I.1. Corps pur et mélange

Une substance constituée d'une seule espèce chimique est un corps pur. On représente le corps pur par une formule chimique. Ex : le dioxygène O_2, l'acide salicylique de formule $C_7H_6O_3$.

Une substance constituée de plusieurs espèces chimiques est un mélange. Ex : un comprimé d'aspirine effervescent ; eau salée, alliage de métaux.

Les mélanges peuvent être donc homogène ou hétérogènes, dans le deuxième cas, ces mélanges sont constitués soit de la même phase : mélange les liquides non miscibles ou de plusieurs phases (Tableau 1.) qui dépend des états des constituants.

Tableau.1. Exemple des mélanges

Mélange	**Désignation**
Liquide-Liquide : hétérogène	Emulsion
Liquide-Liquide : homogène	Solution
Liquide-gaz	Brouillard
Solide-liquide : hétérogène	Suspension, colloïde (1-1000nm)
Solide-liquide : homogène	Solution
Solide-gaz	Fumée
	Mousse
Solide-solide	Alliage, cristaux mixte

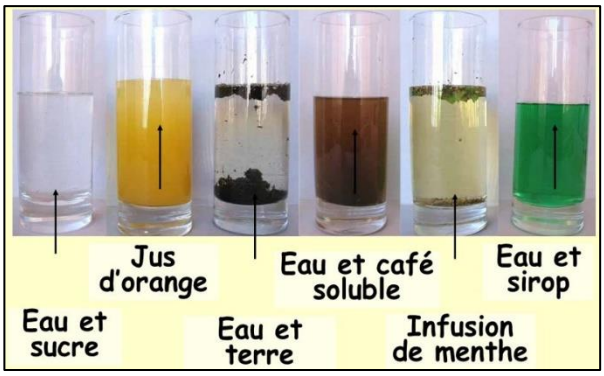


Figure 1. Exemples de mélanges homogènes et hétérogènes

I.2. Caractéristiques physiques d'une espèce chimique

Une espèce chimique est un ensemble de molécules ou d'ions tous identiques. Chaque espèce chimique est caractérisée par son nom, son aspect, sa formule chimique, et des grandeurs physiques (solubilité, masse volumique, point de fusion et d'ébullition).

a. Solubilité

Elle est exprimée en g/L, et est par la masse maximale d'une espèce chimique dissoute dans un volume de solvant donné. Elle dépend de la température, de la nature de soluté et de celle du solvant.

Une espèce chimique dont la solubilité dans un solvant est presque nulle est dite insoluble dans ce solvant : ce mélange est *hétérogène*.

La solubilité de $CuS0_4$ dans l'eau, est de 3 ,17 g/ L à 20 °C.

La bibliographie donne les propriétés de solubilité du soluté dans le solvant par les termes : très soluble, soluble, peu soluble, très peu soluble et insoluble. Le tableau 2, représente les termes descriptifs de solubilité.

Tableau 2. Termes descriptifs de la solubilité

Quantité approximative de solvant en volume pour une partie de substance en poids	Termes descriptifs
Moins de 1 ml	Très soluble
De 1 à 10 ml	Facilement soluble
De 10 à 30 ml	Soluble
De 30 à 100 ml	Assez soluble
De 100 à 1000 ml	Peu soluble
De 1000 à 10000 ml	Très peu soluble
Plus de 10000 ml	Pratiquement insoluble

Source: Le Hir, 1986, Pharmacopée Européenne, 2005.

b. Masse volumique, (ρ) et densité (d)

Masse d'un volume déterminé, c'est la mesure de la densité de la matière qui compose la substance. La masse volumique est plus grande à l'état liquide qu'à l'état gazeux et à l'état solide qu'à l'état liquide.

La densité représente le rapport entre la masse volumique de la substance et la masse volumique de l'eau.

c. Température de fusion et température d'ébullition

Le point de fusion est la température à laquelle les formes solides d'une substance pure peuvent exister en équilibre.

Le point d'ébullition est la température à laquelle, la substance passe de l'état liquide à l'état vapeur, Où les deux phases sont en équilibre. Ce paramètre dépend de la pression.

II. Méthodes de séparation

II.1. Définitions

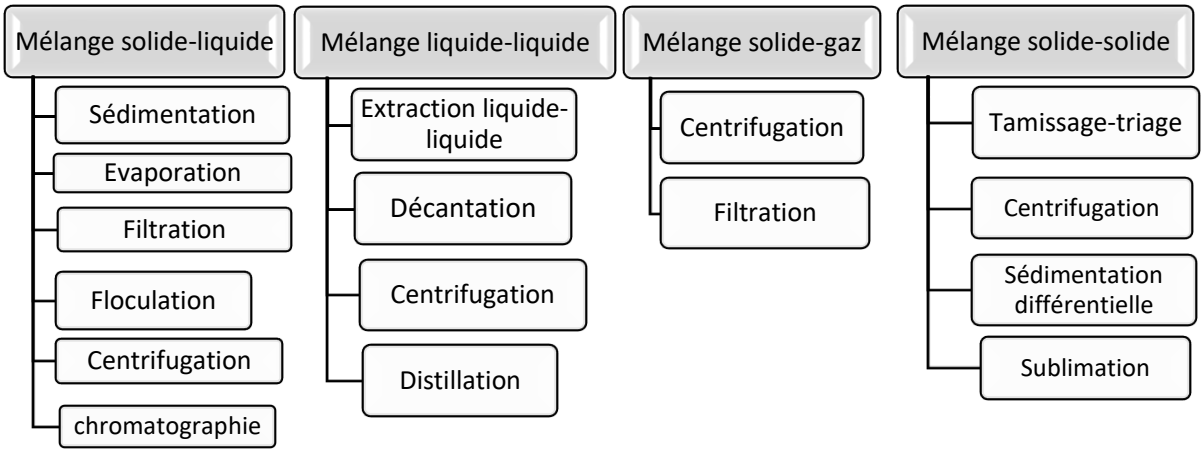
En chimie, il s'agit des techniques physiques ou chimiques, ou encore des technologies qui permettent d'obtenir à partir d'un mélange de substances, deux ou plusieurs constituants différents destinés à l'analyse. Les méthodes de séparation sont basées sur l'état des mélanges donc sur les propriétés physiques des constituants et le reste du mélange. Les procédés de séparation ont pour objectifs de :

1. Fractionnement d'un mélange
2. Purification : réduction voire élimination des impuretés
3. Concentration et stérilisation.

L'efficacité de séparation dépend des propriétés des constituants du mélange, elle est d'autant importante quand la différence des propriétés de ces derniers est grande.

II.2. Classification

Il existe deux grandes familles de procédés de séparation, les méthodes (ou procédés) physiques et les méthodes chimiques. La méthode appliquée est selon que le mélange à séparer est homogène ou hétérogène. L'organigramme suivant, présente les différentes techniques de séparation pour les mélanges mono et diphasiques.



a. Méthodes chimiques

Elles sont généralement basées sur l'ajout des réactifs pour une réaction chimique (précipitation, coagulation-floculation, etc).

b. Méthodes physiques

Ces méthodes se basent sur les propriétés physiques (ou mécaniques) ou encore sur des phénomènes de diffusion. Toute séparation, est basée sur :

- La différence des points de fusion (sublimation)
- La différence des points d'ébullition, (distillation)

- La différence de solubilités dans un solvant, (concentration, recristallisation, précipitation)
- La mouillabilité de surface
- La mobilité électrique (électrophorèse)
- La granulométrie (Filtration, tamisage, triage, chromatographie d'exclusion stérique).
- Les masses ou les masses volumiques.

Les séparations par diffusion englobent les techniques chromatographiques, les extractions, les séparations thermiques basées sur les transitions de phase (évaporation, distillation, cristallisation, sublimation), les séparations membranaires par diffusion (osmose et osmose inverse, dialyse, pervaporation) et les séparations par transfert d'ions (échange d'ions, techniques électro-membranaires).

Le tableau 3, résume les différentes méthodes de séparation et les principes correspondants.

Tableau 3. Principales méthodes de séparation et les principes correspondants

Méthodes de séparation	**Principe**
Tamisage, Filtration	Taille des particules
Décantation, Sédimentation	Grande différence de densité
Centrifugation	Faible différence de densité
Évaporation, Distillation simple	Grande différence entre les points d'ébullition
Distillation fractionnée	Faible différence entre les points d'ébullition
Sublimation	Différence entre les points de sublimation
Cristallisation, précipitation	Solubilité, point de solidification
Chromatographie, Extraction	Différence de polarité, Solubilité

III. Sédimentation

La sédimentation consiste au dépôt des particules solides en suspension dans les fluides (liquide et gaz), sous l'effet d'un champ de forces qui peut être : gravimétrique, centrifuge ou électrique. Ce phénomène peut se manifester différemment selon la concentration de la suspension, les caractéristiques propres des particules et les interactions possibles entre elles (figure 2). Le liquide récupéré est appelé « surnageant ou clarifié », il est peu chargé en particules en suspension et les particules solides déposées au fond du récipient s'appellent « dépôt, sédiment ou boues ».

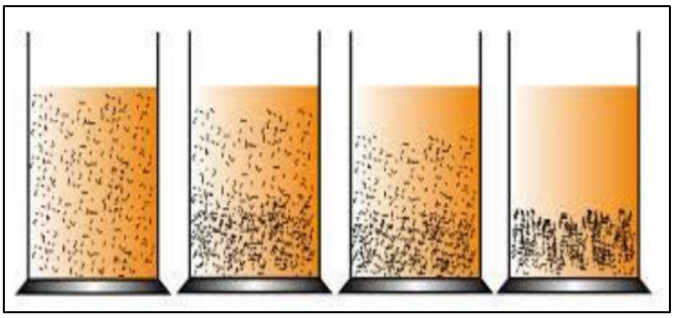


Figure 2. La sédimentation d'un mélange hétérogène solide liquide

III.1. Principe

Si on laisse reposer une suspension solide dans une phase liquide, on observe que les particules sous l'action de la pesanteur et de la poussée d'Archimède, tendent à tomber vers le fond ou à remonter à la surface selon leur densité et leur taille.

Autrement dit, elle consiste à séparer d'un liquide les particules en suspension en utilisant les forces gravitaires, pour qu'il puisse y avoir séparation effective faut-il encore que les forces de gravité soient suffisamment élevées par rapport aux effets antagoniste : effet de frottement, champ de turbulence, répulsion électrostatique courant de convection, etc. …

Ce phénomène peut être relativement lent pour les très fines particules et les liquides visqueux. Cependant, plusieurs paramètres affectent la vitesse de sédimentation :

• le diamètre des particules, en utilisant des floculants.

• la différence de densité.

• la viscosité du fluide, qui diminue avec l'élévation de la température.

• la surface de base du bac.

III.2. Types de sédimentation

Selon la concentration en solide et la nature des particules (densité et forme) on distingue 4 types de sédimentation.

a. *Sédimentation de particules discrètes*

(Dite discrète où individuelle), Ce type est caractérisé par le fait que les particules conservent leurs propriétés physiques initiales (forme, dimension et densité au cours de leur chute). La vitesse de chute est indépendante de la concentration en solides ; c'est pourquoi les lois classiques de Newton et de Stokes s'appliquent. Ce type de sédimentation est appliqué dans les dessableurs.

b. *Sédimentation de particules floculantes*

Ce type est caractérisé par l'agglomération des particules au cours de leurs chutes. Les propriétés physiques de ces particules sont modifiées au cours le processus. On retrouve ce type de sédimentation dans les décanteurs des usines de traitement des eaux et dans les décanteurs secondaires des usines d'épuration.

c. *Sédimentation freinée (en piston)*

Ce type est caractérisé par une concentration élevée de particules, ce qui entraîne la formation d'une couche de particules et, par conséquent, l'apparition d'une démarcation nette entre les solides sédimentés et le liquide surnageant. Ce type est trouvé dans la partie profonde des décanteurs.

d. *Sédimentation en compression de boue*

Dans ce cas, les particules entrent en contact les unes avec les autres et reposent sur les couches inférieures, dans cette zone le phénomène de consolidation est relativement lent, en retrouve ce type de sédimentation dans les épaississeurs de boues par gravité.

III.3. Vitesse de Vitesse de décantation des particules dans un liquide

Cette étude, concerne les particules sous forme sphérique. On pose l'hypothèse suivante :

- Concentration en volume des solides en suspension est inférieure à 0.5%, (particules trop éloignées comme si chacune est isolée dans le liquide).

Les forces appliquées à la particule sont schématisées sur la figure 3.

Dans un fluide, un solide en mouvement libre est soumis à :

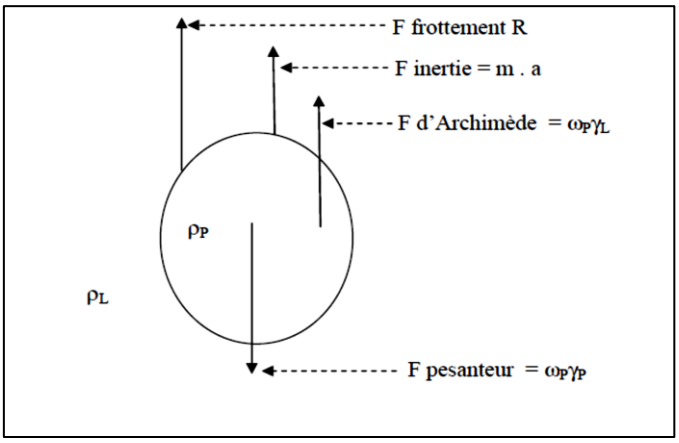


Figure 3. Forces agissant sur une particule dans un liquide

Dans un fluide, une particule solide en mouvement libre est soumise à :

- La pesanteur : $G = V_p \cdot \rho_p \cdot g$
- La poussée d'Archimède : $P = Vp \cdot \rho_L \cdot g$
- La résistance à l'avancement : $R = \frac{C_D}{2} \cdot S_p \cdot \rho_L \cdot V_C^2$
- La force d'inertie : $I = m.a = V_P \cdot \rho_P \cdot \frac{dV_C}{dr}$

Avec :

ρ_p et ρ_L : Masses volumiques de la particule et du fluide.

V_p, S_p, d : Volume, surface et diamètre de la particule solide.

V_C : Vitesse de sédimentation de la particule.

g : Accélération de la pesanteur.

C_D : Coefficient de trainée (adimensionnel), dépends du Nombre de Reynolds.

$Re = \frac{V_C \cdot d}{\nu}$

ν : Viscosité cinématique du liquide, $\nu = \frac{\eta}{\rho_L}$

η : Viscosité dynamique du liquide.

A l'équilibre, la somme des forces égale à m.γ :

$$V_P.\rho_P.\frac{dV_C}{dt} = V_P.(\rho_P - \rho_L) - \frac{C_D}{2}.\rho_L.S_P.V_C^2$$

La particule en mouvement, accélère jusqu'à : $\frac{dV_C}{dt} = 0$, d'où :

$$V_c^2 = \frac{2.V_P.g.(\rho_P - \rho_L)}{C_D.S_P.\rho_L}$$

Avec : $V_P = \frac{\pi.d^3}{6}$ et $S_P = \frac{\pi.d^2}{4}$

On aura alors :

$$V_c^2 = \frac{4.g.(\rho_P - \rho_L).d_p}{3.C_D.\rho_L}$$

Le coefficient de frottement C_D dépend du régime d'écoulement hydrodynamique (nombre de Reynolds Re) et de la forme de la particule. Ce coefficient peut être calculé par la formule

$C_D = a.R_e^{-n}$

Avec a et n constantes (voir tableau 4).

Tableau 4. Coefficient de frottement (C_D) = f(Re)

R_e	Régime	a	n	C_D	Formule
$10^{-4}<R_e<1$	Laminaire	24	1	$24R_e^{-1}$	Stokes
$1< R_e<10^3$	Intermédiaire	18,5	0,6	$18,5R_e^{-0,6}$	Allen
$10^3<$ $R_e<2.10^5$	Turbulent	0,44	0	0,44	Newton

IV. Décantation

C'est une opération de séparation mécanique, qui sous l'action de la gravitation deux liquides (ou plus) sont séparés par différence de leurs densités, (Figure 4).

IV.1. Principe

Les liquides non miscibles d'un mélange hétérogène peuvent être séparés par décantation. Le liquide le plus dense sera récupéré en premier lieu.

Généralement on utilise les ampoules à décanter pour y séparer les liquides non miscibles, c'est une opération simple, lente et peu couteuse, appliquée généralement après les opérations d'extraction.

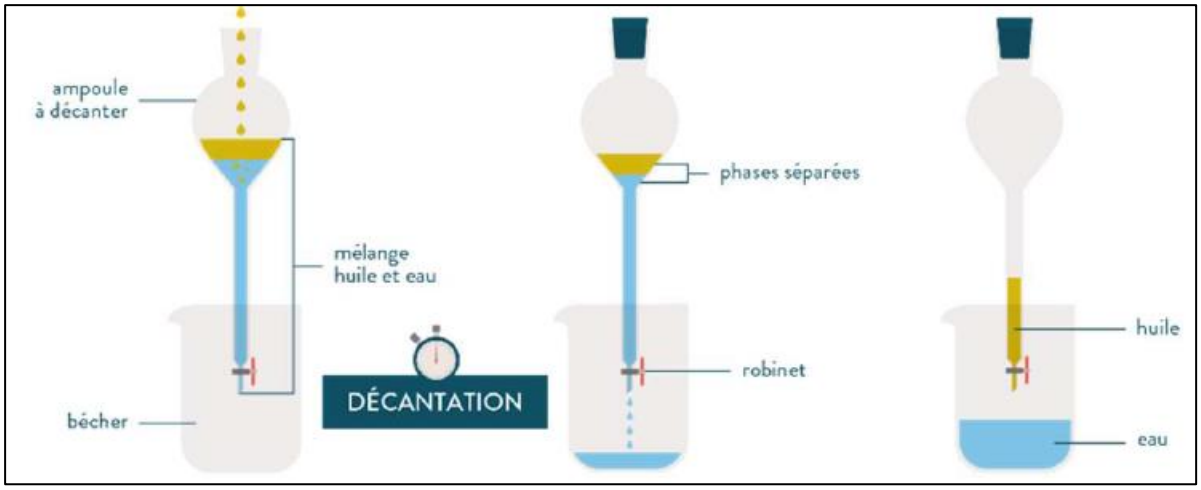


Figure 4. Décantation de deux liquides non miscibles

IV.2. Caractéristiques

- Opération simple mais longue
- Nécessite peu de matériel
- Peu couteuse
- Peu sélective
- Opération de clarification (prétraitement de filtration)

IV.3. Applications

Les décanteurs à gravité sont co:nrnonly utilisés dans les applications des huiles et l'industrie chimique, aussi bien en discontinu qu'en continu. Ils trouvent une utilisation intensive dans de nombreuses opérations : séparation de l'huile de l'eau dans les opérations d'alimentation en eau de la chaudière, séparation de l'eau du goudron des installations de production d'eau-gaz à carburateur, et dans les procédés dans les procédés d'extraction pour séparer l'extrait liquide du raffinat. Dans les industries pétrochimiques, les décanteurs sont utilisés pour le dessalage du pétrole brut, le lavage caustique des distillats légers, le nettoyage des eaux usées des raffineries contre la pollution par les hydrocarbures et la séparation des têtes des colonnes de distillation extractive.

V. Filtration

V.1. Définition

La filtration est une technique qui permet de séparer les constituants d'un mélange constitué d'une phase liquide ou gazeuse et l'autre, une phase solide qui y est insoluble. Pour ce faire, on utilise un matériaux poreux minéral ou organique, appelée filtre. Ce dernier doit être chimiquement inerte et il permet de retenir les particules solides en suspension dans le mélange qui sont plus grosses que ses pores (tableau .3.). Le liquide récupéré est appelé « filtrat ou perméat » et le solide recueillit dans le filtre est appelé « résidu, gâteau ou retentât ». La filtration est souvent utilisée en complément d'une décantation.

V.2. Classification

Il existe plusieurs modes de classification de filtration :

a. Selon la pression

- ***Filtration normale ou gravimétrique :*** résulte de la hauteur du liquide et la colonne ;

- ***Filtration à pression réduite*** : c'est une filtration sous vide ;

- ***Filtration sous pression :*** elle nécessite l'application d'une pression.

b. Selon le mode de passage de fluide

- ***Filtration frontale*** **:** elle consiste à faire passer le fluide à filtrer perpendiculairement à la surface du filtre ; son inconvénient réside dans l'accumulation des particules à sa surface(colmatage).

- ***Filtration tangentielle*** **:** elle consiste à faire passer le fluide tangentiellement à la surface du filtre : c'est la pression du fluide qui permet à celui-ci de traverser le filtre. Dans ce cas moins est le colmatage du filtre.

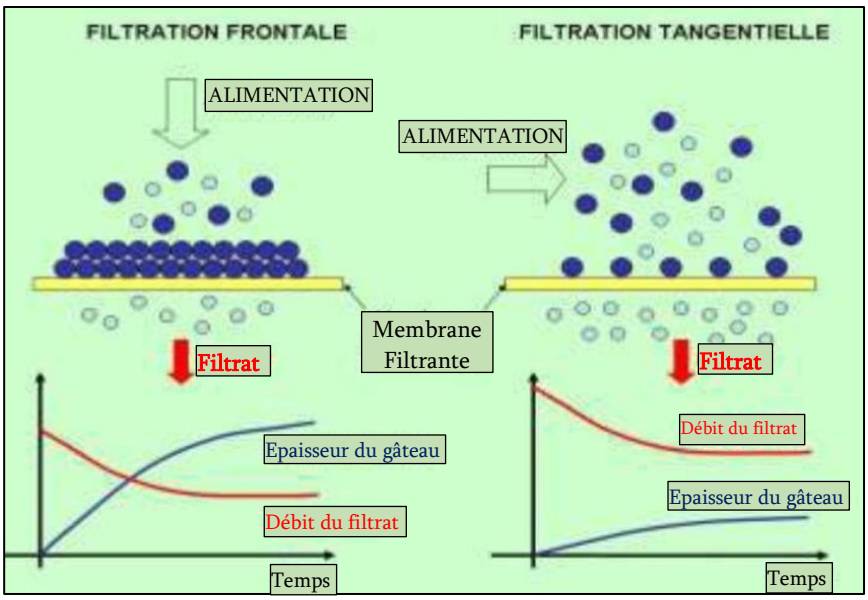


Figure 5. Filtration frontale et filtration tangentielle.

c. Selon les dimensions des pores, (figure 6) :

- Filtration clarifiante **:** séparation des particules de diamètre supérieur à 10 µm ;

- Micro-filtration : 10 µm à 100 nm (le filtre est de macropores), classée parmi les TSM, permet la rétention des particules en suspension : bactéries, colloïdes. Elle est caractérisée par une pression transmembranaire <2 bars.

- Ultrafiltration : plus de 10 nm à 100 nm (le filtre est de mésopores); classée parmi les TSM, permet la rétention des molécules de masse moléculaire élevée (protéines, polymères…), elle est utilisée pour l'élimination de macro-solutés présents dans l'eau à usage domestique ou médical. Elle est caractérisée par une pression transmembranaire comprise entre 2 et 10 bars.

- Nanofiltration : de l'ordre de 1 nm (jusqu'à 10 nm), où son nom ; classée parmi les TSM, permet la séparation des composants ayant une taille en solution voisine de celle de nanomètre, tels que : les sels ionisés multivalents (calcium, magnésium, sulfates…), les composés organiques non ionisés de masse molaire supérieure à 250 g/mol. Cette filtration est utilisée pour l'adoucissement de l'eau. La pression transmembranaire est comprise entre 10 et 20 bars.

- *Osmose inverse* : diamètre inférieur à 1 nm, (jusqu'à 0.1 nm), les membranes ne elle ne laisse passer que les molécules d'eau et arrêtent tous les sels. La pression appliquée atteint les 80 bars. L'OI est utilisée pour le dessalement de l'eau de mer et pour la production des eaux ultrapures.

RMQ : On parle de filtration stérilisante lorsque le diamètre des pores est inférieur à 0.22µm

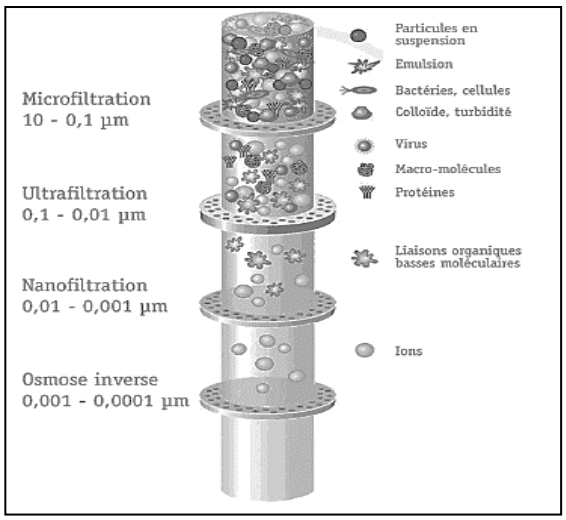


Figure 6. Classification de la filtration selon le diamètre des pores du filtre.

V.3. Filtration gravimétrique

On utilise pour cela des filtres, généralement en papier, coniques ou plissés, à travers lequel le liquide s'écoule sous l'action de son propre poids (figure 7). Dans cette méthode, l'entonnoir de laboratoire équipé d'un papier filtre est utilisé. La différence de pression est créée par la hauteur du liquide sur le filtre.

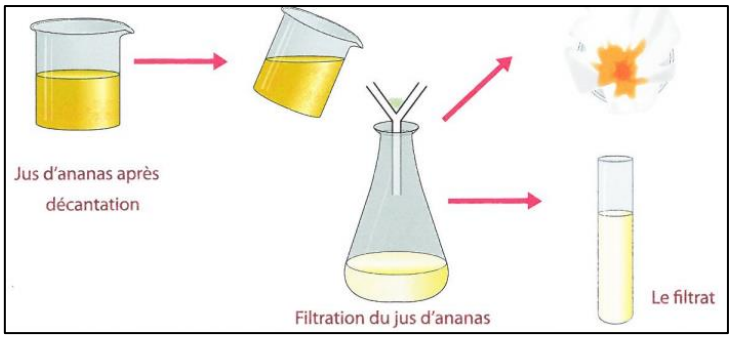


Figure 7. Filtration par gravité

La filtration gravimétrique présente les inconvénients suivants :

- Filtration lente.

- Difficulté de récupération de la phase solide, en particulier lorsqu'elle est peu abondante.

- Séparation incomplète, le solide retient une quantité non négligeable de liquide.

- Filtration de volumes élevés de mélange.

Pour pallier ces inconvénients, une filtration sous vide est souvent utilisée.

V.4. Filtration sous vide

La vitesse de filtration est augmentée par la création d'une dépression en aval du matériau filtrant **(Figures 8, 9)**. C'est le mode de filtration couramment utilisé pour les verres frittés et les membranes filtrantes. Des entonnoirs Büchner spéciaux adaptés sur une fiole à succion, dans laquelle une dépression est créé.

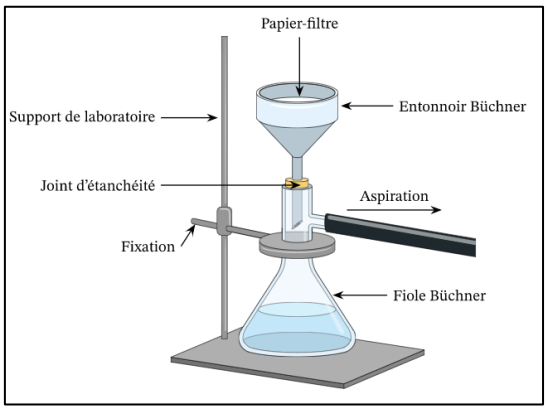


Figure 8. Schéma de filtration sous vide-Büchner-.

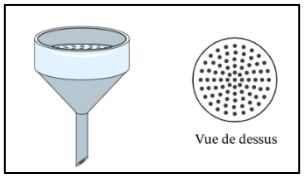


Figure 9. Filtre Büchner).

✓ ***Filtre de type 'Büchner'***

En porcelaine, de forme cylindrique avec un tamis à gros trous, on place dessus un filtre circulaire en papier, suffisamment grand pour couvrir la totalité du tamis.

✓***Filtre en verre fritté***

Il s'agit d'un entonnoir en verre qui contient un disque en verre fritté, de porosité fixée.

On utilise ce type de filtre dans des conditions de pH extrêmes où le papier ne résisterait pas. Cependant, on ne pourra pas utiliser ce type de filtre avec des solutions d'acide fluorhydrique qui réagit avec la silice du verre.

V.5. Filtration sous pression, filtration membranaire

La vitesse de filtration est augmentée en exerçant une pression sur le liquide à filtrer en amant du matériel filtrant représenté par une membrane filtrante (Figure. 10).

. La filtration sous pression évite le moussage et l'évaporation du solvant ; elle est d'un emploi fréquent dans l'industrie. Ce système de filtration sous pression avec membranes filtrantes existe également sous forme de cartouches filtrantes (millipore) adaptable sur une seringue pratique pour la filtration des petits volumes de solution à filtrer.

Dans ce type de filtration on distingue : la micro-filtration, l'ultra-filtration la nano-filtration et l'osmose inverse.

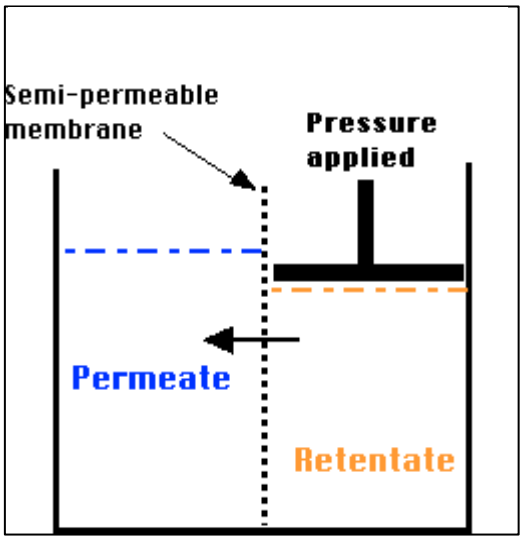


Figure 10. Filtration sous pression ou filtration membranaire.

V.6. 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. Ils peuvent être utilisés séparément ou ensemble, selon les besoins. 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) 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 (figure 11) :

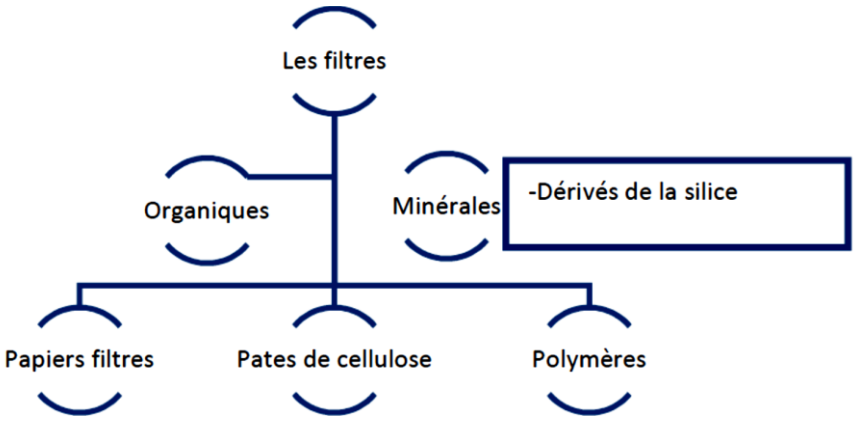


Figure 11. Différents types des filtres.

b) Les filtres membranes (écrans ou de surface)

Les plus utilisés sont les membranes millipores (Figure. 12). 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'ultra-filtration 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.

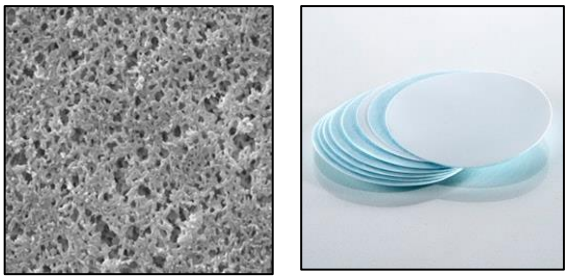


Figure 12. Texture et aspect des membranes filtres.

V.7. Caractéristiques physiques des filtres

a. Capacité de rétention

Elle correspond au diamètre de la plus grande particule solide qui passe à travers le filtre. Pour les membranes c'est la **Sélectivité :** elle est liée à la nature de la membrane, et est quantifiée par :

$$TR(\%) = \frac{C_0 - C_P}{C_0}$$

Avec :

C_0 et C_P : concentration de soluté dans la solution et le perméat respectivement.

b. Diamètre moyen des pores

La porosité est le diamètre maximum des particules retenues par le filtre. La porosité est déterminée par la mesure d'une pression, selon la formule :

$$d = 4.\frac{K.\alpha}{P}$$

Avec :

d : diamètre des pores ;

K : constante des conditions opératoires ;

α : Tension superficielle du liquide ;

P : pression.

d. Débit de filtration

Il correspond à la quantité de filtrat recueilli par unité de temps. Il est calculé selon la formule de Poiseuille :

$$D = \frac{N.dP.R^4}{8.\eta.L}$$

Avec :

D : Débit (ml/min)

N : nombre de canaux (proportionnel à la surface)

dP : Différence de pression entre les deux faces de filtre

R : rayon moyen des pores

L : épaisseur du filtre.

V.8. Applications

- *En agroalimentaire* **:** Concentration du lait, clarification du jus de fruit ;

- *En chimie :* séparation des composants après synthèse chimique ;

- *En pharmaceutique* : purification, dégazage, concentration et stérilisation ;

- *En traitement des eaux et dessalement de l'eau de mer*

Chapitre II : Extraction sur phase solide

I. Introduction

Le verbe extraire évoque une séparation sélective dans laquelle on retient l'une des phases (l'extrait) pour rejeter l'autre (le résidu). Il existe différents types d'extractions, l'extraction par pression, l'extraction liquide /liquide et l'extraction solide / liquide. Une deuxième définition est la suivante : c'est l'ensemble des méthodes qui permettent de séparer ou d'extraire une ou des espèces chimiques d'un mélange solide ou liquide. Ce mélange peut être hétérogène, homogène même d'une espèce brute.

II. Définitions et terminologie

L'extraction solide-liquide encore appelée extraction par solvant est une opération de transfert de matière destinée à séparer les principes solubles d'un substrat solide par leur diffusion dans un solvant choisi judicieusement.

- ***Soluté :*** constituant à extraire ;
- ***Diluant* :** liquide contenant les solutés ;
- ***Solution* :** solide + diluant ;
- ***Solvant* :** liquide d'extraction ;
- ***Extrait* :** phase issue de l'opération contenant les solutés extraits ;
- ***Raffinat* :** phase résiduelle épuisée de solutés.

III. Principe

L'extraction est basée sur le passage en solution d'un produit « soluté » d'une phase, vers un « solvant extracteur » dont le soluté est soluble. Donc nous avons un phénomène de transfert de matière entre deux phases.

IV. Méthodes d'extraction solide-liquide

La substance à extraire ou *soluté* est initialement présente dans un solide et l'extraction est assurée par immersion ou par percolation d'un liquide.

Parmi les extractions solide-liquide on distingue celle en mode discontinu et en mode continu.

✓ **Expression ou pressage :** consiste à presser les fruits ou les plantes pour en extraire le jus, l'huile (pressage des graines).

✓ **Extraction par solvant** consiste à laisser un végétal au contact du solvant froid ou chaud afin que certains de ses constituants s'y dissolvent.

✓ **Enfleurage :** extraction d'espèces aromatiques préféré pour les plantes fragiles. On les dépose sur des graisses inodores, (solide ou liquide, à froid ou à chaud) puis on récupère les arômes par malaxage des graisses avec de l'alcool.

✓ **Macération :** consiste à séjourner à froid ou à chaud une substance solide dans un solvant organique (éthanol, cyclohexane, huile, éther, …) pendant qq heures à qq semaines. Les espèces chimiques récupérées de solide sont généralement des arômes et des espèces colorées.

✓ **Infusion :** consiste à verser un liquide chaud sur la plante hachée. Ex : Un thé est préparé par infusion dans l'eau chaude des feuilles de théier séchées. La technique est similaire pour le café.

✓ **Décoction :** consiste à chauffer un végétal (généralement les parties les plus dures des plantes telles que les racines, les graines ou l'écorce) avec de l'eau, jusqu'à ébullition.

✓ **Hydrodistillation :** elle permet d'obtenir les huiles essentielles, composés odorants d'origine végétale pour les fleurs, les fruits …, (figure 13).

✓ **L'extraction par Soxhlet**, (figure 14). ce dernier est une pièce de verrerie permettant d'effectuer une extraction solide liquide avec une grande efficacité. Le Soxhlet est une méthode classique pour l'extraction solide-liquide. Les avantages du Soxhlet sont les suivants: l'échantillon entre rapidement en contact avec une portion fraiche de solvant, ce qui aide à déplacer l'équilibre de transfert vers le solvant. Cette méthode ne nécessite pas de filtration après extraction. Le Soxhlet est indépendant de la matrice végétale.

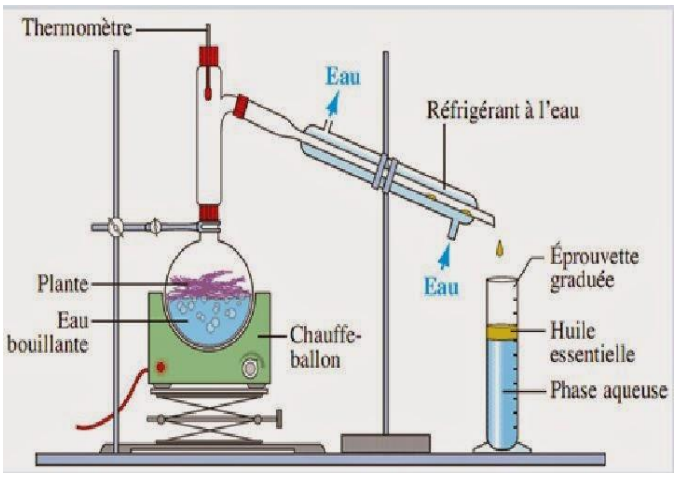


Figure .13. Montage d'hydrodistillation.

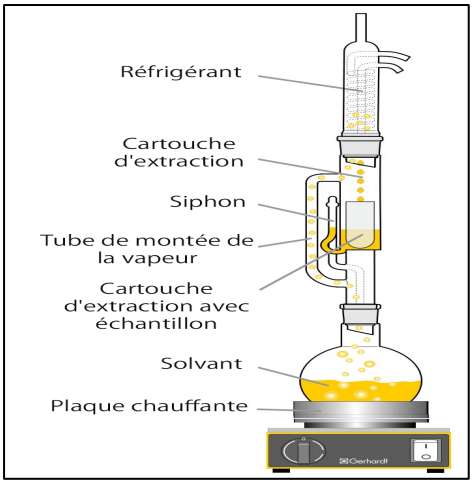


Figure.14. Appareil de soxhlet.

V. Modes d'extraction

Le contact entre les deux phases se fait à co-courant ou à contre-courant, (figure 15).

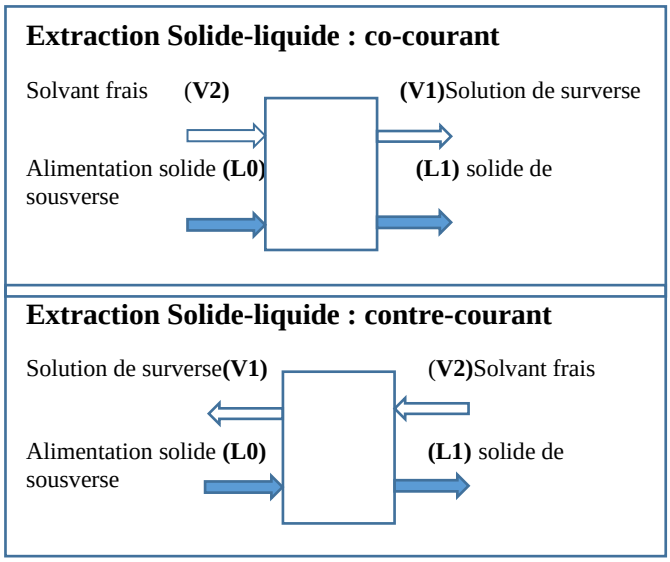


Figure 15. Modes de contact lors d'une extraction solide-liquide.

VI. Mécanisme

Le transfert de matière se réalise entre deux phases hétérogènes au sein d'un contacteur. La vitesse de TM résulte de quatre phénomènes :

- Pénétration de solvant dans le solide ;
- Libération de soluté dans le solvant ;
- Diffusion de la solution enrichie vers l'extérieur de la particule ;
- Transfert de la solution enrichie dans tout l'environnement.

VII. Efficacité d'extraction

Le taux d'extraction solide-liquide, dépend fortement du mode de contact, temps de séjours, la quantité de solvant et de soluté, des propriétés de solide : (ε, τ, taille, forme et surface spécifique).

Le rendement d'extraction est exprimé par :

$$R(\%) = \frac{m}{m_0} * 100$$

m : Masse de l'extrait sec obtenu (g).

m_0: Masse de la matière végétale initiale utilisée pour l'extraction, (g).

VIII. Utilisations

L'extraction solide-liquide sert à séparer le constituant soluté désiré ou à retirer le composant soluté indésirable de la phase solide. Elle est largement utilisée dans :

- Les industries biologiques et de transformation des aliments, comme la séparation du sucre des betteraves sucrières avec de l'eau chaude, l'extraction des huiles des arachides, du soja, des graines de tournesol, des graines de coton, des graines de lin, des graines de ricin et des foies de flétan.
- L'industrie pharmaceutique, de nombreux produits sont obtenus par lessivage des racines, des feuilles et des tiges des plantes.
- L'industrie de la transformation des métaux, la lixiviation sert à extraire les métaux de leurs minerais, qui contiennent de nombreux constituants indésirables, sous forme de sels dissous. Exemples : les sels de cuivre sont lessivés par dissolution de minerais de cuivre brut à l'aide d'acide sulfurique ou de solutions ammoniacales.

Chapitre III : Méthodes de séparation classiques

I. Introduction

Les techniques et les méthodes de séparation (classiques ou modernes) constituent une classe importante dans l'industrie et l'ingénierie, et ceci dans le but d'identifier la nature, la composition, voire la structure des molécules constituantes les mélanges. La littérature décrit de nombreuses méthodes qui servent à purifier les substances organiques.

Les méthodes classiques de séparation sont utilisées dans de nombreux laboratoires, cependant leur emploi diminue à cause de leur remplacement progressif par les méthodes instrumentales. Elles permettent de séparer en fraction homogènes, solides ou liquides des entités qui sont encore des mélanges.

II. Distillation

II.1. Notions théoriques

✓ **Equilibre liquide vapeur**

Un corps pur se présente dans un système fermé est en état d'équilibre si le même nombre de molécules /unité de temps quitte le liquide et y pénètre.

✓ **Notion de volatilité :** c'est l'aptitude d'un composé à s'évaporer

par apport à un autre composé, la volatilité relative (expression III.1) et la volatilité absolue (expression III.2) :

$$\alpha_{AB} = \frac{P_A^0}{P_B^0} = \frac{pression\ partielle\ du\ composé\ 1\ à\ l'état\ pur}{pression\ partielle\ du\ composé\ 2\ à\ l'état\ pur} \quad \text{(III.1)}$$

$$V_A = \frac{y_A}{x_A} \quad \text{(III.2)}$$

✓ **Pression de vapeur :** c'est la pression appliquée par les molécules du gaz trouvant au-dessus du liquide sur l'environnement. Elle est notée (P_0)

✓ **Loi de ClasiusClapyron** : valable dans les cas suivants :

- Enthalpie de vaporisation est indépendante de la température ;
- Faible pression ;
- Mélange de vapeur comme un parfait ;
- Inertie chimique.

✓ **Chaleur de vaporisation** : c'est l'énergie calorifique nécessaire pour surmonter les forces d'attraction entre les molécules pour passer de la phase liquide à la phase vapeur.

✓ **Equilibre liquide vapeur d'un mélange binaire**

Pour un mélange binaire idéal trouvant dans une système fermé (Figure 16), pour la phase vapeur, la loi des gaz parfaits et la loi de Dalton (expression III.3) sont applicable, tandis que pour la solution la loi de Raoult (expression III.4) est applicable à température constante :

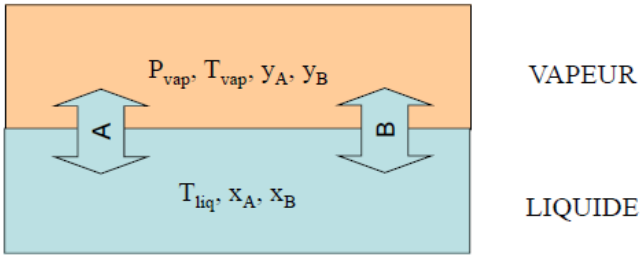


Figure 16. Mélange binaire parfaits dans un système fermé.

$$P_{totale} = \sum \bar{P}_i \quad et \quad \bar{P}_i = y_i \,.\, P_{totale} \qquad \text{(III.3)}$$

$$\bar{P}_i = x_i \,.\, P_i^0 \qquad \text{(III.4)}$$

Avec :

$\bar{P}_i$: pression partielle du composé dans le mélange

P_{totale} : pression totale de mélange

x_i : Fraction molaire du composé i dans le mélange liquidey_i : Fraction molaire du composé i dans le mélange vapeur

✓ **Diagramme d'équilibre**

Un mélange binaire parfaitement miscible est porté à ébullition, cette ébullition se fait à température variable et elle est délimitée par : $T_{ébullition}$et T_r comprises entre T_A^0 et T_B^0. Le diagramme d'équilibre le plus utilisé est le diagramme isobare : T = f (x_A, x_B), où B est le composé le plus volatil.

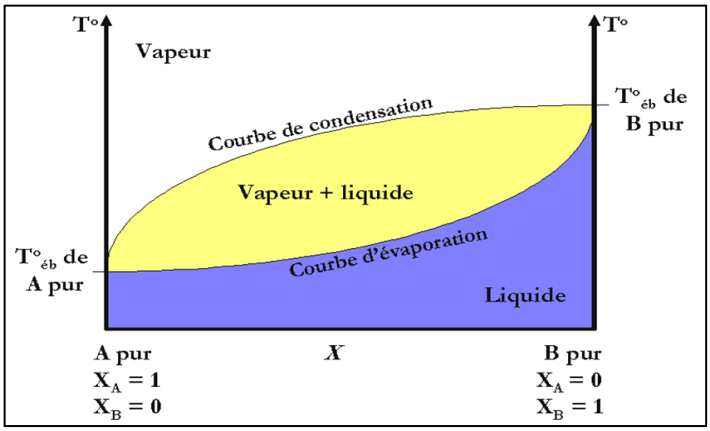


Figure 17. Diagramme d'équilibre liquide-vapeur d'un mélange binaire

II.2. Définition

C'est une opération de séparation qui consiste en la formation d'une phase vapeur à partir d'une phase liquide de composition différente. Dont le principe est basé sur la différence de volatilité entre les constituants du mélange.

II.3. Distillation simple (DS), elle est basée sur l'évaporation suivie d'une condensation, la DS se fait à pression constante, (normale ou réduite). Ainsi la DS concerne les composés de $T_{ébullition}$ de différence de 60°C et plus.

✓ **Montage de la distillation simple**

Le dispositif de la distillation est composé de, (Figure 18) :

- Dispositif de chauffage ;
- Bouilleur ;
- Réfrigérant.

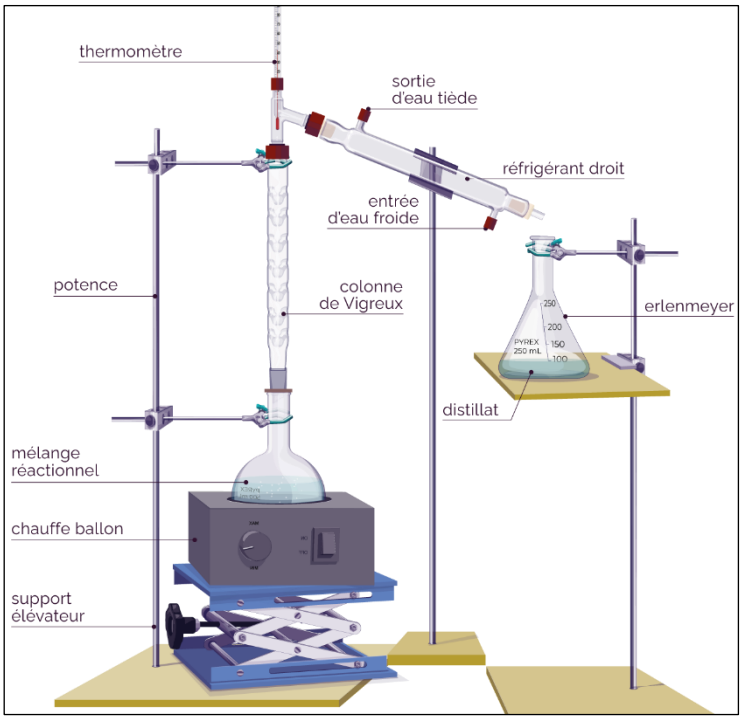


Figure 18. Montage de la distillation simple

✓ **Bilan de la distillation :** il exprimé en terme de bilan global (III.5) et partiel (III.6)par apport aux solvants de la distillation, il donné par les expressions.

La figure 19, illustre le bilan de matière au cours d'une distillation simple.

$$I = L+V \qquad \text{(III.5)}$$

$$I.z_A = x_A.L + y_A.V \qquad \text{(III.6)}$$

Avec :

I : Débit massique d'alimentation du mélange : A et B, (unité de masse /unité de temps)

L : Débit massique de la phase liquide, (unité de masse /unité de temps)

V : Débit massique de la phase vapeur, (unité de masse /unité de temps)

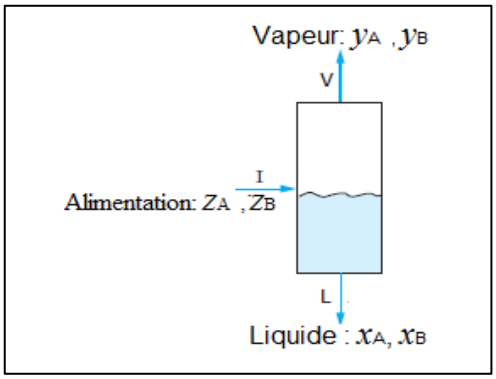


Figure 19. Bilan macroscopique de matière d'une distillation simple en continue

RMQ : la DS :

- C'est une séparation mono-étagée ;
- Elle est appliquée soit pour la séparation seule ou pour la séparation et la purification.

II.4. Rectification

✓ **Définition** : Appelée aussi la distillation fractionnée, est un procédé de séparation par fractionnement. Son but est de séparer les différents constituants d'un mélange de liquides miscibles, possédant des températures d'ébullition différentes. Pour cela, elle exploite le même principe que la distillation classique mais se distingue par l'utilisation d'une colonne de séparation, qui permet une meilleure discrimination des constituants du mélange.

✓ **Appereillage** : L'appareillage de rectification discontinue se compose des éléments suivants, (Figure 20) :

- Un bouilleur : c'est un réservoir chargé au départ du mélange à distiller
- Un dispositif de chauffage du bouilleur
- Une colonne de rectification
- Un condenseur

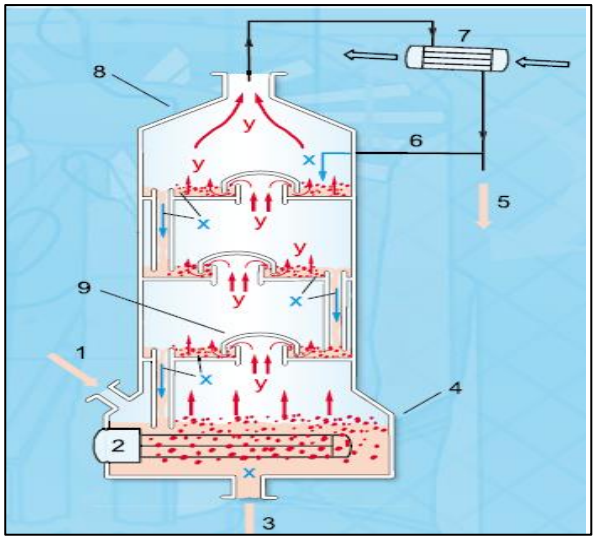


Figure 20. Représentation simplifiée d'une colonne de rectification
1 : Alimentation, **2** : Chauffage, **3** : Raffinat liquide chargé en composés le moins volatil, **4** : Bas de colonne, 5 : Distillat, **6** : reflux, **7** : Condensateur, **8** : vapeur enrichie en composé le plus volatile, **9** : plateau d'échange.

Au niveau de chaque plateau (étage), il s'effectue un échange de matière entre la vapeur et le liquide d'une part et d'autre part il s'établi un équilibre liquide-vapeur, tout au long de la colonne, il y a enrichissement en composé le plus volatil vers la tête (y↑) et son appauvrissement dans le liquide descendant (x↓).

✓ **Avantages de la rectification**

- Séparation des solvants ayant des $T_{ébullition}$ proches ou différentes ;
- Séparation des isotopes ;
- Séparation des solvants à tout degré de miscibilité ;
- Fractionnement et purification des mélanges homogènes.

III. Cristallisation

III.I. Généralités

✓ ***Définition*** : c'est une opération physico-chimique de séparation basée sur un changement d'état d'un constituant dissout à partir d'une solution en un solide de forme cristalline.

✓ ***Objectifs***

1- Elle destinée à isoler sous forme solide un produit fini ;

2- Elle intervient lors de la purification des composés intermédiaires

3- Elle est appliquée dans la production de cristaux de formes cristallines déterminées.

III.2. Théorie de cristallisation

La cristallisation est un processus gouverné par la cinétique de d'apparition et de croissance des cristaux, et ce temps dépend de la force motrice appelée sursaturation.

Les paramètres de base dans la cristallisation sont, (Figure 21) :

✓ ***La concentration*** : pour une température donnée, un solvant ne peut dissoudre qu'une quantité maximale de solide exprimée en masse ou en nombre de moles, cette quantité correspond à la concentration de saturation (Cs).

✓ ***La sursaturation :*** c'est une action physique ou chimique sur la solution pour que la concentration de soluté C(t) dépasse la concentration de sursaturation Cs(t), elle peut être

✓ Absolue ou relative : $\sigma = \frac{C - C_s}{C_s}$ Sursaturation relative

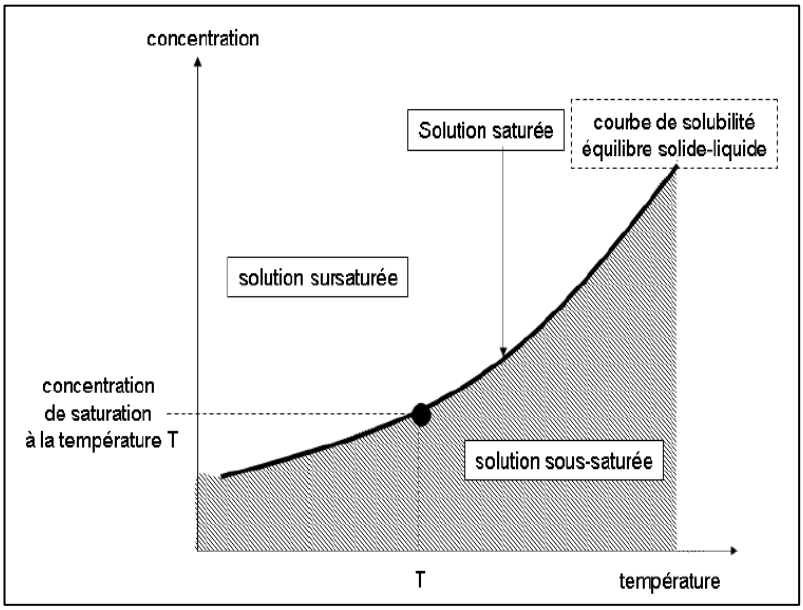


Figure 21. Diagramme : concentration-température pour un système soluté-solvant

III.3. Etapes de cristallisation

✓ ***Nucléation*** ou germination : représente l'apparition des cristaux (germes ou nuclei), elle prend naissance à partir d'un taux de sursaturation. Cette dernière doit être suffisamment élevée et peut être causée par chocs mécaniques ou agitation.

✓ ***la croissance*** : elle représente le transport des molécules du soluté vers les cristaux et de ce fait l'évolution de la taille du cristal.

RMQ : l'équation de transfert de matière décrit le transfert de la phase liquide vers la phase solide, elle est donnée par l'expression (III.7) :

$$\frac{dV_t(t)C(t)}{dt} + \frac{dV_T(t)Cs(t)}{dt} = 0 \qquad \text{(III.7)}$$

Avec :

C(t) : concentration du soluté.
Cs(t) : concentration de la phase solide.
V_T : volume total.
V_t : volume de la solution ou de la phase liquide

III.4. Modes de cristallisation

Le principe de la cristallisation est basé sur la diminution progressive de la solubilité du composé à cristalliser (soluté) dans le solvant, (Figure 22).

- ✓ ***Par refroidissement***, il est appliqué dans le cas où la concentration dépend fortement de la température, la sursaturation est dépassée par abaissement de température, (figure 23).
- ✓ ***Par évaporation*** : appliqué dans le cas où la concentration dépend faiblement de la température, le solvant est évaporé et la sursaturation est dépassée, ex : NaCl, sucre.
- ✓ ***Par relargage*** : la cristallisation est induite par addition d'un tiers corps ne provoquant une réaction chimique mais seulement une diminution importante de la solubilité, ex ajout de sels.
- ✓ ***par précipitation :*** la réaction chimique entre deux composés soluble produit un composé insoluble : cristallisât.

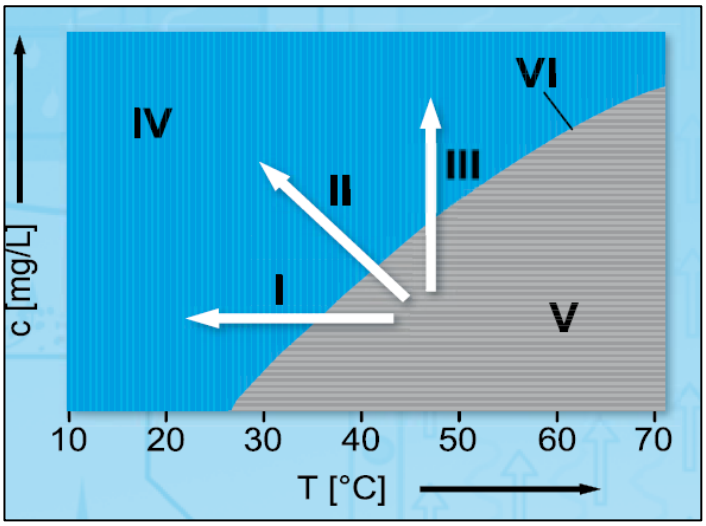


Figure 22. Représentation simplifiée des opérations de cristallisation dans le diagramme température-solubilité :

I : cristallisation par refroidissement, **II :** cristallisation sous vide, **III :** cristallisation par évaporation, **IV :** solution sursaturée, **V :** solution sous saturée, **VI :** courbe de solubilité

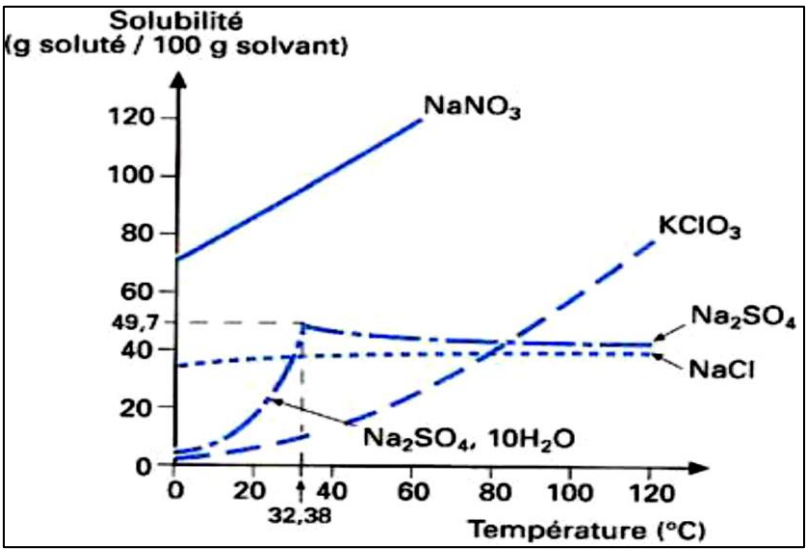


Figure 23. Courbes de solubilité de divers composés minéraux dans l'eau

III.5. Facteurs influençant la cristallisation

► Paramètres opératoires : température et agitation ;

► Présence d'impuretés agissent sur la nucléation et négativement sur la croissance ;

► Nature du solvant, la concentration du soluté, ainsi que la nature et la concentration des impuretés.

III.6. Applications

- *En industrie pharmaceutique,* avoir des solides cristallins de : forme, de taille et de surfaces bien déterminées ;
- *En industrie agroalimentaire* : production des sels et de sucre.

III.7. Recristallisation

C'est une méthode de purification d'un produit solide. Elle permet de le séparer de ses impuretés après une réaction ou une extraction.

Le Principe de la recristallisation repose sur la différence de solubilité d'un composé dans un solvant à chaud ou à froid. Le produit est récupéré par filtration.

IV. Centrifugation

La centrifugation est une opération de séparation mécanique, des composés d'un mélange en fonction de leur densité sous par action de force centrifuge entrainée dans un mouvement de rotation, de deux à trois phases entrainées dans un mouvement de rotation.

La centrifugation concerne la séparation de :

- Deux phases liquides
- Une phase solide en suspension dans une phase fluide.
- Deux phases liquides contenues dans une phase solide.

IV.1. Principe

La centrifugation permet de séparer des constituants de taille et de masse très différentes contenus dans un liquide. Les constituants contenus dans un échantillon sont soumis aux forces, (figure 24) :

- La gravité, (Fv) : C'est la force qui s'exerce du haut vers le bas.

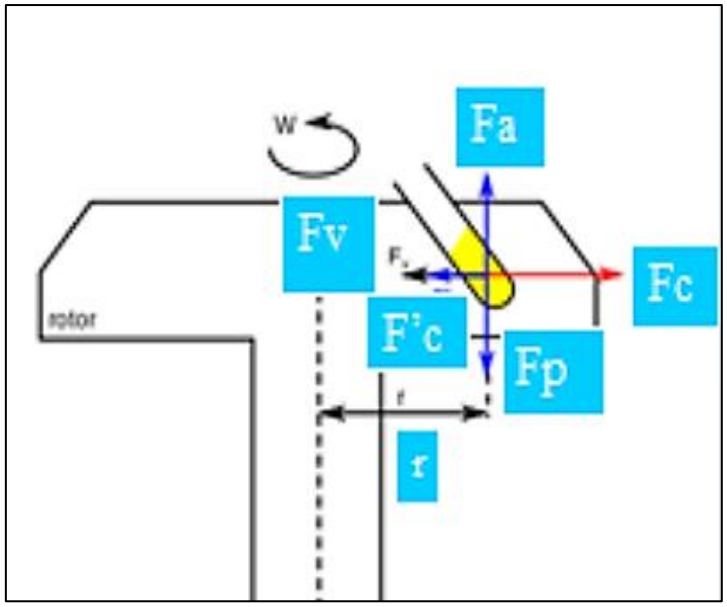


Figure 24. Schéma des différentes forces s'appliquant sur une particule à centrifuger

- La poussée d'Archimède, (Fa) : C'est la force qui s'exerce du bas vers le haut, elle est exprimée par la relation (III.7).

$$Fa = v_p.\rho_L.n^2.x \qquad (III.7)$$

- La force centrifuge, (Fc), elle est exprimée par la relation (III.8).

$$Fc = m.\gamma_r\ m.\omega^2.x = v_p.\rho_p.\ .n^2.x \qquad (III.8)$$

- La force de frottement, (Fv).
- La force centripède, (F'c).

Avec :

v_p : masse volumique de la particule

ρ_p : masse volumique du milieu

ρ_L : masse volumique du liquide

m : masse de la particule

n : vitesse angulaire de rotation, (tr/min)

r, *x* :distances de l'axe de rotation

La force résultante (F), entraine le développement de la particule dans un mouvement de rotation en s'écartant de l'axe de rotation, (expression (III.9)).

$$F= Fc-Fa = v_p.(\rho_p-\rho_L).\omega^2. x \quad \text{(III.9)}$$

IV.2. Important definitions

a. Relative centrifugal force

In general, applications for centrifugation specify the degree of acceleration to be applied to the sample rather than specifying a specific rotational speed such as revolutions per minute. The acceleration is typically given in gravity [× g] (or multiples of x g or g-force), the standard acceleration value due to gravity at the Earth's surface (9.81 m/s^2). The distinction between rpm and rcf is important, as two rotors with different diameters running at the same rotational speed (rpm) will result in different accelerations (rcf).

- ✓ ***Demonstration, (***Figure 25):

- ✓ ***Example :*** As mentioned, when using rotors with different radii for centrifugation, the same rcf (g-force) should be used**.**

	Rotor A	**Rotor B**
Speed	14,000 rpm	14,000 rpm
Radius	5.98 cm	9.50 cm
Gravity	13,100 × g	20,817 × g

La figure 26, représente le Nomographe de l'évaluation de l'intensité de la force centrifuge (g) en fonction de la vitesse de rotation du rotor.

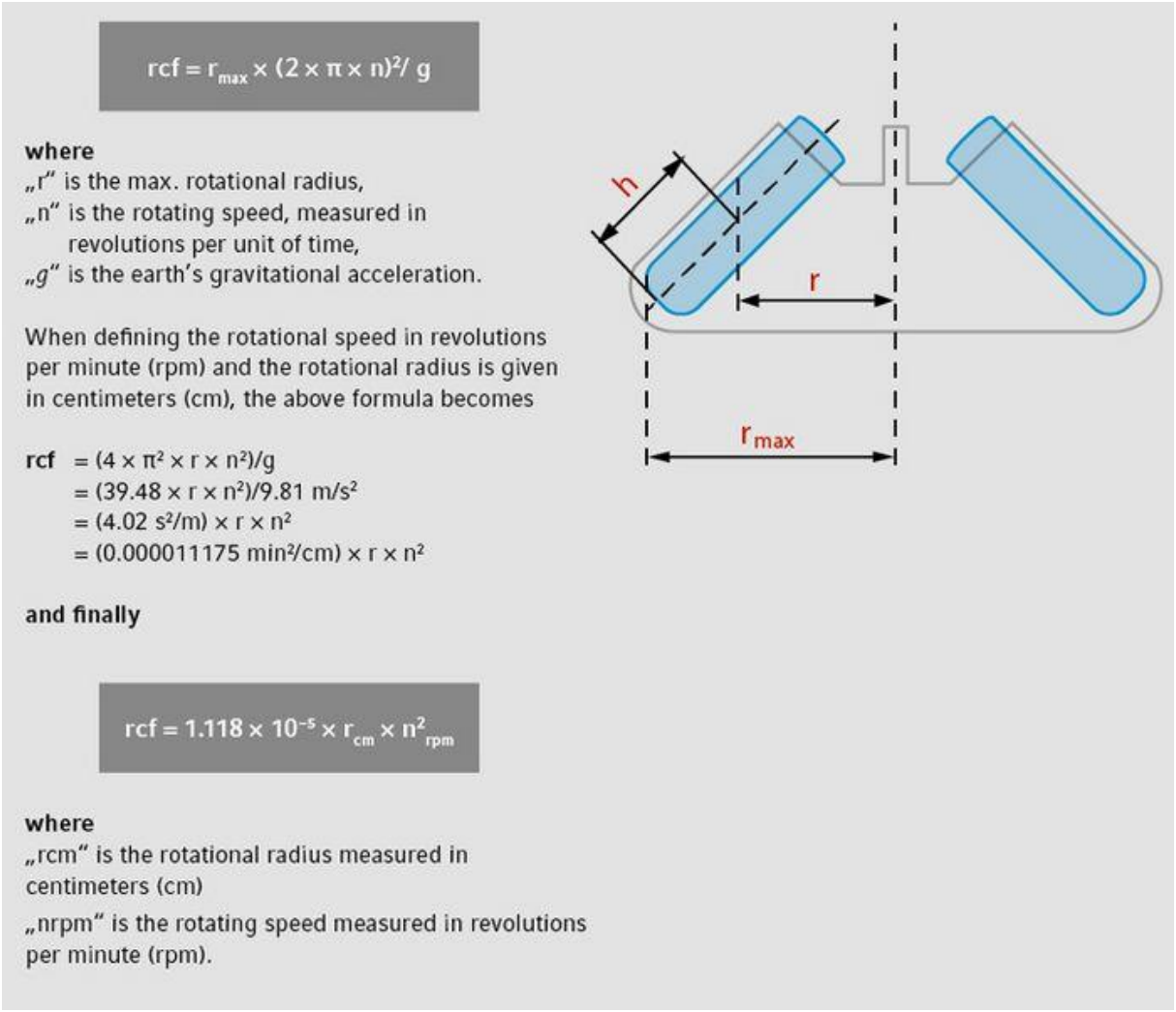


Figure 25. Schéma des différentes forces s'appliquant sur une particule à centrifuger

REMARK:

To use this Nomograph:

1. Get centrifugal force (RCF) with line connection between rotation radius (cm) and speed (rpm).
2. Get speed (rpm) with line connection between rotation radius (cm) and centrifugal force (RCF).

Calculating Centrifugal Force:

$$RCF = 11.18 * (N / 1000)^2 * x \qquad \text{(III.9)}$$

RCF: Centrifugal Force (*g)

R: Rotation Radius (cm)

n: Speed (rpm).

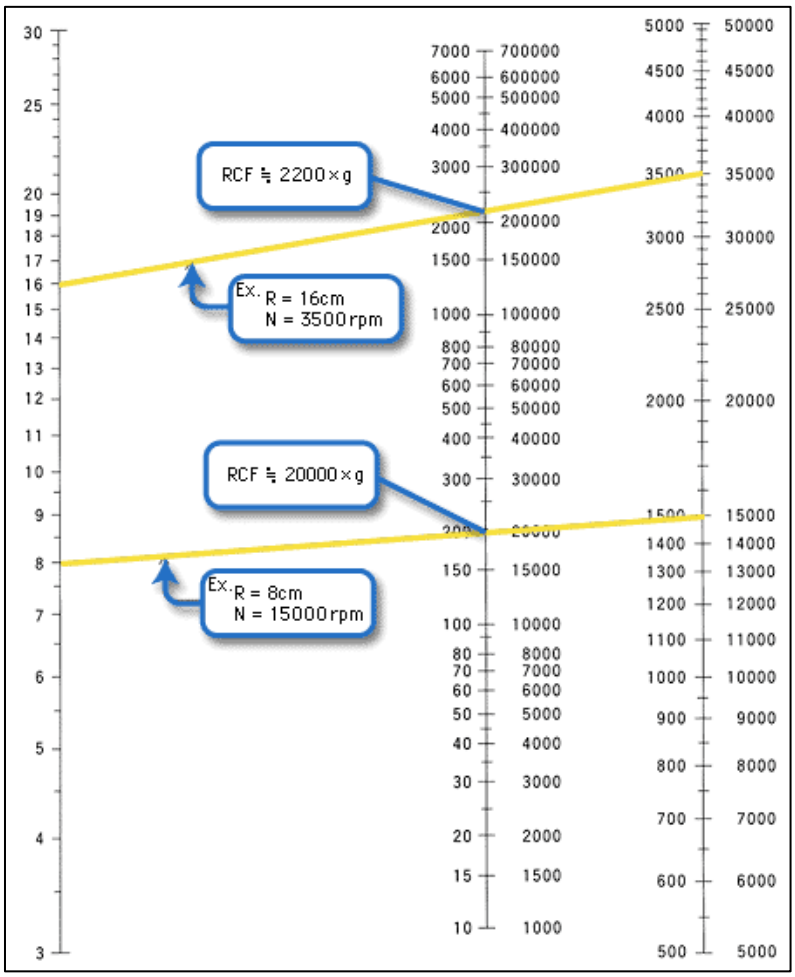


Figure 26. Nomographe de calcul de RCF.

b. Taux ou coefficient de sédimentation

Exprimé en **Svedberg**, de symbole **S**, c'est le rapport entre la vitesse terminale de sédimentation de la particule (en m/s) et l'accélération appliquée (en m/s²). Un svedberg vaut exactement 10^{-13} s.

- Pour une particule donnée, la une vitesse de sédimentation est spécifique lors d'une centrifugation, elle est fonction de masse, de densité et de morphologie.
- Plus une particule est lourde ou dense ou générant une faible friction), plus son S est important.

IV.3. Types de centrifugation

a. Centrifugation différentielle

La séparation s'effectue selon la taille des particules, pour des particules de même masse ayant des densités différentes, les plus rapides à sédimenter sont celles possédant des densités élevées. Durant la centrifugation, les grosses particules sédimentent plus vite que les petites. Un homogénat peut être centrifugé plusieurs fois en augmentant progressivement la FCR et le temps afin d'obtenir des culots de différents organites.

Cette méthode est utilisée pour culoter des cellules, des bactéries et obtenir des préparations partiellement pures d'organites et de macromolécules. (Figure 27).

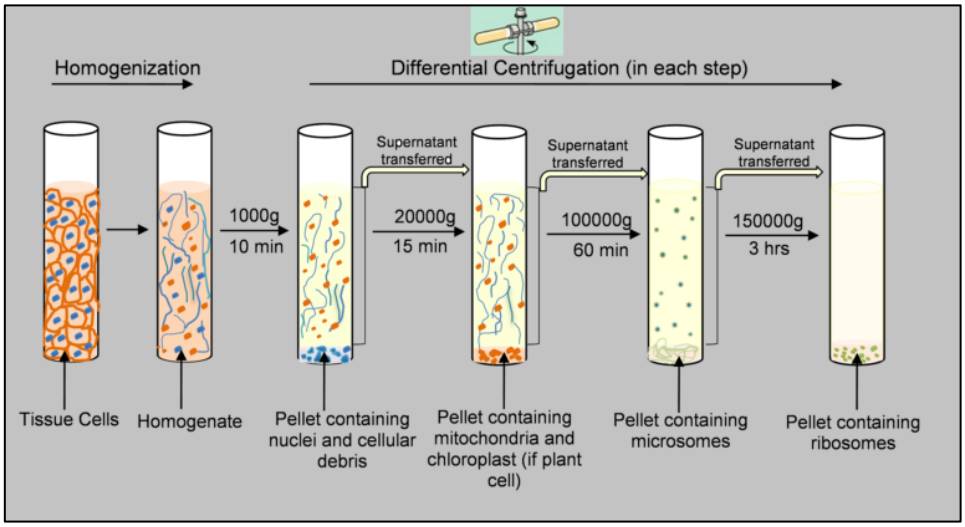


Figure 27. Isolement des organites

b. *Centrifugation* sur gradient de densité

Les particules sédimentent au sein d'un gradient de densité, en utilisant un gradient de densité via un solvant approprié, où les particules stabilisent lorsque leurs densités égalent à la densité de la zone appropriée du solvant.

Le gradient de densité est assuré par la création d'un gradient de densité : Si le milieu contenu dans le tube est constitué par des couches superposées de densités croissantes, on parle de gradient de densité discontinu. Si la densité du milieu croît de façon continue, on a un gradient continu de densité, (figure 28).

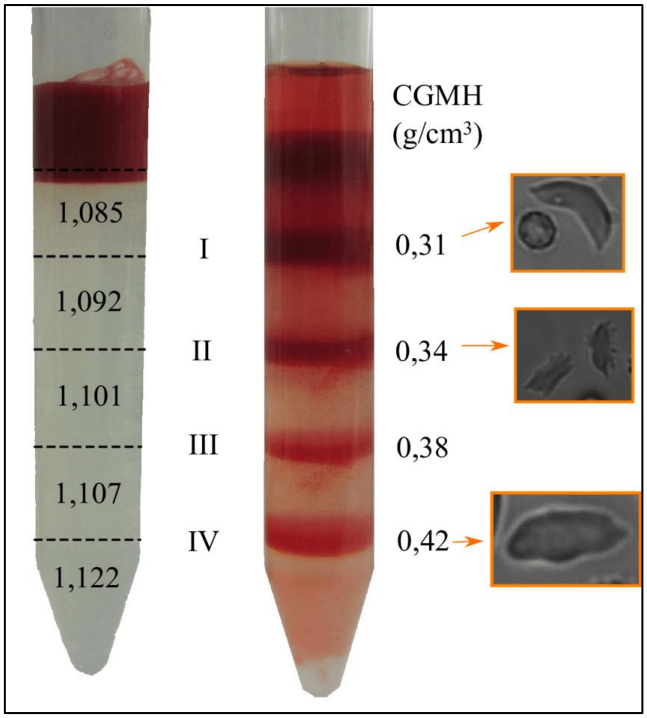


Figure 28. Centrifugation à gradient de densité

IV.4. Appareillage : centrifugeuse

a. Centrifugeuse de paillasse

Appelées aussi centrifugeuses cliniques, elles atteignent des accélérateurs allant 1000 à 3000 g. Elles nécessitent ou non la réfrigération. La figure 29, représente une centrifugeuse de paillasse.



Figure 29. Centrifugeuse de paillasse.

b. Centrifugeuse de sols

Elles permettent d'obtenir des accélérations de 20 000 g (vitesses de rotation de l'ordre de 30 000 tr/min), ces modèles sont réfrigérés. Ces appareils permettent de centrifuger des volumes relativement élevés.

c. Ultracentrifugeuse

Elles permettent d'atteindre des accélérateurs plus élevés jusqu'à 300 000 g, par rotation des rotors rapidement (50 000 – 85000 tr/min), avec utilisation de la réfrigération et des pressions très réduite afin d'éviter le chauffage du rotor et de l'échantillon. Dans ces appareils les volumes à centrifuger sont peu limités.

d. Microcentrifugeuse

Elles sont conçues pour centrifuger les micro-volumes à application en biochimie moderne, où les tubes utilisés sont de forme conique en polypropylène ayant un volume de 1.5 ml. Cette classe d'appareils peuvent ne pas être réfrigérés en atteignant des accélérateurs d'environ : 12000-15 000 g.

e. Ultra-centrifugeuse analytiques

Réservées à l'analyse des tailles et de masses des particules dispersées et des protéines, elles sont utilisées particulièrement en biochimie, biologie et en chimie des colloïdes.

Chapitre IV.a : Notions fondamentales de la Chromatographie

I. Introduction

La chromatographie, procédé de séparation des constituants d'un mélange, est une méthode analytique utilisée pour identifier et quantifier les composants d'une phase liquide ou gazeuse homogène.

II. Principe

Le principe repose sur les équilibres de concentration des composés présents entre deux phases non miscibles en contact, (Figure 30) :

• ***Phase stationnaire,*** elle est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support.

• ***Phase mobile,*** elle se déplace au contact de la phase stationnaire.

A phase mobile $\rightleftharpoons$ **A phase stationnaire**

$$K = C_S/C_M \qquad (IV.1)$$

Avec :

K: Coefficient de distribution

C_S: Concentration de l'analyte A dans la phase stationnaire

C_M: Concentration de l'analyte A dans la phase mobile.

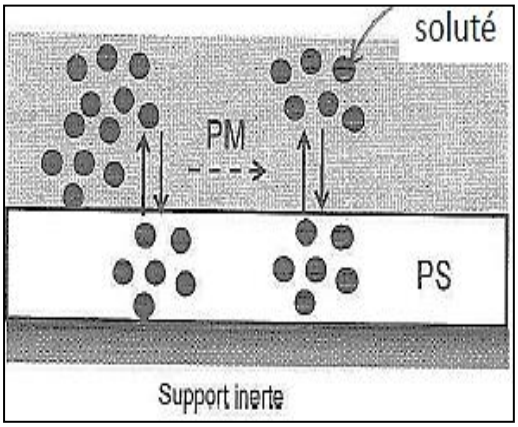


Figure 30. Principe de séparation chromatographique

La séparation est basée sur l'entraînement différentiel des constituants du mélange. Ces derniers parcourent la phase stationnaire avec des temps proportionnels à leurs propriétés intrinsèques (taille, structure, poids moléculaire) ou à leur affinité avec la phase stationnaire (polarité, ...).

III. Classification

Sous le nom de chromatographie, on regroupe un très grand nombre de techniques différentes qui, peuvent se classer en 3 catégories selon :

III.1. Nature physique des phases (mobile ou stationnaire).

Phase stationnaire :(phase fixe), peut-être :

- *Solide,* elle peut être employée comme remplissage d'une colonne (chromatographie par gravité et chromatographie à haute performance ou HPLC) ou étalés en couche mince sur une plaque de verre, d'aluminium ou sur une feuille de matière plastique (chromatographie sur couche mince CCM)
- *Liquide,* imprégnant un support solide ou encore par une chaîne carbonée fixée sur un support (phase greffée) permettent la séparation des composants des mélanges grâce à leurs propriétés adsorbantes.

Phase mobile : phase qui se déplace sur ou à travers la phase stationnaire, entraînant avec elle l'analyte. Elle peut être : soit un gaz où la phase mobile est appelée gaz vecteur ou gaz porteur. Ou un liquide : elle est appelée aussi éluant.

III.2. Nature des phénomènes (type d'équilibre)

Les phénomènes qui donnent lieu à la séparation dépendent de la nature des phases stationnaires. On distingue cinq types de phénomènes :

•Adsorption

•Partage

•Ionique

•Exclusion

• Affinité

III.3. Selon les procédés utilisés

Conditionnement de la phase stationnaire :

• chromatographie sur colonne

• chromatographie sur papier

• chromatographie sur couche mince.

IV. Terminologie

Élution : percolation d'un composé sur une colonne
Éluant : solvant permettant d'éluer le composé
Éluât : solution recueillie au bas de la
Chromatogramme : enregistrement des pics élués perçus par un détecteur

V. Caractéristiques d'un chromatogramme

Le chromatogramme est un diagramme à deux dimensions présentées sur un écran ou sur papier, (Figure 31). Il montre l'évolution d'un paramètre qui dépend de la concentration instantanée du soluté en sortie de colonne en fonction du temps. Les différentes grandeurs caractéritiques d'un pic chromatographiques ainsi que les caractéristiques d'un pic gaussien sont détallées sur les figures 32 et 33.

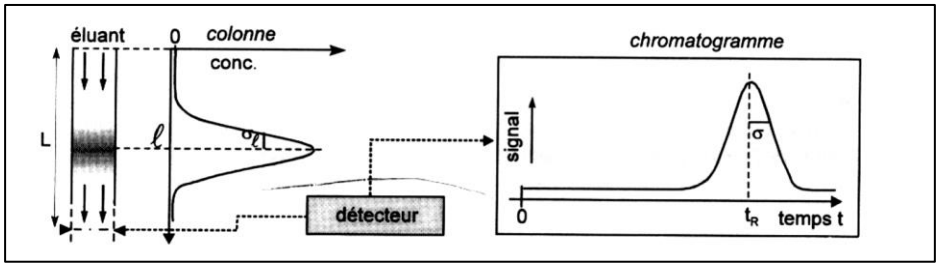


Figure 31. Notion d'un pic chromatographique

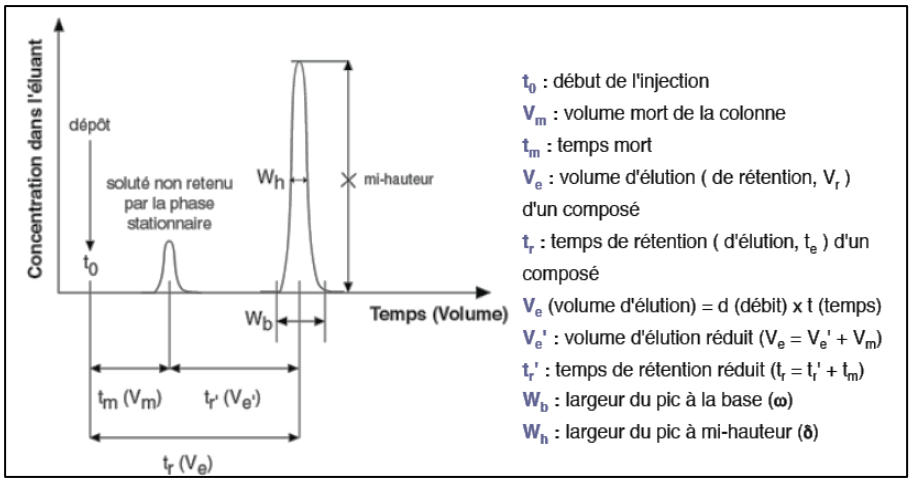


Figure 32. Grandeurs caractéristiques d'un pic chromatographique

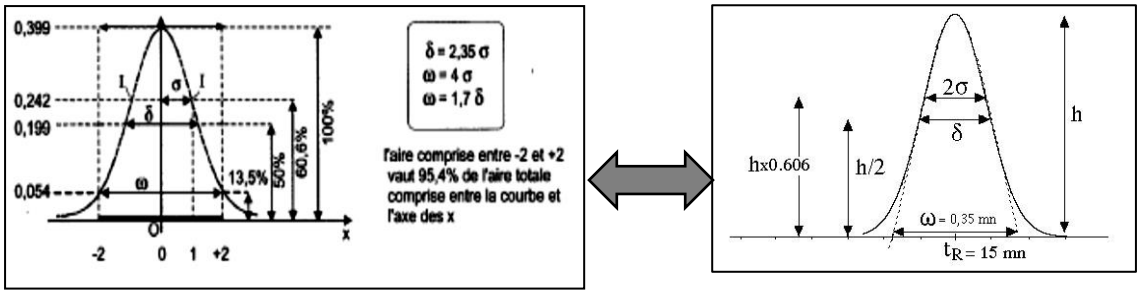


Figure 33. Caractéristiques d'un pic chromatographique

Le pic chromatographique est caractérisé par plusieurs dimensions :

- **δ** : Largeur à mi-hauteur (mesurée à 50% de la hauteur totale).
- **ω :** Largeur de la base du pic mesurée à 13,5% de la hauteur totale, ou par les tangentes aux points d'inflexion. Le pic étant gaussien on a ω=4σ.
- **σ :** Variance du pic
- **Air de pic** : surface comprise entre le pic et la ligne de base. Elle est proportionnelle à la quantité de soluté.
- ***Hauteur du pic (h*) :** utilisée lors des analyses quantitatives.
- **Temps de rétention** : un constituant est caractérisé par son temps de rétention t_R, temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui déterminé au maximum du pic lui correspondant sur le chromatogramme.

Le temps de rétention est indépendant de la quantité injectée, de la nature et de l'abondance des autres constituants dans le mélange.

Par contre il dépend de :

• La masse de phase stationnaire dans la colonne,

• Débit de la phase mobile,

• Volume mort du chromatographe (injecteur, détecteur, canalisations ..),

• La nature de la phase stationnaire.

- **Temps mort (t_M)** : Un constituant non retenu sort de la colonne au temps t_M, appelé temps mort.
- **Volume mort (V_M)** : Volume de la PM dans la colonne, il correspond au volume interstitiel accessible. Il est calculé à partir du chromatogramme d'un soluté non retenu.

la relation entre le volume mort et le temps mort est donnée par l'expression (IV.2).

$$V_M = D.t_M \qquad \text{(IV.2)}$$

- **Temps de rétention corrigé ou réduit (t'_R)** : est obtenu par différence entre le temps de rétention réel et le temps mort. Il est lié uniquement au phénomène de rétention proprement dit. Le temps réduit d'un soluté est exprimé par la relation (IV.3).

$$t'_R = t_R - t_M \qquad \text{(IV.3)}$$

- **Volume de rétention (v_R)**: il représente le volume de la phase mobile nécessaire pour le faire migrer d'une extrémité à l'autre de la colonne. Ce volume correspond sur le chromatogramme au volume de la phase mobile qui s'est écoulé entre l'instant de l'injection et celui correspondant au maximum du pic.

La relation (IV.4), décrit le volume de rétention d'un soluté en fonction de la porosité de la PM.

$$V_R = t_R.D = t_R.u.s = t_R.u.s'.\varepsilon \qquad \text{(IV.4)}$$

Avec :

D : Débit volumique de la PM
u : vitesse linéaire de la PM,
s' : section de la colonne
ε : porosité de la PS, ($\varepsilon = V_M/V_T$).

- **Volume de la PS (Vs)**: il est calculé à partir du volume de la colonne vide et le volume de la PM.

VI. Calculs chromatographiques

VI.1. Facteur de rétention k' (capacité)

La masse totale introduite dans la colonne (m_T) se répartit en (m_M) dans la phase mobile et m_S dans la phase stationnaire. Ces quantités dépendent de m_T et de K, (relation (IV.5)). Leur rapport est fixe et est appelé facteur de rétention (ou facteur de capacité) k'.

$$k' = \frac{m_S}{m_M} = \frac{C_S V_S}{C_M V_M} = K \frac{V_S}{V_M} \qquad \text{(IV.5)}$$

Ou encore, le k' est exprimé par la relation (IV.6) :

$$k = \frac{t_r'}{t_m} = \frac{t_r - t_m}{t_m} \qquad \text{(IV.6)}$$

Le Coefficient « k' », n'est pas une constante, il dépend des conditions opératoires : température, composition la phase mobile (il est indépendant du débit et de la longueur de la colonne). C'est le paramètre le plus important en chromatographie pour définir le comportement d'une colonne.

- $k' \leq 1$: élution trop rapide
- $1 < k' \leq 5$: élution optimale
- $5 < k'$: élution trop lente.

VI.2. Facteur de sélectivité α ou facteur de séparation

Décrit l'aptitude d'un système chromatographique à séparer deux composés (position de deux pics adjacents 1 et 2 situés sur un chromatogramme, Figure 34). Il correspond au rapport des facteurs de rétention de la colonne pour les deux composés, relation (IV.7))

$$\alpha = \frac{t'_{R_2}}{t'_{R_1}} = \frac{k'_2}{k'_1} \qquad \text{(IV.7)}$$

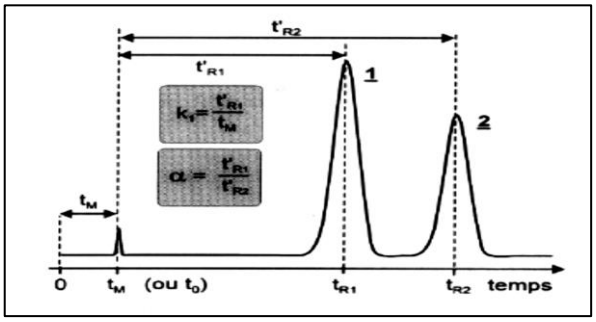


Figure 34. Rétention d'un soluté et séparation de deux solutés adjacents

α : *toujours supérieur à 1*. Le facteur de sélectivité de deux analytes permet d'estimer à quel point la colonne peut les séparer. Il définit si la séparation est chimiquement possible.

VI.3. Nombre de plateaux théoriques (efficacité théorique de colonne) :

La largeur du pic caractérise l'efficacité de séparation, c'est l'aptitude à donner des pics fins. Elle est mesurée par le nombre de plateaux théoriques. Comme indique la figure 6, les molécules "subissent" un grand nombre de transferts simultané de la PM vers la PS et l'inverse. On considère alors qu'une colonne de longueur utile L est composée de N_{th} petits disques fictifs superposés (plateaux théoriques) de même hauteur H, définie comme la Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique (HEPT), (Figure 35).

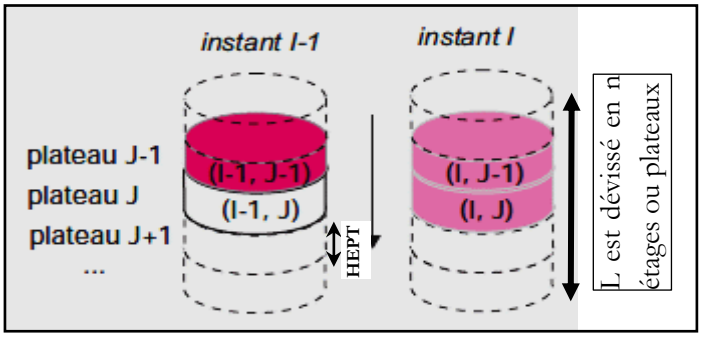


Figure 35. Modèle des plateaux en chromatographie

Les relations (IV.8) à (IV.11) décrivent la HEPT et l'éfficacité d'une colonne chromatographique.

$$\text{HEPT} = \frac{L}{N_{th}} \qquad \text{(IV.8)}$$

$$HEPT = \frac{L}{N_{th}} = \frac{\sigma^2}{L} \quad (IV.9)$$

$$\sigma = L.\omega / 4t_R \quad (IV.10)$$

$$HEPT = L\omega^2/16\ t_R^2 \quad (IV.11)$$

Avec :

L : longueur utile de la colonne

N : nombre de plateaux théoriques : 100 - 10^6

HEPT : hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) : 1 cm - 10 µm

Encore, nous avons la relation (IV.12) :

$$N_{th} = 16.\left(\frac{t_R}{w}\right)^2 = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 \quad (IV.12)$$

•Si N est grand ⇒ pics + étroits ⇒ efficacité ↑

•Efficacité N : rapport entre le temps de séjour du soluté dans la colonne et l'élargissement du pic (ou écart type σ)

• N peut être optimisé en jouant sur HEPT (diminution du ø des particules, optimisation du ø de la colonne, L, et u (Van Deemter)

VI.4. Nombre de plateaux effectifs (efficacité réelle)

Ce nombre est utilisé en HPLC, car il caractérise le temps réel passé dans la PS. Il est donné par la relation (IV.13):

$$N_{eff} = 16.\left(\frac{t'_R}{w}\right)^2 = \left(\frac{t'_r}{\sigma}\right)^2 \quad (IV.13)$$

VI.5. Résolution (Rs)

La résolution est une mesure de la qualité d'une séparation chromatographique. Celle-ci dépend à la fois de l'écartement relatif des sommets des pics (facteur thermodynamique exprimé en temps de rétention relatif) et de la finesse des pics (facteur cinétique exprimé en efficacité de colonne). Elle caractérise l'aptitude d'un système chromatographique (colonne, solutés, solvants) à séparer 2 solutés. Le but de la chromatographie est d'obtenir la meilleure résolution dans le temps le plus court.

Elle est donnée par les relations (IV.14) :

$$R_S=\frac{2[(t_R)_A-(t_R)_B]}{w_A+w_B} \qquad \text{(IV.14)}$$

Si $w_A = W_B \Rightarrow$ la résolution est donnée par la relation (IV.15) :

$$R_s = \frac{\sqrt{N_{th}}}{4}.\left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right).\left(\frac{k'_2}{1+k'_2}\right) \qquad \text{(IV.15)}$$

Encore en fonction de l'efficacité réelle, elle est exprimée par la relation (IV.16):

$$R = \frac{\sqrt{N_{eff}}}{4}.\left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right) \qquad \text{(IV.16)}$$

Avec k'$_2$ est le facteur de rétention de l'espèce la plus lente.

- Si R<1 : Mauvaise séparation
- 1≤R≤1.4 : Résolution acceptable
- 1.4<R≤1.6 Résolution optimale
- R >1.6 : Bonne résolution avec un temps d'analyse allongé.

35La résolution dépend donc des deux grandeurs : **(1)** la distance qui sépare les sommets des deux pics et **(2)** la largeur de chacun des pics, (Figure 36).

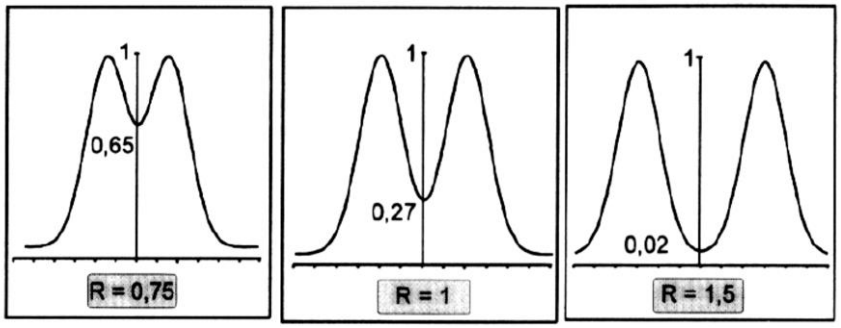


Figure 36. Influence de la R sur la séparation de deux pics adjacents d'intensités

Pour améliorer la résolution, il faut soit allonger la longueur de la colonne pour avoir un nombre de plateaux théoriques plus grand, soit changer les conditions opératoires de l'analyse (température, phase mobile…).

Tout en gardant k' entre 1 et 5, Il faut donc augmenter α par :

- Modification de la phase mobile (y compris des modifications de pH)

- Modification de la température (CG, CL [échange ionique])
- Modification de la composition de la phase stationnaire

VI.6. Modèle cinétique de la chromatographie

Ce modèle a été établi par Jan van Deemter où il a établi une relation entre la HEPT aux caractéristiques physiques de la PM et de la colonne. L'equation de van Deemter est donnée par l'expression (IV.17).

$$HEPT = A + \frac{B}{u} + C.u \qquad (IV.17)$$

Ce modèle a été issu de la mécanique des fluides, où les termes A, B et C signifient :

A : Terme de diffusion turbulente, B : Terme de diffusion longitudinale, C : Terme de transfert de masse.

La courbe de Van Deemter montre l'existence d'un débit optimal de la PM pour lequel l'efficiacité de la colonne est maximale (d'où HEPT minimal, Figure 37). L'utilité de cette courbe est importante en HPLC et en CPG.

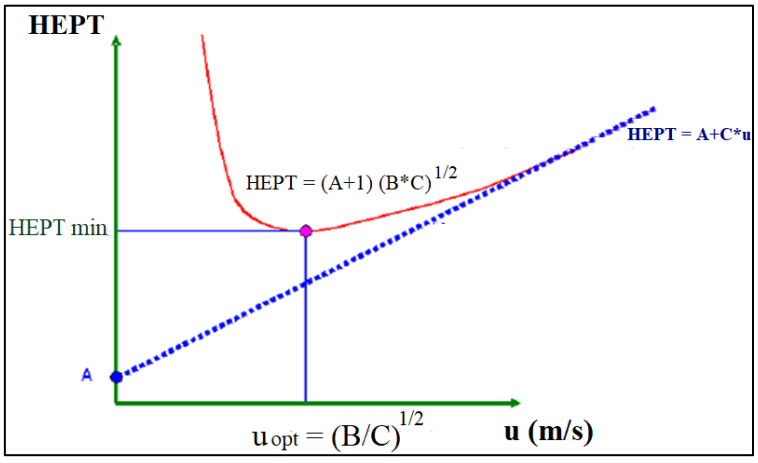


Figure 37. Courbe de Van Deemter

VII.Optimisation d'une analyse chromatographique

R_S (facteur de résolution) dépend de √ N, k et α, la *résolution* et le *temps d'élution* sont les deux variables dépendantes les plus importantes à considérer ; l'expression du temps de rétention du composé le plus retenu est donnée par la relation (IV.18) :

$$t_{R2} = \left(16 . \frac{R_S.H}{u}\right) . \left[\frac{\alpha}{\alpha-1}\right]^2 . \left[\frac{(1+k'_2)^3}{{k'_2}^2}\right] \qquad \text{(IV.18)}$$

R_S augmente avec k mais le temps aussi (compromis : 1<k<10). Pour augmenter k : baisser la T en CPG, modifier la composition de la phase mobile en CPL.

- Inutile d'optimiser N et k si α (facteur de séparation) = 1. Pour augmenter α tout en conservant 1<k<10 : programmation de T en CPG, modifier la composition de la phase mobile en CPL, modification de la phase stationnaire, ajouter une espèce chimique susceptible d'interagir avec certains constituants.

Le chromatographiste est prisonnier d'un triangle dont les sommets correspondent à la résolution (Figure 38), à la vitesse et à la capacité, trois paramètres qui s'opposent. Une chromatographie analytique optimisée utilise à plein le potentiel du paramètre le plus efficace : la sélectivité. Dans ce triangle elle se situe donc près du sommet *résolution*.

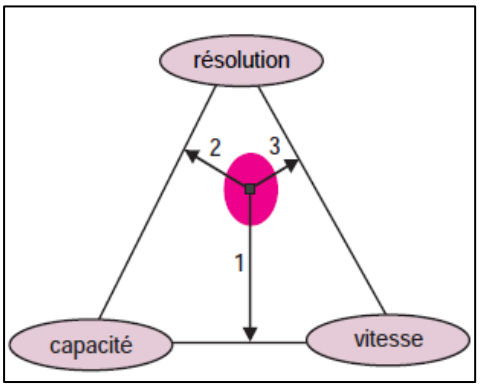


Figure 38. Optimisation d'une analyse chromatographique

VIII. Notion de pression (perte de pression ou perte de charge)

L'écoulement de la PM au voisinage de la paroi de la colonne et les particules de la PS génère des frottements (résistance à l'écoulement).

Le maintien du débit constant provoque une augmentation de la pression et une diminution de la granulométrie de la PS. Dans le cas où on travaille à haute pression (HPLC), la perte de pression (ou perte de charge) entre l'entrée et la sortie de la colonne est exprimée par la loi de Darcy, relation (IV.19) :

$$\Delta P = \frac{\phi.\eta.L.u}{d_p^2} \qquad \text{(IV.19)}$$

Avec :

ϕ : Facteur de résistance à l'écoulement, [1]

η : Viscosité (Pa.s)

L : Longueur de la colonne, (m)

u : Vitesse de la PM, (m/s)

dp : Diamètre moyen des particules de la PS, (m).

Chapitre IV.b : Chromatographie planaire

I. Introduction

La chromatographie planaire regroupe la chromatographie sur papier (CP), la chromatographie sur couche mince (CCM) et l'électrophorèse planaire. Il s'agit d'une technique de **chromatographie en phase liquide** où la phase stationnaire est positionnée sur un plan (plaque). La nature des phases mobile et stationnaire ainsi que la théorie sont les mêmes qu'en chromatographie sur colonne.

Les deux types (CP et la CCM), utilisent la même mise en réalisation et le même appareillage.

II. Chromatographie sur couche mince (CCM)

II.1. Objectifs

La CCM permet un contrôle facile et rapide d'une séparation. Elle est réalisée dans les buts suivants **:**

✓ **Analytique,** pour la séparation des constituants d'un mélange est alors la première étape pour déterminer la composition de ce mélange :

- Vérifier la pureté d'un produit : Si l'analyse, réalisée avec divers solvants et différents adsorbants, révèle la présence d'une seule substance.
- Suivre l'avancement d'une réaction : en indiquant le nombre de composants d'un mélange.
- Vérifier l'efficacité d'une extraction liquide-liquide.
- Déterminer l'éluant pour la chromatographie dans une colonne sur gel de silice.

✓ **Préparatif**

Purification de petites quantités de produit (jusqu'à ~100 mg sur une plaque de 20 cm* 20 cm). La bande qui contient le produit purifié est grattée, puis la silice est extraite avec un solvant.

II.2. Mécanisme

La CCM est basée principalement sur des phénomènes d'adsorption, la phase mobile, un mélange de solvants volatils, est ensuite entraînée à la surface de la plaque par capillarité dans une atmosphère saturée de solvant. Lorsque la plaque sur laquelle est déposé l'échantillon est placée dans la cuve chromatographique, l'éluant monte à travers la phase stationnaire (PS).

Mais, en fonction de sa densité, de sa solubilité dans la phase mobile et des forces électrostatiques retenant le composant sur la PS, chaque soluté de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse dans l'absorbant.

II.3. Constituants d'une CCM

Les principaux éléments d'une séparation chromatographique par CCM sont :

1) **Cuve ou cuvette chromatographique :** c'est un récipient généralement en verre de forme variable, il est fermé par un couvercle étanche. Le verre est utilisé car il n'est pas attaqué par les solvants de migration. Dans le cas de la chromatographie des pigments anthraquinoniques, une cuve en matière plastique transparente suffit, car les solvants utilisés ne sont pas corrosifs.

Pendant le développement du chromatogramme, la cuve doit être saturée en solvant et demeurée fermée et ne pas être déplacée.

2) **Support** : il s'agit des plaques en verre, des feuilles semi-rigides en plastique, ou en aluminium voire même sur une feuille de papier, recouverte d'une fine couche de phase stationnaire (gel de silice modifié ou non ou un autre adsorbant), (Figure 39).

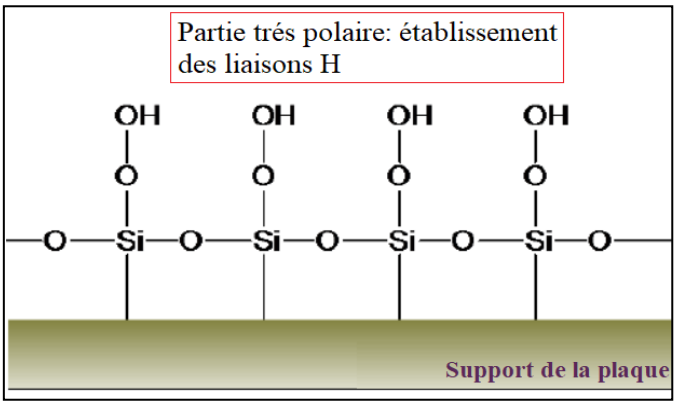


Figure 39. Support d'une plaque CCM avec une PS de gel de silice.

3) **Phase stationnaire :** Sous forme de granules équilibrés qui présentent une surface spécifique* importante et des groupements fonctionnels caractéristiques. Elle est préparée sous forme d'une fine couche d'épaisseur de (100 – 250 µm) et fixée à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté, l'amidon ou un polymère organique, sur un support plastique, métallique ou en verre. Un pigment fluorescent peut aussi être ajouté à la PS, qui permet une détection des composés par exposition à une lumière ultraviolette. Le mélange est déposé sur un support inerte, laissé sécher puis activé à chaud.

3.1) ***<u>Principaux adsorbants utilisés :</u>*** Il est possible de **classer les adsorbants** employés en chromatographie en fonction de leurs forces d'interactions avec les composés polaires, (Fiure 40) :

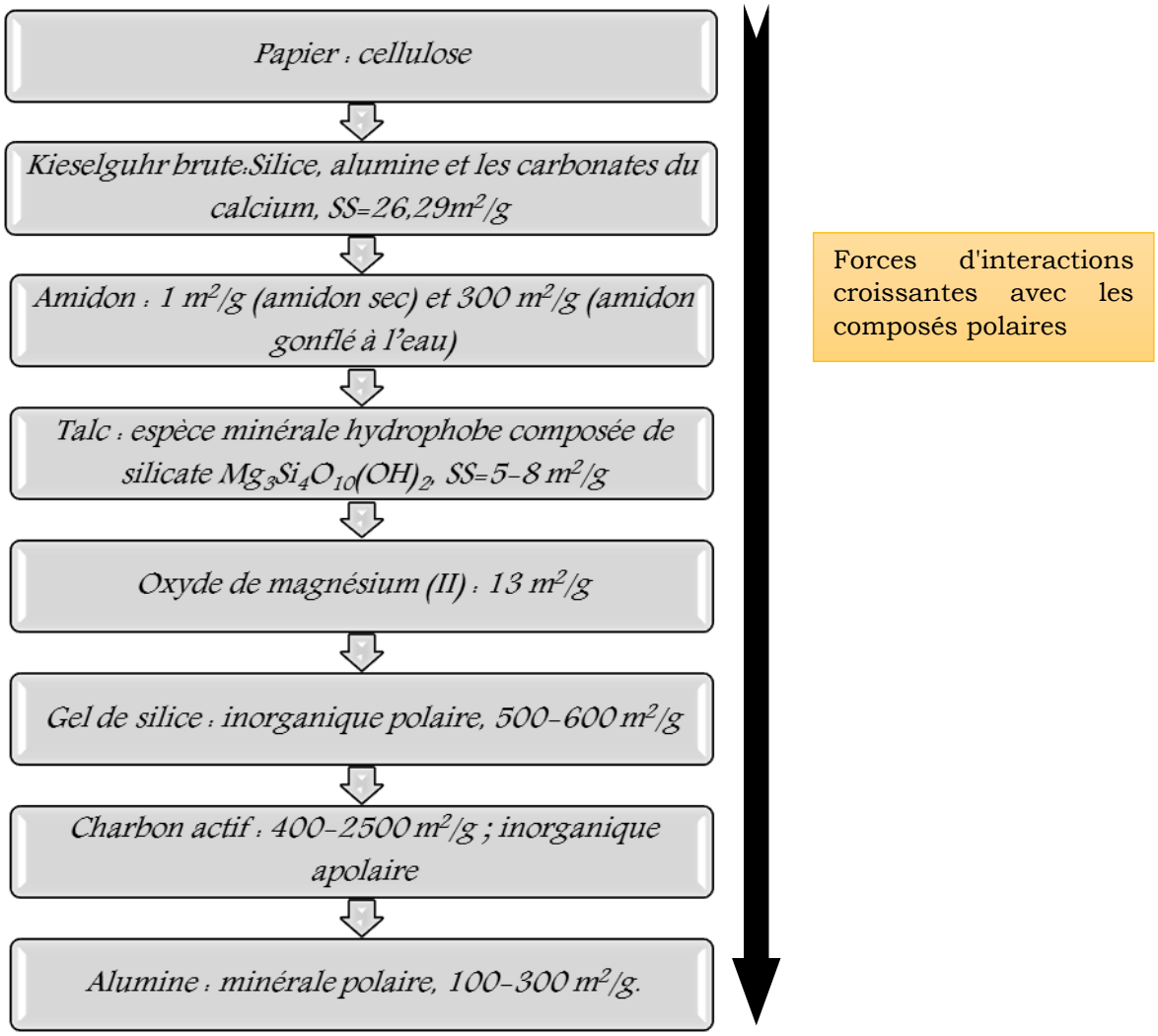


Figure 40. Ordre d'interaction des PS avec les composés polaires (chromatographie d'adsorption.

Le gel de silice et l'alumine sont les adsorbants les plus utilisés. En général, plus un adsorbant est actif, plus il retient fortement les composés polaires. Il est cependant possible de traiter un adsorbant pour modifier ses capacités d'adsorption et ses propriétés : Plus la teneur en eau d'un adsorbant est faible (ce qui a pour conséquence la présence d'un plus grand nombre de sites d'adsorption pour le soluté), plus il est polaire ou actif.

✓ **Gel de silice ($Si(OH)_4$),** Souvent désignée sous le terme de gel de silice, c'est une poudre blanche poreuse de très fines granulométries. Elle se présente sous forme des microsphères de diamètre constant pouvant varier de 2 à 5 µm (figure 41.a). La surface des microsphères de silicagel comporte des groupements silanol qui sont essentiels aux phénomènes d'adsorption en particulier parce qu'ils permettent la formation de liaisons hydrogène et sont responsables de la polarité et de l'acidité du gel de silice, (Figure 41.b).

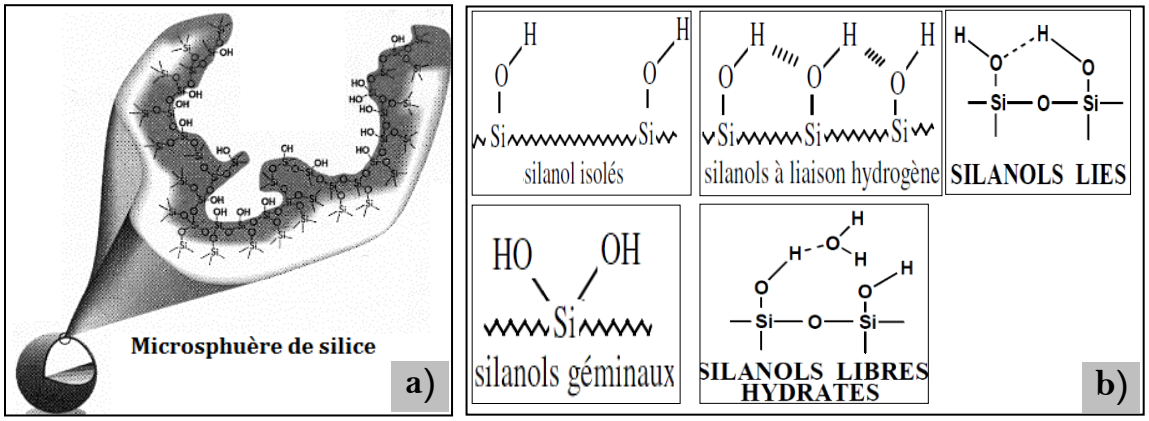


Figure 41. Morphologie d'un pore de grain de gel de silice : **a)**, surface d'un grain de gel de silice : **b)**.

✓ ***Alumine : (Al_2O_3) :*** poudre blanche solide poreuse de SS élevée (entre 100 jusqu'à plus de 300 m^2/g, Figure 42)), il convient bien pour la séparation de solutés acides (phénols, acides carboxyliques).

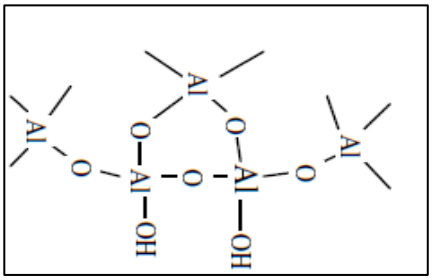


Figure 42. Surface d'un grain d'alumine

***3.2) <u>Sites d'interaction</u>* :** ils sont de trois type : les silanols libres et silanols libres faiblement hydratés et liés (LH). Selon l'état d'hydratation de la silice, les sites sont ± bloqués. Les interactions sont électrostatique de type dipole-dipole *(*Si-O-Si-O-H ….. X).

4) Echantillon (Analyte ou soluté) : il peut être polaire, apolaire ou sous forme d'ion, sa vitesse de migration dépend de polarité des phases. Il est mis en solution (2 à 5 %) dans un solvant volatile, qui n'est pas forcément le même que l'éluant : les plus utilisés sont le trichlorométhane (chloroforme), la propanone ou le dichlorométhane. La solution (1 cm^3 max.) est déposée sur la plaque, à environ 1 cm de la partie inférieure. **L**es molécules polaires sont toujours plus adsorbées que les molécules non polaires selon l'ordre suivant : **amides > amines > acides carboxyliques >alcools > cétones > esters > composés nitrés > éthers >hydrocarbures aromatiques > hydrocarbures non saturés > hydrocarbures saturés.**

5) Phase mobile (ou éluant) : un solvant pur ou un mélange, il migre lentement le long de la plaque en entrainant les composants de l'échantillon. Deux facteurs interviennent lors de l'interaction entre ; l'éluant et le soluté (mélange de composés à séparer):

- **Solubilité :** on doit être en mesure de dissoudre le soluté dans l'éluant pour que la migration se fasse.

– Force éluante (ε_0) : capacité d'un solvant à désorber les molécules d'analyte de la phase stationnaire. C'est une fonction de la polarité du solvant par rapport à la polarité de la PS.

• Les solvants sont classés par ordre de force éluante pour faciliter leur choix afin de contrôler le facteur de capacité (k') des analytes. Plus la force éluante est élevé, plus k' ↓.

• En chromatographie sur PS polaire :

– Force éluante augmente quand la polarité de l'éluant augmente.

• En chromatographie sur phase inverse :

– Force éluante augmente quand la polarité de l'éluant diminue.

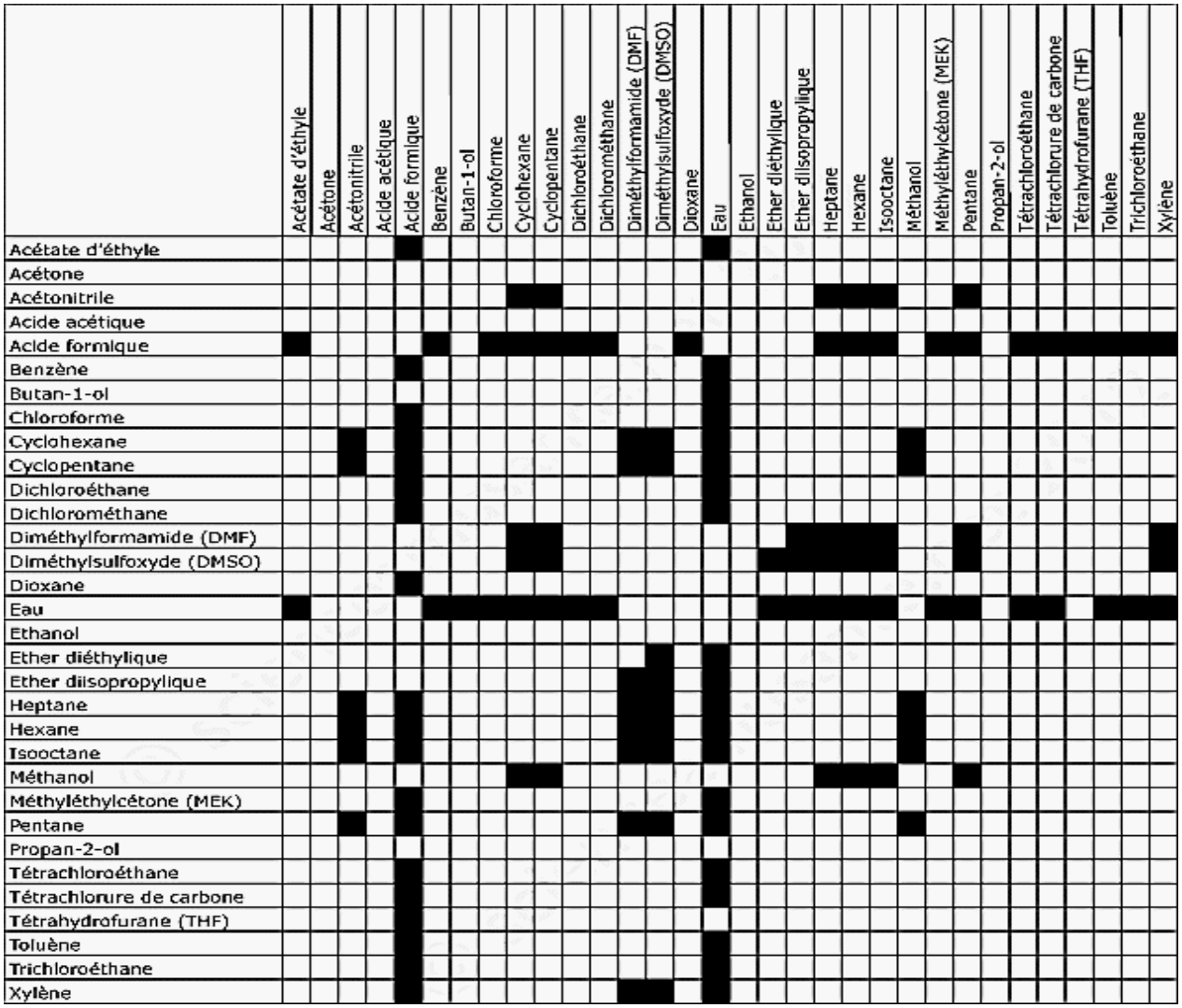
<u>RMQs</u> : **1**. L'élution est commencée avec des solvants peu polaires puis continue avec des solvants de polarité croissante.

2. Le mélange de solvants doit répondre aux critères : d'inertie chimique et de miscibilité.

Tableau 1 : Forces éluotropiques **(ε_0)** des solvants en chromatographie d'adsorption sur alumine (pour la silice on multiplie par 0.77).

Solvant	Force éluante(ε_0)	Solvant	Force éluante(ε_0)	Solvant	Force éluante(ε_0)
Hexane	0,01	Ether éthylique	0,36	Acétate d'éthyle	0,56
Cyclohexane	0,04	$CHCl_3$	0,4	THF	0,57
CCl_4	0,18	CH_3Cl	0,42	Acétonitrile	0,65
Ether isopropylique	0,28	Acétone	0,56	Pyridine	0,71
Toluène	0,29	Dioxane	0,56	Ethanol	0,66
Benzène	0,32	Butanol	0,56	Méthanol	0,95

Tableau 2 : Miscibilité des solvants.



II.4. Réalisation d'une CCM

La CCM se déroule en trois étapes : préparation de la cuve, préparation de la plaque, et élution et développement. La figure 43 résume les étapes de réalisation d'une chromatographie sur couche mince

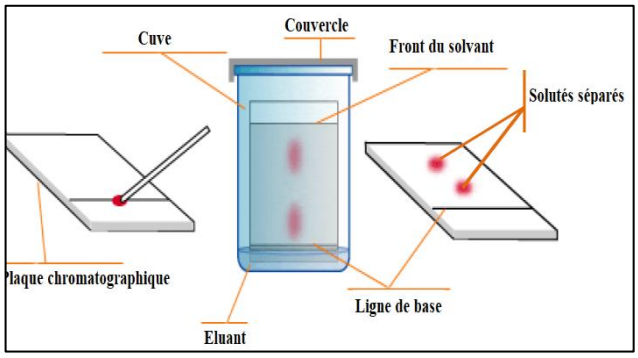


Figure 43. Etapes à suivre pour une CCM, cas d'un développement linéaire.

1) Préparation de la plaque : tracer un trait fin au crayon à papier, à 1cm d'un des bords et bien parallèle à celui-ci.

2) Préparation de la cuve *:* dans une cuve avec couvercle, introduire une petite quantité d'éluant (hauteur 0,5 cm) puis fermer le couvercle et attendre quelques minutes : cela permet de saturer l'atmosphère en vapeurs d'éluant, afin d'éviter que celui-ci ne s'évapore à partir de la plaque pendant l'élution.

3) Injection de l'échantillon sur la plaque : dépôt sur la ligne de base de la plaque une petite goutte du mélange à analyser ; il est possible de répéter le dépôt plusieurs fois afin d'augmenter la quantité d'espèces chimiques déposées sans élargir les taches. Il faut dans ce cas attendre que le solvant s'évapore entre chaque dépôt.

4) Elution et développement

4.1) Développement linéaire : placer la plaque dans l'éluant et refermer immédiatement le couvercle. L'éluant monte alors lentement, par capillarité. Attendre que l'éluant atteigne les 2/3 ou les 3/4 de la hauteur de la plaque, puis retirer cette dernière et marquer immédiatement, au crayon, la position du front de l'éluant (avant qu'il ne sèche). On peut alors sécher la plaque pour éviter tout étalement des taches.

4.2) Développement radial, (figure 44.a) : Les composés à séparer sont déposés près du centre ou à la circonférence d'un support circulaire et la migration est effectuée vers l'extrémité ou le centre du cercle, selon le cas.

RMQ *:* Il est possible de développer la plaque dans deux directions, orientées à angle droit (90°) l'une par rapport à l'autre (figure 44.b). L'échantillon à séparer est déposé au coin d'une plaque et le développement, est effectué dans un solvant approprié. La plaque est séchée, soumise à une rotation d'un quart de tour et développée à nouveau dans un second solvant de sélectivité différente au premier.

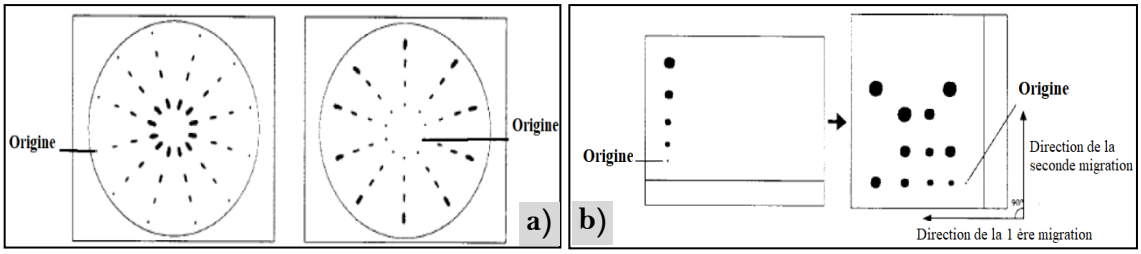


Figure 44. Développement radial : a), Développement bidimensionnel : b).

5) Révélation : Toutes les substances ayant une absorption dans la région au-dessus de 230 nm sont étudiées sur des supports additionnés de corps fluorescents par irradiation de lumière UV à ondes courtes.

Il existe pour les méthodes suivantes :

5.1) Révélation avec une lampe UV :

- Les dérivés aromatiques absorbent dans l'UV. Placer la plaque sous une lampe UV et entourer les taches colorées.
- Si la plaque est fluorescente, sous une lampe UV, toute la plaque apparaît verte sauf là où sont les taches que l'on entoure au crayon.

Comme agent fluorescent, le sulfure de zinc, il est additionné au gel de silice rend la plaque fluorescente lorsqu'on la place sous une lampe. Certaines plaques CCM contiennent un indicateur fluorescent permettant une résolution dans l'UV, UV proche (366nm) ou lointain (254nm). L'indicateur UV254 est un silicate de zinc activé au manganèse, dont le maximum

d'absorption est à 254nm. Il présente une fluorescence verte. L'indicateur UV366 est également un pigment minéral avec un maximum d'absorption à 366nm. Il présente une fluorescence bleue.

5.2) Révélation chimique :

6) Les avantages propres à la CCM

- ♦ Temps de développement courts (2 à 60 min)
- ♦ Distances de séparation petites ;
- ♦ Très bonne résolution ;
- ♦ Très haute sensibilité ;
- ♦ Très petites quantités d'échantillon utilisées.

II.5. Calculs chromatographiques

1) Rapport frontal : Le rapport frontal ou rétention frontale (R_f) est caractéristique d'un produit dans un éluant donné et pour une PS donnée, il est donnée par l'expression (IV.19).

$$R_f = \frac{Distance\ parcourue\ par\ le\ soluté\ (D_i)}{Distance\ parcourue\ par\ la\ PM\ (D_{PM})} \qquad \text{(IV.19)}$$

La valeur de Rf est donc comprise entre 0 et 1. Pour obtenir des Rf reproductibles, il est nécessaire d'opérer dans des conditions identiques.

***2)* Relation entre R_f et k' :** En CCM La phase stationnaire est immobilisée et la migration se fait par capillarité. La vitesse de migration de la PM est donnée par l'expression (IV.20) :

$$u_0 = \frac{d_{PM}}{t_M} \qquad \text{(IV.20)}$$

Et celle du soluté, expression (IV.21) :

$$u_i = \frac{d_{PM}}{t_R} \qquad \text{(IV.21)}$$

Et Rf sera exprimé en fonction des vitesses linéaires de soluté et de PM, (relation (IV.22)

$$R_f = \frac{u_i}{u_0} = \frac{t_R}{t_M} \qquad \text{(IV.22)}$$

et comme le tr est déjà donné par la relation (IV.23) :

$$t_R = t_M (1+k') \quad \text{(IV.23)}$$

Alors, le rapport frontal sera exprimé finalement par l'expression (IV.24) :

$$R_f = \frac{1}{1+k'} \quad \text{(IV.24)}$$

3) 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 de ((IV.25) à (IV.27):

$$N = 16 . \frac{d^2}{W^2} \quad \text{(IV.25)}$$

$$HEPT = \frac{d}{N} \quad \text{(IV.26)}$$

$$Rs = 2. \frac{d_1 - d_2}{W_1 + W_2} \quad \text{(IV.27)}$$

Avec :

d : Distance parcourue (cm)

W : diamètre du spot (cm).

II.6. Applications

Le succès de la CCM est dû principalement à la facilité de sa mise en œuvre et à la possibilité de son emploi dans le domaine analytique que dans le domaine préparatif (voir plus haut).

Il existe plusieurs applications de la CCM :

- ✓ Contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé organique
- ✓ Suivi de la réaction chimique
- ✓ Fractionnement chromatographique sur colonne et la recherche du meilleur solvant, avant d'entamer une séparation sur colonne classique.
- ✓ 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.

III. Chromatographie sur papier

Cette technique est similaire à celle de la CCM mais le principe repose sur des phénomènes de partage (ou partition) d'un soluté entre solvants que constituent respectivement par la PS et la PM non miscibles, il s'agit donc d'une CLL. Cette méthode est basée sur leur différence de solubilité d'un soluté entre deux phases

Le coefficient de distribution(K) est appelé coefficient de partage.

III.1. Constituants de la CP

1) Le support : Le support est une membrane de cellulose, celle-ci est introduite dans une cuve contenant la phase fixe (souvent aqueuse). La cellulose du papier très hydrophile se sature en eau, ce qui constitue la PS. Le papier filtre ordinaire peut être utilisé, mais il faut utiliser du papier conçu à cet usage (faible taux d'impuretés et les caractéristiques physiques sont uniformes).

Il existe huit catégories de papier Whatman, classés selon leur épaisseur, la texture de leur surface et la vitesse avec laquelle l'eau s'y diffuse. Par exemple, le papier Whatman n°1 est le plus utilisé, mais si on désire une grande vitesse d'écoulement, on emploiera le n°4 ; le papier n°20 est très lent, mais il permet une meilleure séparation, donnant les taches très denses et uniformes.

2) La PS : La phase stationnaire est constituée de l'eau elle-même, absorbée par la cellulose du papier ou liée chimiquement à elle. Sur la partie supérieure de la cuve, la phase mobile migre par capillarité, la séparation des solutés se fait par partage entre les deux solvants.

3) La PM : La phase mobile est le plus souvent un mélange de solvant organique et l'eau. Des solvants comme l'acide acétique, l'éthanol, le propanol, le phénol ou la pyridine sont les solvants les plus fréquemment utilisés en mélange avec de l'eau pour développer un chromatogramme.

4) L'échantillon : la CP est principalement utilisée pour séparer des substances très polaires tels les acides aminés, les sucres et les composés polyfonctionnels. Généralement, les composés les plus solubles dans l'eau ou ceux qui forment facilement des associations par liaisons hydrogène sont fortement retenus par la phase stationnaire et migrent donc lentement.

III.2. Réalisation d'une CP

Elle ressemble à la CCM, mais elle demande un certain temps (généralement plusieurs heures). Une fois l'opération terminée, le papier est retiré de la cuve et on laisse évaporer le solvant. Le chromatogramme obtenu est utilisé pour comparaison avec d'autres analyses effectuées sur des substances connues et prises dans des conditions identiques, pour identifier les substances de l'échantillon. Les substances peuvent être identifiées en calculant la valeur R_f qui peut être comparée à celles se trouvant dans les tables.

Il y a plusieurs méthodes de révélation :

1. les produits sont colorés, il n'y a rien de spécial à faire.
2. les produits sont fluorescents, on peut les identifier sous une lampe UV.
3. sinon, un révélateur qui réagira chimiquement avec les produits et dont le résultat sera coloré, est utilisé.

III.3. Inconvénients de la CP

Les plus grands inconvénients de la PM par rapport à la CCM sont :

- Une durée de développement beaucoup plus longue
- Une séparation généralement moins bonne.

Chapitre IV.c : Chromatographie liquide sur colonne conventionnelle

I. Introduction

La chromatographie sur colonne est l'un des procédés physico-chimiques de séparation, (au même titre que la distillation, la cristallisation ou l'extraction fractionnée, des constituants d'un mélange homogène liquide ou gazeux) les plus anciens parmi les autres techniques chromatographiques.

II. Principe

Il s'agit d'une méthode préparatrice (qualitative et quantitative) qui permet de séparer et d'isoler les constituants d'un mélange. Cette technique est fondée principalement sur des phénomènes d'adsorption, de partage, d'échange d'ions ou d'exclusion stérique et permet de séparer pratiquement tous les mélanges possibles. La phase stationnaire, sous forme de petites particules, remplit une colonne de longueur et de section déterminés. Le mélange, en solution 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 seul solvant dont sa polarité est modifiée de façon à accélérer le déplacement des constituants du mélange.

III. Quelques notions de base : Rappels (Voir chapitre IV.a)

- **Facteur de rétention k'**
- **Facteur de capacité (α)**
- **Efficacité d'une colonne : Nombre de plateaux théoriques (N et HEPT)**
- **Facteur de résolution (Rs)**

La résolution est la qualité de séparation de deux pics voisins. Pour traduire numériquement la plus ou moins bonne séparation entre deux composés, on utilise le facteur de résolution R qui est calculé à partir du chromatogramme, pour deux molécules (1) et (2).

IV. Constituants de la chromatographie liquide sur colonne, (figure 45)

La chromatographie sur colonne conventionnelle nécessite les constituants suivants :

- Colonne en verre ou en acier

- Phase stationnaire ou fixe
- Une phase mobile constituée d'un ou de plusieurs éluant
- Accessoires variés comme : collecteur, réservoir de PM, etc.

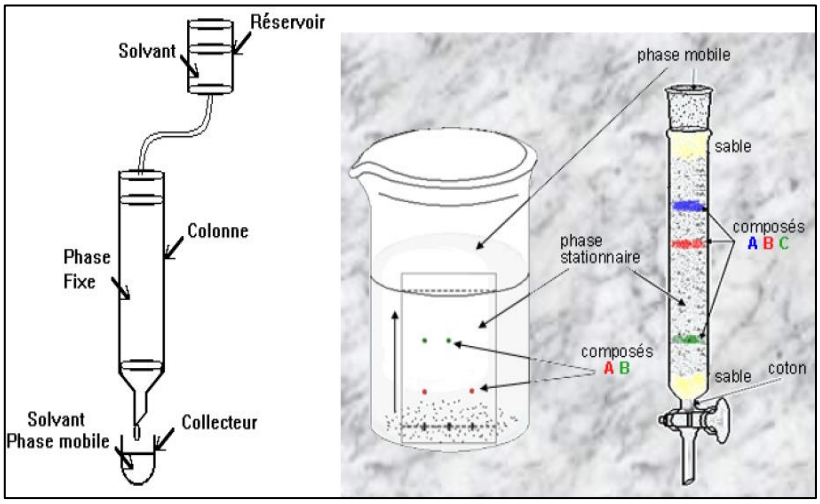


Figure 45. Description d'une chromatographie liquide sur colonne.

IV.1. La PS

Le type de la PS dépend du phénomène mis en jeu.

- **Cas de la chromatographie d'adsorption**, La plus utilisée est l'alumine ; cependant, on la limitera aux composés organiques stables car, sous sa forme basique, elle peut provoquer la déshydratation des esters par exemple. Le gel de silice est également fréquemment utilisé. En chromatographie sur colonne, la granulométrie de l'adsorbant doit être supérieure à celle des adsorbants utilisés en CCM. Leur taille est habituellement comprise entre 50 et 200 µm.

La quantité d'adsorbant dépend de la difficulté de la séparation et de la masse d'échantillon. On peut considérer que pour chaque gramme d'échantillon, il faut 30 à 50 g d'adsorbant si la polarité des composants à séparer est très différente et jusqu'à 200 g si la séparation est difficile.

- **Cas de chromatographie de partage**, deux cas présentent :

1) En phase normale, si la PS est très polaire (la PM est peu polaire), les substances sont alors éluées en sens inverse de leur polarité propre.

Afin de modifier la polarité de la PS, on utilise les principaux greffons : Il s'agit de greffons comportant des fonctions de nature polaire :

- Amine NH_2

- Nitrile : CN

- Diols : $CH_2 – CHOH – CH_2OH$

2) En phase inverse, si la PS est peu polaire ou apolaire (la PM est polaire), les substances sont alors éluées dans le sens de leur polarité propre. La réaction de réticulation est donnée par la réaction exprimée dans la figure 46)

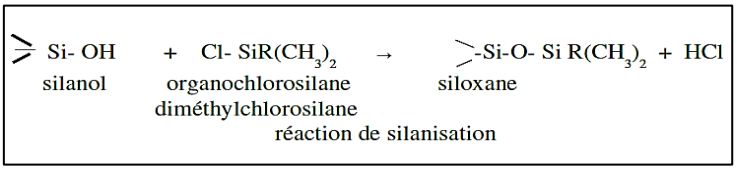
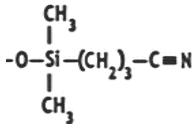
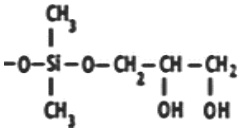
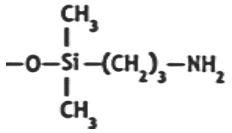
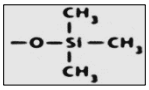
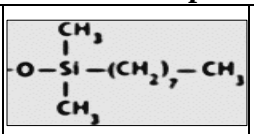
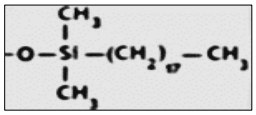
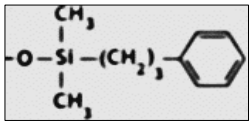


Figure 46. réaction de greffage (silanisation) du groupement silanol du gel

Les principaux greffons utilisés en phase inverse**,** Il s'agit de greffons comportant des fonctions de nature apolaire, tableau 3.

Tableau 3 : Greffons utilisés en CLL

Greffons de CLL en phase normale			
Structure			
Nom	Cyano3propyldiméthyl silane	Dihydroxy2,3propyloxy	Amino3propyldiméthyl silane
Greffons de CLL en phase inverse			
Structure	a) 		 
Nom	a)- triméthyl silane	Diméthylocty silane **(C8)**	Diméthyloctadécy l **(C18)**	Phényl 3 propyldiméthyl

La différence d'électronégativité entre C et H est faible. χ (C) =2,5 et χ (H)=2,2 :

Plus la chaine est longue, plus le soluté est retenu et plus $t_R \uparrow$.

C'est la nature apolaire de la phase stationnaire qui prime, la polarité de la phase mobile peut être quelconque on sera toujours en Phase Inverse.

IV.2. La PM

L'éluant (ou l'ensemble des éluants) doit être :

- Immiscible à la phase stationnaire.
- Pré-saturé avec la phase stationnaire avant de pénétrer dans la colonne.
- Compatible avec les détecteurs utilisés.

La polarité de la phase mobile a une grande influence sur le coefficient de partage des solutés. On obtient alors des temps de rétention convenables en ajoutant à un solvant donné, de petites quantités d'un modificateur polaire.

En CLL, la nature (composition) de la PM dépend de celle de la PS :

- *si la CLL* est en phase normale, La PM est un solvant apolaire, de nature lipophile : hexane, heptane, isoctane avec ou sans modificateurs de polarité (peu ou polaire): chloroforme, THF, éthanol, $CHCl_3$, l'éther propylique (isopropylique) ($(CH_3)_2CHOCH(CH_3)_2$).

- *si la CLL* est en phase inverse : La PM est un solvant polaire ou peu polaire, tel que l'eau, l'éthanol, le méthanol, ou le cyanure de méthyle (acétonitrile), avec ou sans modificateurs de polarité (peu ou polaire) : THF, CH_3Cl, CH_2Cl_2.

RMQ : on peut évaluer la polarité de la PM par rapport à chaque solvant en présence de l'eau afin d'optimiser k' (selon les temps de rétention), ceci est exprimé par la relation (IV.28) qui evalue la polarité de la PM :

$$\pi_{AB} = \phi_A \,.\, \pi_A + \phi_B \,.\, \pi_B \qquad \text{(IV.28)}$$

Avec :

ϕ_A et ϕ_B : fractions volumiques des solvants

π_A et π_B : indices de polarité, (voir Tableau 4).

La rétention est liée avec la composition de la PM par la relation (IV.29)

$$\frac{k'_2}{k'_1} = 10^{(\pi_2 - \pi_1)/2} \qquad \text{(IV.29)}$$

k' : facteur de rétention du soluté dans la PM 1 ou 2 etc.

La relation précédente s'applique en fonction de la polarité de la PS, comme suit :

Phase normale	Phase inverse
$\frac{k'_{i,B}}{k'_{i,A}} \approx 10^{\frac{P'_A - P'_B}{2}}$ où $P'_B > P'_A$	$\frac{k'_{i,B}}{k'_{i,A}} \approx 10^{\frac{P'_B - P'_A}{2}}$ où $P'_B > P'_A$

Tableau 4 : Indices de polarité des solvants utilisés en chromatographie.

Solvant	**π (Ip)**	**Solvant**	**π (Ip)**
Cyclopentane	0.1	n-Propyl Alcohol	4.0
Heptane	0.1	Tetrahydrofuran	4.0
Hexane	0.1	Chloroform	4.1
Iso-Octane	0.1	Ethanol	4.3
Petroleum Ether	0.1	Ethyl Acetate	4.4
Cyclohexane	0.2	1,4-Dioxane	4.8
Toluene	2.4	Methanol	5.1
Ethyl Ether	2.8	Pyridine	5.3
Dichloromethane	3.1	Acetonitrile	5.8
Ethylene Dichloride	3.5	N,N-Dimethylformamide	6.4
Isopropyl Alcohol	3.9	Dimethyl Sulfoxide	7.2
n-Butyl Acetate	4.0	Water	10.2

Exemple : PM: 30% MeOH / 70% H_2O

$\pi_{MeOH} = 5.1$; $\pi_{H2O} = 10.2$

t_R = 31.1 min; t_m = 0.48 min : k'= 64 et π_1 = 8.7 donc π_2 = 6.6 et $\phi_{méthanol}$ = 0.71.

En CLS (adsorption), 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.

IV.3. L'échantillon

1) **Cas de la CLL :**

- Pour les molécules polaires ou très polaires : CL en phase normale
- Pour les molécules à polarité moyenne ou faible : CL en phase inverse

2) **Cas de la CLS :** Comme dans le cas de la CCM, les molécules polaires sont toujours plus adsorbées que les molécules non polaires : amides > amines > acides carboxyliques >alcools > cétones > esters > composés nitrés > éthers >hydrocarbures aromatiques > hydrocarbures non saturés > hydrocarbures saturés.

V. Facteurs dont dépend la séparation

Quatre facteurs interviennent : la PS, la PM et :

- **Dimension de la colonne :** Les colonnes spécialement conçues pour cet usage ont à leur base une plaque de verre fritté ou de porcelaine qui permet l'écoulement libre de l'éluant tout en empêchant le passage de l'adsorbant. On peut aussi utiliser une burette, au fond de laquelle on place un tampon de laine de verre et du sable (Figure 47). Des colonnes longues donneront des résolutions plus importantes (Figure 48).



Figure 47. Colonne conventionnelle.

La quantité d'adsorbant est telle qu'il occupe une hauteur égale à environ 10 fois le diamètre de la colonne. Il faut également prévoir un espace de 10 cm environ au-dessus de l'adsorbant pour placer le solvant.

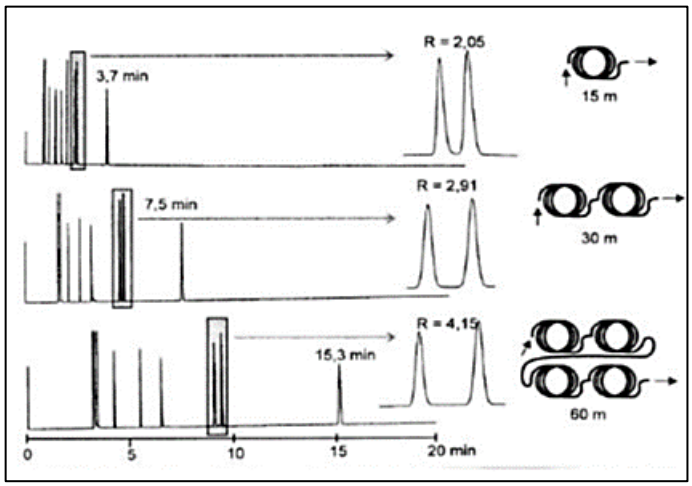


Figure 48. Effet de la longueur de la colonne sur la qualité de séparation.

- **Vitesse d'élution :** Elle doit être la plus constante possible. Il faut qu'elle soit suffisamment lente pour que le soluté soit au plus près de l'équilibre entre les phases liquide et adsorbée. Elle ne doit pas être trop lente car les substances diffusent dans le solvant et on obtient des bandes de plus en plus larges et une séparation médiocre.

VI. Préparation d'un système chromatographique en chromatographie d'adsorption sur colonne

VI.1. Remplissage de la colonne

C'est l'opération la plus délicate car le remplissage doit être le plus homogène possible et exempt de bulles d'air. Les surfaces inférieure et supérieure de l'adsorbant doivent être parfaitement horizontales. La colonne étant verticale, le remplissage peut être réalisé selon deux méthodes au choix.

- **Remplissage par voie humide :**

On prépare dans un bécher un mélange homogénéisé de l'adsorbant et du moins polaire des solvants utilisé pour le développement en ajoutant par petites quantités l'adsorbant dans le solvant pour obtenir une bouillie suffisamment fluide pour couler facilement.

A l'aide d'un entonnoir, on verse suffisamment de bouillie pour que l'adsorbant qui se dépose progressivement forme une couche d'environ 2 cm. On tapote les parois de la colonne pour favoriser le tassement de l'adsorbant. On ouvre alors le robinet pour que le solvant s'écoule lentement et on poursuit l'addition de la bouillie homogénéisée par portions successives. Quand tout l'adsorbant est introduit, on laisse décanter jusqu'à ce que le liquide qui surnage soit limpide. Pendant l'opération, on doit veiller à ce que le niveau de solvant soit toujours supérieur à celui de l'adsorbant. (Consulter le lien : https://www.youtube.com/watch?v=S-CDbA8tYKM).

- **Remplissage par voie sèche**

La colonne est remplie au deux tiers par le moins polaire des deux solvants et l'adsorbant en poudre est ajouté en portions successives dans la colonne à l'aide d'un entonnoir; pendant l'addition, on frappe continuellement sur les parois pour obtenir un tassement maximal. Quand la première portion forme une couche d'environ 2 cm, on ouvre le robinet pour faire couler lentement le solvant. On termine comme précédemment.

VI.2. Dépôt des produits à analyser

Ils doivent former une zone cylindrique étroite dans le haut de la colonne.

Un liquide est déposé tel quel. Un solide sera dissous dans le minimum du moins polaire des deux solvants.

On ajuste d'abord le niveau de solvant pour qu'il soit juste au-dessus de celui de l'adsorbant. A l'aide d'une pipette, on coule l'échantillon au sommet de la colonne de façon uniforme sur toute la surface de la colonne sans la déformer. Si nécessaire, on ajuste à nouveau, comme précédemment, le niveau de liquide de la colonne : l'échantillon est ainsi adsorbé uniformément au sommet de la colonne. On peut placer un verre fritté ou une rondelle de papier filtre au-dessus de l'adsorbant pour prévenir une remise en suspension de l'adsorbant.

VI.3. Elution

On peut alimenter la colonne en continu à l'aide d'une ampoule de coulée ou bien ajouter manuellement l'éluant. Dans tous les cas, la surface de l'adsorbant ne doit jamais être au contact de l'air. L'alimentation en solvant s'effectue à l'aide d'une ampoule de coulée. le débit de

l'alimentation est réglé de façon qu'il soit le même que celui de l'écoulement au bas de la colonne (généralement de 5 à 50 gouttes par minute). Lorsque l'analyse des fractions est terminée, on réunit celles qui correspondent à des produits identiques, en prenant soin d'éliminer celles qui correspondent à des recouvrements de zones. Les substances obtenues de cette façon sont généralement d'une très grande pureté.

Le moyen de détection est facultatif : par CCM ou par spectroscopie UV-vis.

VII. Propriétés

La chromatographie sur colonne peut être une méthode préparatoire ; elle permet en effet la séparation des constituants d'un mélange et leur isolement, à partir d'échantillons dont la masse peut atteindre plusieurs grammes.

Elle présente les propriétés suivantes :

• de grandes quantités de solvant sont nécessaires à l'élution ;

• la durée de l'élution est généralement très grande ;

• la détection des composés exige une attention constante.

Chapitre VI. d : CPG et Coupage CG/SM/SM

I. Introduction

La séparation sur la colonne de CPG se fait sur des composés qui doivent être à l'état gazeux ou susceptible d'être volatilisés par élévation de température. Cette technique, se limite son emploi à l'étude des composés moléculaires thermostables et volatils et la séparation exige des quantités d'échantillon de l'ordre de mg jusqu'à le μg. La CPG constitue la méthode la plus puissante et la plus fine pour séparer, identifier et quantifier les corps gazeux ou volatilisables. Elle permet ainsi l'analyse de mélanges éventuellement très complexes dont les constituants peuvent différer de façon considérable par leur nature et leur volatilité. Actuellement les appareils de CPG sont couplés avec un spectromètre de masse pour l'identification des composés au fur et à mesure de leur séparation.

Selon la nature de la PS, on distingue :

- La chromatographie gazeuse d'adsorption : si la PS est solide

- La chromatographie gazeuse de partage : si la PS est liquide

II. Principe

La méthode est basée sur l'affinité des solutés d'un mélange vis-à-vis la phase stationnaire (solide adsorbant CGS, film liquide CGL). La phase mobile (gaz inerte), ne présente aucune affinité pour les solutés.

La température est le seul paramètre de modification important. En outre, la viscosité et la vitesse du gaz dans la colonne ont une influence sur la dispersion des composés dans la phase stationnaire et sur la diffusion dans la phase mobile (équation de Van Deemter) et par conséquent sur le paramètre d'efficacité N et sur la sensibilité de la détection.

De même que pour la CPL :

✓ Phase Stationnaire polaire → Bonne séparation des composés polaires

✓ Phase Stationnaire apolaire → Bonne séparation des composés apolaires (gradient point ébullition)

III. Appareillage

L'appareillage de CPG est constitué principalement de trois compartiments : système d'injection, colonne et le système de détection. La PM est un gaz, entraine l'échantillon injecté et vaporisé, à travers une colonne renfermant la PS. Les solutés sont entrainés à des vitesses inégales et à la sortie de la colonne se trouve un détecteur relié à un enregistreur, (Figure 49).

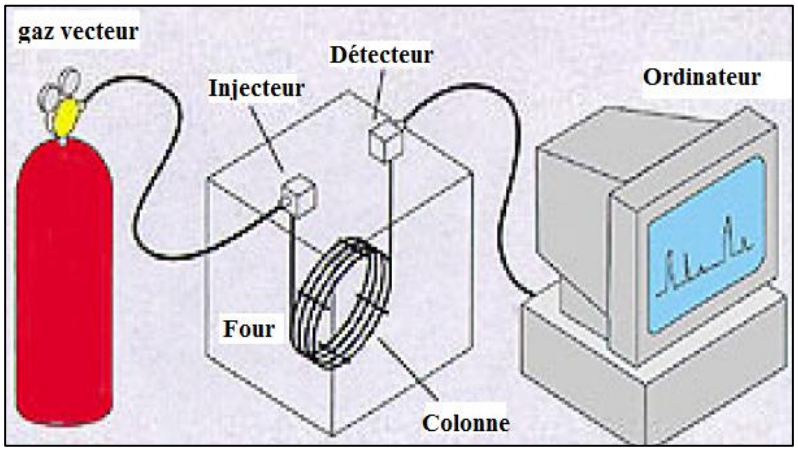


Figure 49. Schéma d'un appareil de chromatographie en phase gazeuse.

III.1. Alimentation en gaz vecteur

L'élution est assurée par un gaz, appelé gaz vecteur ou porteur, le plus utilisé est l'hélium, les autres sont l'hydrogène, l'azote ou l'argon. Il doit être inerte, très pur, desséché et surtout ne contenir ni oxygène, ni eau. L'hélium (He) est le gaz le plus utilisé, avec aussi l'argon, l'azote et l'hydrogène (le choix du gaz dépend du détecteur utilisé, Catharomètre : H_2, He ; Capture d'électron : N_2 ou H_2 ; ionisation de flamme : N_2, H_2, He ; SM : N_2, H_2, He). Il provient d'un cylindre sous pression et son débit est ajusté par un régulateur de pression (ou manomètre,

(Figure 50). La pression en tête de colonne est de qq dizaines à qq centaines de kPa est stabilisée afin que le débit demeure constant. En général le débit du gaz est de 25 à 100 ml/min pour les colonnes remplies et 0,5 à 5 ml/mn pour les colonnes capillaires.



Figure 50. Régulateur du débit du gaz vecteur dans une CPG.

III.2. Système d'injection

C'est une étape importante de l'analyse. L'introduction trop lente des échantillons cause souvent un élargissement des pics et réduit la résolution. Les caractéristiques des injecteurs ainsi que les modes d'injection diffèrent suivant les types de colonnes auxquelles ils sont connectés. La température de l'injecteur doit être réglée de manière à provoquer la vaporisation de tous les analytes de l'échantillon : elle est généralement maintenue à 20 à 50°C au-dessus de la température d'ébullition de l'analyte le moins volatil, (elle est supérieure à celle de la colonne).

Selon l'état de l'échantillon, l'injection est faite :

- A l'aide d'une *microseringue* pour les liquides et les solutions.
- A l'aide d'une *vanne à boucles* pour les mélanges gazeux.

Le choix de l'injecteur est dicté par le type de colonne utilisée (remplie ou capillaire) et par la nature des produits à séparer.

1) **Injecteurs pour colonnes Remplies,** (Figure 51.a) : L'injection s'effectue à chaud avec vaporisation directe dans le corps de l'injecteur. La plus grande partie des chromatographes utilisent des chambres d'injection thermostatés. Le gaz vecteur, préalablement chauffé, traverse

la chambre d'injection et l'échantillon est injecté à l'aide d'une micro-seringue à travers un septum et est vaporisé et mélangé avec le gaz vecteur en le portant vers la colonne.

Ce type d'injection présente l'inconvénient de favoriser la décomposition des substances fragiles car la température de l'injecteur est passablement plus élevée que celle de la colonne.

2) Injecteur pour les colonnes capillaires, (Figure 51.b). **:** des injecteurs fonctionnent avec deux modes : avec ou sans division (split ou splitless) car ces colonnes nécessitent de faible débit et petits volumes d'échantillon.

En mode split : Une grande partie de l'échantillon injecté, vaporisé et mélangé au gaz vecteur est éliminée de l'injecteur par une vanne de fuite. Cette vanne de fuite sépare le courant gazeux en deux parties dont la plus petite est la seule à pénétrer dans la colonne. Un dispositif règle le débit de fuite (généralement entre 50 et 100 ml/min) et le facteur de division varie entre 1/20ème et 1/500ème. L'inconvénient de ce mode d'injection est l'évaporation sélective des composés les plus volatils avec modification de la composition de l'échantillon injecté.

En mode splitless : ce mode d'injection est réservé à l'analyse de traces. On injecte l'échantillon avec la vanne de fuite fermée durant 0,5 à 1 minute afin que les composés vaporisés en même temps que le solvant se concentrent sur les premiers centimètres de la colonne. Puis l'ouverture de la vanne de fuite élimine ensuite de l'injecteur les composés moins volatils qui nuiraient à l'analyse.

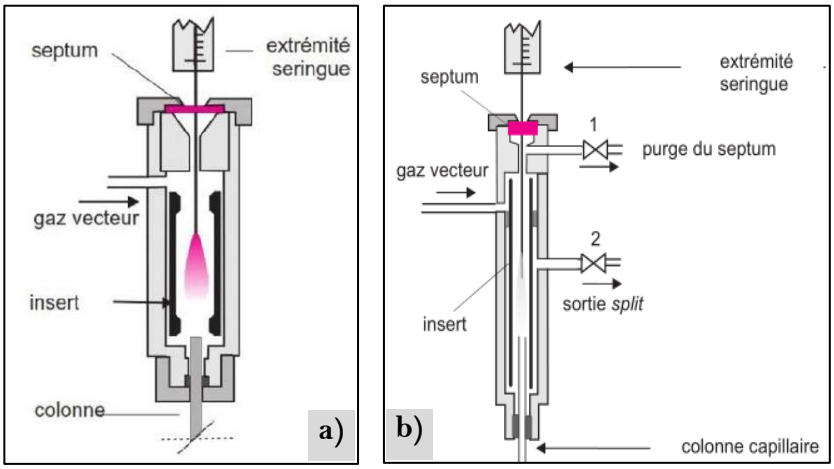


Figure 51. Injecteurs dans une CPG, pour une colonne remplie : a) et pour une colonne capillaire :

RMQs : l'injection pour les deux colonnes, peut se faire de manière :

- **Directe**, elle se fait à froid (40°C), de l'échantillon et la vaporisation n'a lieu qu'après le dépôt. Elle est adaptée aux composés fragiles (thermodégradables).
- **A température programmable,** (de 20 à 300°C) en quelques dizaines de secondes.

III.3. Four

C'une enceinte thermostatée qui permet de chauffer la colonne jusqu'à 400°C. La montée de la température est contrôlée, rapide et stable. Pour la séparation de mélanges de composés ayant des capacités de rétention très différentes sur la phase stationnaire, la montée de la température est programmable. L'enceinte peut être régulée à basse température à l'aide d'une vanne cryogénique alimentée par N_2 ou CO_2 liquides.

III.4. Colonnes

Il existe deux types :

1) Colonnes remplies (à garnissage) : Ces colonnes, d'un diamètre 2 à 15 mm et de 1 à 4 m de long, sont fabriquées à partir d'un tube d'acier ou de verre ou autre métal. Elles supportent un débit de gaz vecteur allant de 10 à 40 ml/min. Elles contiennent, en continu, un lit de granules poreux et inerte. Il s'agit de grains sphériques ayant une surface spécifique de 2 à 8 m^2/g de 0,5 à 300 μm de diamètre. La PS est immobilisée par imprégnation ou par réaction chimique avec le support poreux. (Figure 52)

Les matériaux de la PS sont commercialisés sous le nom de :

• *Chromosorb*® : Ce sont des silicates fossiles (diatomées) dont le squelette est chimiquement comparable à de la silice amorphe.

• *Spherosorb*® : C'est un matériau de synthèse constitué de petites billes de silice. La présence de nombreux groupements silanols confère à tous ces supports une réactivité comparable à celle du gel de silice.

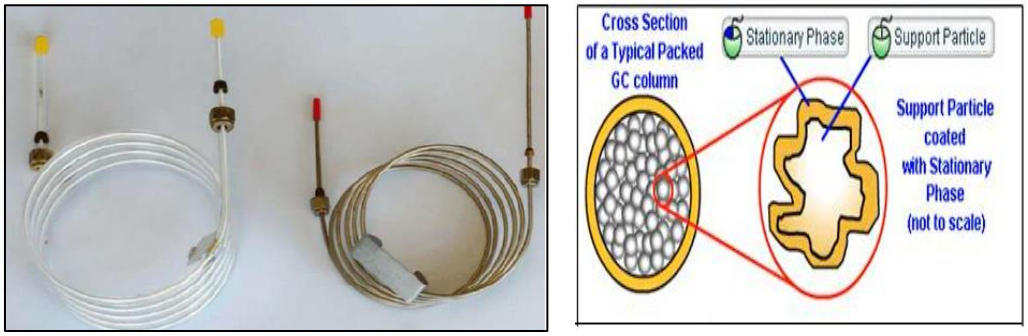


Figure 52. Colonne remplie pour la

2) Colonnes capillaires (à tube ouvert) : (Figure 53), Le diamètre interne de ces colonnes varie de 0,1 à 0,35 mm (e_{PS} = 0,1-5,5 µm) et la longueur de 15 à 100 m enroulée en spirale. Ces colonnes sont des tubes vides à l'intérieur desquels la PS est déposée sur la paroi interne sous forme d'un film régulier. Elles sont de type :

1. WCOT (Wall Coated Open Tubular) : lorsque la phase stationnaire est un film liquide mince déposé sur la paroi de la colonne.
2. PLOT (Porous Layer Opent Tubular) : lorsque la phase stationnaire est un couche solide poreuse (chromatographie d'adsorption).
3. SCOT (Support Coated Open Tubular) : lorsque la phase stationnaire est un support solide inerte imprégné.

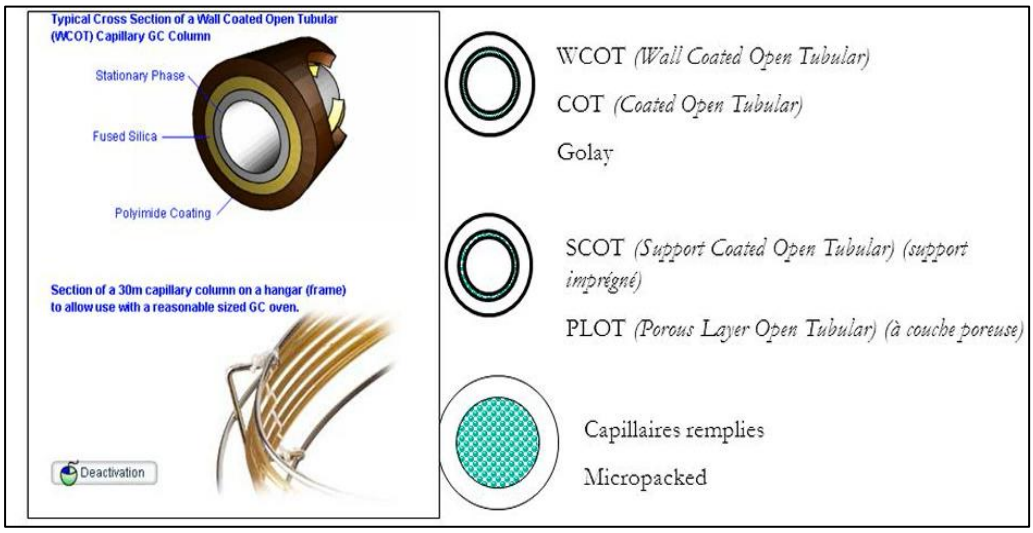


Figure 53. Colonnes capillaires de CPG.

Les colonnes capillaires sont préparées à partir de silice fondue très pure, issue de la combustion dans une atmosphère d'oxygène de SiH4 ou de SiCl4. Leurs parois sont renforcées par une gaine extérieure en polyimide qui est appliquée pendant l'étirage du capillaire. Les colonnes ainsi obtenues sont très flexibles et peuvent être enroulées en spirale d'une dizaine de centimètres. La paroi interne de la silice subit divers traitements qui dépendent de la technique de fixation de la phase stationnaire qui sera constituée d'un film uniforme de liquide de quelques dixièmes de micromètre d'épaisseur.

Elles présentent les propriétés suivantes :

- Grande efficacité N= 200.10 ^{3} plateaux ($\approx 10^3$ pour une colonne remplie).
- Débit plus élevé (temps d'analyse plus court).
- Pas de particules paquetées dans la colonne ($\Delta P \downarrow$).
- Coût, fragilité (casse, oxydation), faible capacité.
- Polarité variable.

III.5. PS

Les PS doivent répondent à certain nombre d'exigences :

1. Elles doivent avoir une sélectivité élevée d'interagir sélectivement avec les différents solutés
2. Elles doivent couvrirent une plage de température aussi large que possible (-60 à 400 °C).
3. Elles doivent avoir une pression de vapeur aussi basse que possible
4. Elles doivent être thermiquement stables
5. Elles doivent être chimiquement inertes
6. Elles doivent avoir une faible viscosité dans les conditions de travail
7. Elles doivent mouiller l'échantillon en s'adhérant efficacement afin qu'elles n'entrainent pas avec la PM.

Bien que les séparations sont faites à haute température, les PS les plus couramment utilisées sont les polymères liquides de poids moléculaire élevé.

Les techniques d'imprégnation sont très simples pour les colonnes à garnissage, plus de 100 phases stationnaires de différents types ont été proposées dans la littérature.

Pour les colonnes capillaires, les PS les plus utilisées sont :

1) ***<u>Cas du CGL</u>*** **:** le liquide est fixé par imprégnation ou par greffage sur des particules solides ou sur un support inerte qui peut être aussi la paroi de la colonne. Les phases actuelles correspondent à deux principaux types de composés :

➲ ***<u>Les polysiloxanes ou silicones,</u>*** ils sont caractérisés par une grande stabilité thermique et de la possibilité de se modifier chimiquement la structure de base pour obtenir des phases de polarités et de sélectivité différentes. Il existe environ 20 compositions différentes de chaînes alkyle ou aryle (méthyle ou phényle) auxquelles peuvent être incorporés d'autres groupes fonctionnels (cyanopropyle, trifluoropropyle, Figure 54).

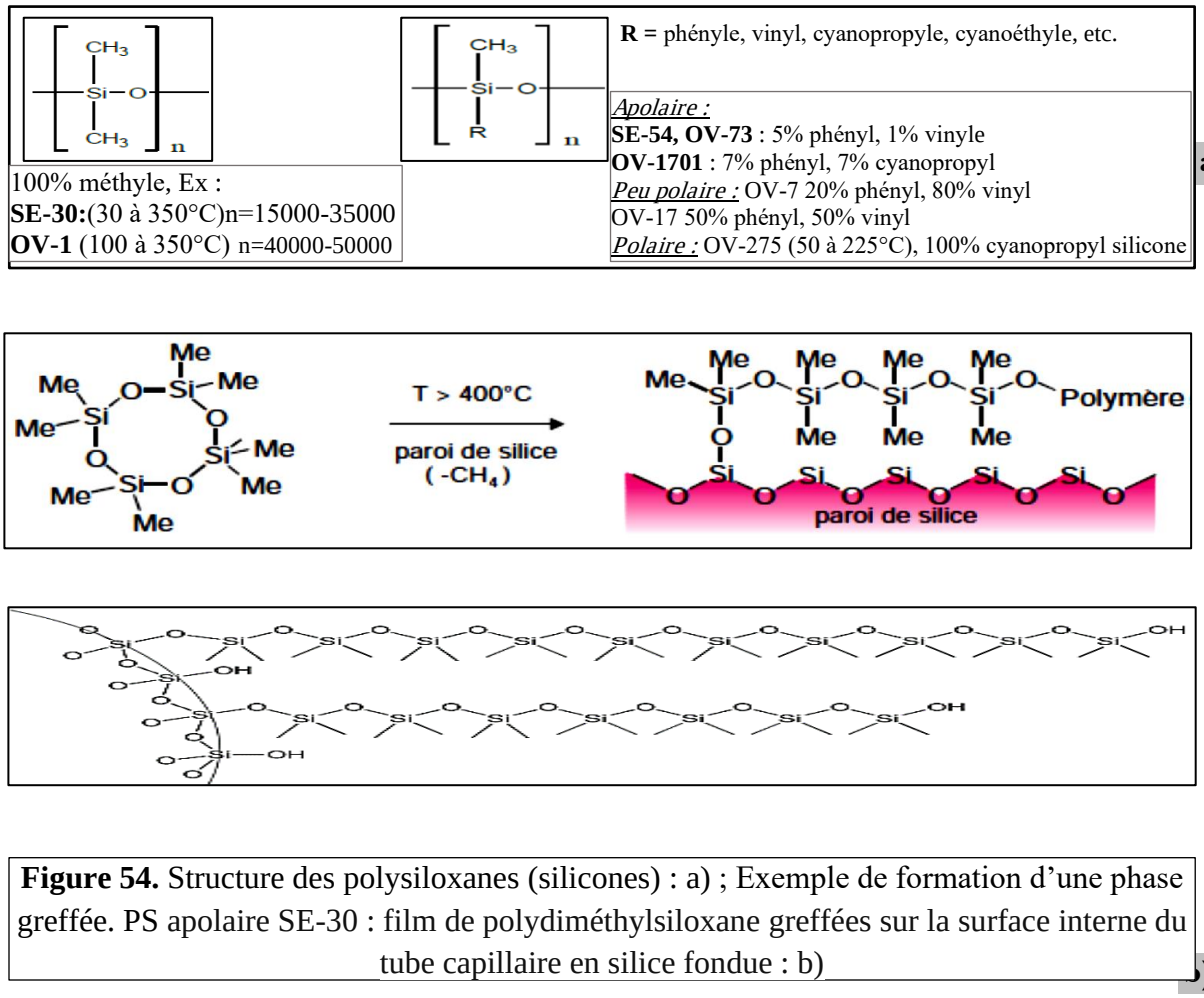


Figure 54. Structure des polysiloxanes (silicones) : a) ; Exemple de formation d'une phase greffée. PS apolaire SE-30 : film de polydiméthylsiloxane greffées sur la surface interne du tube capillaire en silice fondue : b)

➲ ***Les polyéthylèneglycols (PEG),*** il s'agit de PS très utile pour la séparation des composés polaires par formation des liaisons H. ces phases sont préparées par réaction de polymérisation de l'oxyde d'éthylène. Comme les *polysiloxanes*, les PEG, pouvent faire l'objet de modifications structurales, (Figure 55).

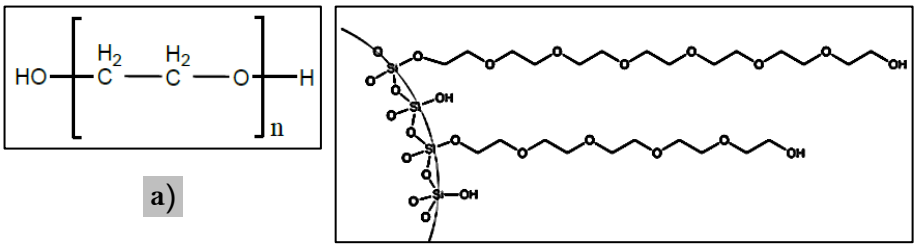


Figure 55. Structure des polyéthylène glycols (PEG) : a) et PS type Carbowax : b).

Les caractéristiques de rétention de cette PS est la teneur en groupements OH, tandis que le poids moléculaire est responsable à la stabilité thermique. Ces polymères polaires (M = 1500 à 20 000 g/mol pour le Carbowax 20M) peuvent être utilisés pour le dépôt, l'imprégnation ou comme phases liées (40 < T < 240-260 °C, selon le diamètre de la colonne et l'épaisseur du film). L'inconvénient de ces PS est leur facilité d'oxydation.

2) Cas du CGS

La CGS est moins utilisée que la CGL, ceci est dû à un certain nombre de facteurs :

1- Elution incomplète des certains solutés et apparition des pics asymétriques, à cause de la dépendance des volumes de rétention avec la quantité d'échantillon (isothermes d'adsorption non linéaire.

2- Nombreux adsorbants présentent des propriétés de catalyse aux températures de fonctionnement de la colonne.

3- Temps de rétention excessivement long à cause des surfaces spécifiques élevées des adsorbants.

Dans le cas des colonnes capillaires à couche poreuse (PLOT), les principales PS utilisées sont des adsorbants : carbone graphite, gel de silice ou alumine, déposé sous forme de particules très fines sur la paroi interne des colonnes capillaires.

Elles sont utilisées pour séparer les composés gazeux ou très volatils. Les colonnes à phase graphite, ont été développées pour la séparation de N_2, CO, CO_2 et des hydrocarbures très légers.

III.6. Echantillons

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

- Lorsque les solutés sont directement volatilisables, les substances sont solubilisées dans un solvant très volatil puis 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 estérifiés par le butanol, les acides gras estérifiés par le méthanol, les oses réduits en alditols, puis acétylés, …

III.7. Détecteurs

Les solutés modifient une propriété chimique ou physique du gaz vecteur et ces variations sont transformées par le détecteur en signaux électriques qui sont amplifiés et transcrits sous forme d'un graphique. Un détecteur idéal doit présenter les caractéristiques suivantes :

- Bonne sensibilité.
- 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.
- Temps de réponse rapide et indépendant de la vitesse d'écoulement.
- Grande fiabilité et facilité d'utilisation.
- Réponse uniforme ou sélective pour différents solutés.
- Conservation de l'intégrité de l'échantillon.

Qqs terminologies :

- *Limite de détection (LD) :* c'est la quantité de soluté requise pour avoir un rapport signal bruit au moins égal à 3.
- *Limite de quantification (LQ) :* c'est la quantité de soluté requise pour avoir un rapport signal bruit au moins égal à 10.
- *Domaine de linéarité (LL) :* domaine dans lequel la réponse du détecteur est directement proportionnelle à la concentration.
- *Sélectivité :* propriété du détecteur à ne pas répondre de la même manière à toutes les espèces x, capacité à analyser des molécules spécifiques.
- *Sensibilité :* capacité d'un détecteur à répondre à de faibles variations de C ou de m.

1) *Détecteur à ionisation de flamme (FID) :*, Le courant gazeux issu de la colonne pénètre dans la flamme d'un petit brûleur alimentée par un mélange d'hydrogène et d'air. Ce détecteur détruit l'échantillon dont la combustion produit des ions et particules chargées, responsables du passage d'un courant ionique extrêmement faible entre deux électrodes.

Le signal est amplifié par un électromètre en une tension mesurable. Pour les composés organiques, l'intensité du signal est sensible au *débit massique* de l'échantillon, (Figure 56).

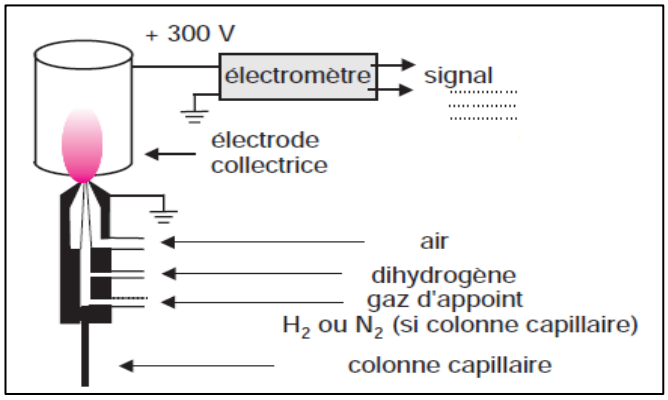


Figure 56. Détecteur à ionisation de flamme.

Les différentes caractéristiques des détecteurs à ionisation de flamme sont détaillées dans le tableau 5.

Tableau 5. Caractéristiques du détecteur FID.

Quantité minimum détectable	5.10^{-12} g/s
Réponse	Détecte tous les composés organiques
Linéarité	10^6
Stabilité	Excellente
Température limite	400°C
Gaz porteur	N_2, He, H_2

2) Catharomètre

Le Catharomètre est un appareil simple et non destructif, à réponse universelle, mais il est peu sensible.

Il est fondé sur une comparaison continuelle entre la conductibilité thermique du flux de chaleur emporté par le gaz vecteur pur et le flux de chaleur emporté par le gaz vecteur chargé des molécules de soluté. Ces flux de chaleurs sont produits par des thermistances, parcourues par un courant continu de tension fixe, dans une enceinte thermostatée avec précision.

En faisant passer le gaz vecteur contenant les constituants séparés sur la cellule du détecteur nous obtiendrons un signal chaque fois que l'un des constituants se présentera dans la cellule car la conductibilité thermique du gaz vecteur (qui traverse le détecteur) varie quand le constituant X traverse le détecteur (figure 57). Sa limite de détection est de l'ordre de 10 ng vis-à-vis tous les composés avec une sensibilité allant de 10^{-6} à 10^{-8} g/ml de gaz.

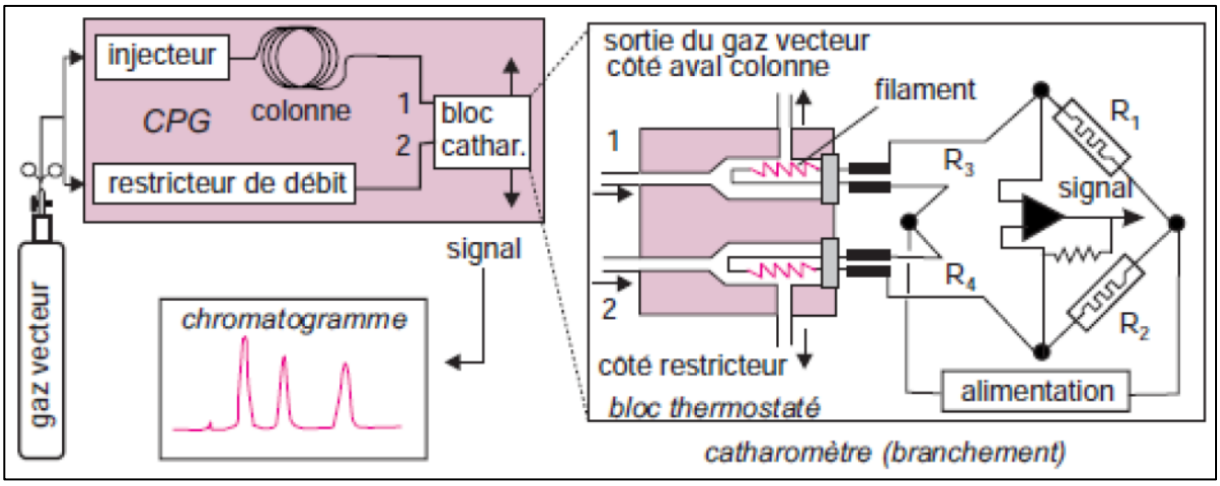


Figure 57. Détecteur type catharomètre.

3) Le spectroscope de masse, en mode IE (ionisation électronique) ou IC (ionisation chimique), 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 les dits composants. Typiquement utilisé avec les gaz vecteurs azote, hélium et hydrogène.

IV. Effet de la vitesse de PM sur l'efficacité de la colonne

La viscosité et la vitesse du gaz dans la colonne ont une influence sur la dispersion des composés dans la phase stationnaire et sur la diffusion dans la phase mobile (équation de Van Deemter), donc sur le paramètre d'efficacité *N* et sur la sensibilité de la détection (figure. 58).

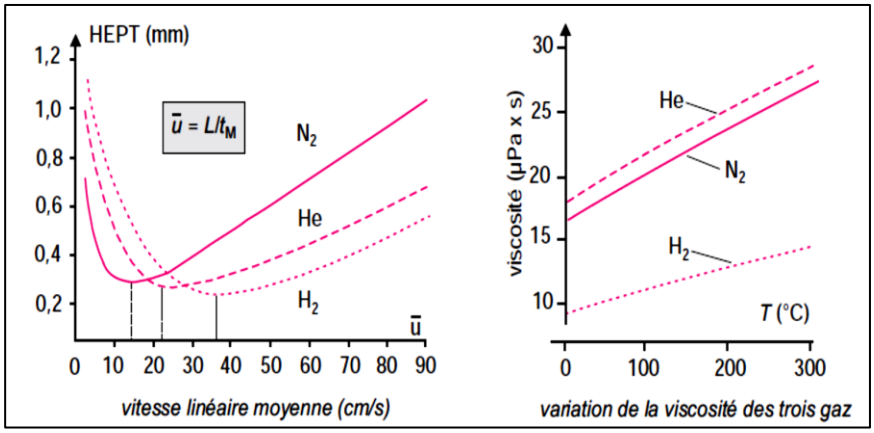


Figure 58. Efficacité en fonction de la nature et de la vitesse linéaire du gaz vecteur.

En CPG, les termes A, B et C apintervenant dans la loi de Van deemter ((expression IV.16) sont définis comme suit :

*** A (exprimé en cm): terme de remplissage A = 2. λ·dp* : *A* est en relation avec la taille des particules, leur répartition dimensionnelle et la régularité du remplissage (paramètre λ) sont à l'origine de chemins préférentiels qui peuvent conduire à des échanges imparfaits entre les deux phases. (C'est le facteur de diffusion turbulente, considéré comme peu important en chromatographie liquide et absent par nature pour les colonnes capillaires).

*** B (exprimé en cm^2/s) terme de diffusion longitudinale dans la phase mobile B = 2.τ.D_G :*

D_G : Coefficient de diffusion de l'analyte dans la phase mobile

τ : Facteur de tortuosité, à considérer surtout si la phase mobile est un gaz (principale cause d'élargissement des pics). La vitesse de diffusion est ÷ au coefficient de diffusion.

B est inversement proportionnel à $\bar{u}$ (moins de diffusion lorsque l'analyte séjourne moins longtemps dans la colonne).

*** C, terme de transfert de masse :* il est dû à la résistance au transfert de masse du soluté entre les deux phases, devient prépondérant lorsque le passage est trop rapide pour que l'équilibre soit atteint.

Ces courbes typiques de van Deemter (figure 9) montrent que l'hydrogène est, parmi les 3 gaz étudiés permet les séparations les plus rapides, à performances égales, tout en donnant plus de souplesse en ce qui concerne le débit, ce qui est très utile en mode programmation de température.

V. Applications

Les applications de la CPG sont nombreuses dans tous les domaines tels que : la parfumerie, l'œnologie, la recherche environnementale, l'industrie pétrolière, la biologie, l'agroalimentaire, la chimie fine et l'industrie des matières plastiques. Le développement de la chromatographie en phase gazeuse à grande vitesse ou multidimensionnelle rendent cette technique encore plus attractive. Sa très grande sensibilité permet de détecter des quantités de l'ordre de picogrammes pour certains composes.

VI. Couplage avec la spectroscopie de masse

Ce couplage, abrégé **CPG-SM**, ou **GC-MS** en l'anglais : Gas chromatography-mass spectrometry, est une technique d'analyse qui combine les performances de séparation des composés via la chromatographie en phase gazeuse, et de la spectrométrie de masse, comme moyen de détection et l'identification des composés en fonction de leur rapport masse sur charge. Cette technique permet d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances présentes en très petites quantités, voire en traces. Les applications de la CPG-SM comprennent le dosage de médicaments ou de stupéfiants, l'analyse environnementale, la médecine légale et l'identification de toutes substances inconnues même sous forme de traces.

VI.1. Principe

Il est basé sur l'injection, l'évaporation, la séparation, puis la détection des différents composants d'un mélange qui peut être le plus complexe que possible. La détection est assurée par spectroscope de masse qui tend actuellement à supplanter tous les autres systèmes de détection car c'est le seul à fournir des informations structurales sur les composés séparés par chromatographie. Par conséquent, les mêmes composants et le même principe d'un chromatogramme gazeux à colonne capillaire et ceux d'un spectroscope de masse sont applicables.

La différence des propriétés chimiques entre les différentes molécules dans un échantillon les sépare quand celui-ci se déplace le long de la colonne. Les molécules se retiennent différemment dans la colonne avant d'être élués ce qui permet au spectromètre de masse en aval de capturer, ioniser, accélérer, dévier et de détecter les molécules ionisées séparément. Le spectromètre de masse détruit alors chaque molécule en fragments ionisés et détecte ces fragments en fonction de leur rapport masse sur charge. Ces deux composantes utilisées ensemble, permettent l'identification d'une substance à un degré beaucoup plus fin que chaque unité utilisée séparément.

VI.2. Conception

Un CPG-SM est composé de deux compartiments principaux: un chromatographe en phase gazeuse et un spectromètre de masse (figure 59). Le chromatographe en phase gazeuse utilise une colonne capillaire qui dépend des dimensions de la colonne (longueur, diamètre, épaisseur du film) ainsi que des propriétés de la phase (par exemple 5 % polyphényl siloxane).

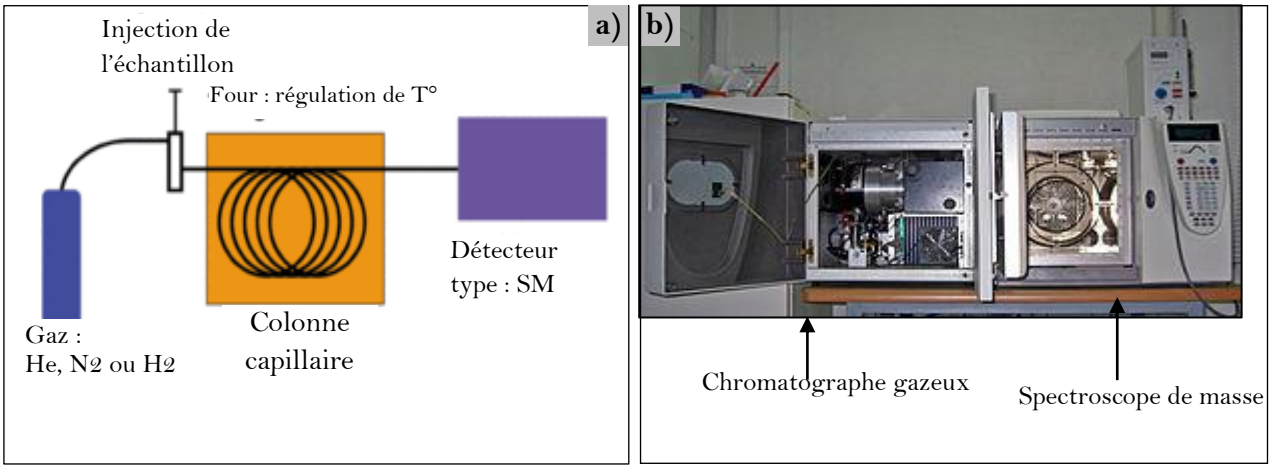


Figure 59. Schéma générale d'un GC-MS : a) et Appareillage d'un GC-MS : b).

1) **CG :** déjà décrit précédemment. Le rôle du chromatographe est de séparer les constituants d'un mélange. La chromatographie en phase gazeuse est réservée à l'analyse de composés relativement volatils et thermiquement stables.
2) **SM :** Il existe de nombreux types de spectromètres de masse, tous comportent trois éléments : une source, un analyseur et un détecteur (Figure 60). Ne sont présentés ici que les spectromètres de masse équipés d'analyseurs type : quadripolaires, qui représentent la très grande majorité des analyseurs utilisés en couplage GC-MS, en raison de leurs :

- Vitesse de balayage très élevée.
- Coût raisonnable.
- Facilité de maintenance.
- Bon fonctionnement du filament et du multiplicateur d'électrons qui sont extrêmement fragilisés par une pression trop élevée.

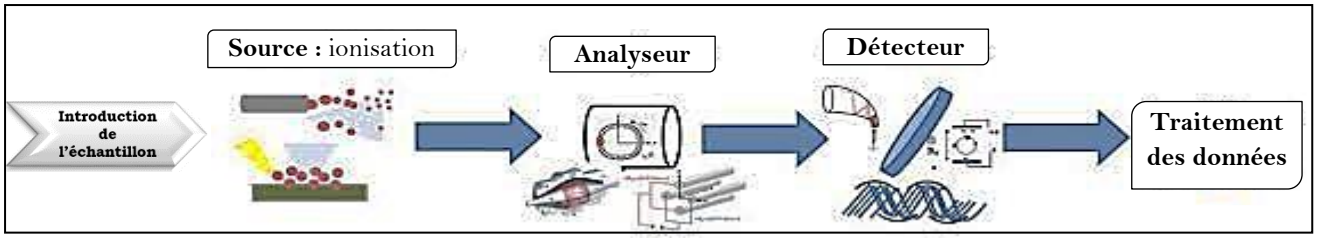


Figure 60. Constituants d'un spectroscope de masse.

a. Introduction de l'échantillon

En couplage avec un chromatographe en phase gazeuse, où les composés élués arrivent au spectromètre à l'état gazeux, Les composés sont introduits dans un réservoir qui communique avec la chambre d'ionisation (IC et IE). L'échantillon a une masse allant de quelques nanogrammes à quelques milligrammes. Les sources utilisées sont de type : impact électronique « IE » ou ionisation chimique « IC ». Leur usage est réservé à l'analyse des composés gazeux ou facilement volatilisables (point d'ébullition n'excédant pas 400 °C). La source est maintenue à une température élevée (généralement comprise entre 100 et 250 °C) pour éviter la condensation des analytes.

a.1. Ionisation chimique (IC) : Elle consiste à ioniser un gaz réactif de faible masse moléculaire (méthane, éthane, ammoniac, isobutane) par impact électronique dans la chambre d'ionisation puis à protoner la molécule de l'échantillon par le gaz réactif avec l'ammoniaque :

$$NH_3 + e^- \rightarrow NH_3^{+\bullet} + 2\ e^- \quad (1)$$

$$NH_3^{+\bullet} + NH_3 \rightarrow NH_4^+ + NH_2^- \quad (2)$$

$$M + NH_4^+ \rightarrow MH^+ + NH_3 \quad (3)$$

***m/z* =18** ***m/z* =M+1**

Ce mode d'ionisation implique une forte abondance d'ion pseudomoléculaire (MH^+) et une faible probabilité de fragmentation ce qui se traduit par une absence d'information structurale de la molécule (M).

a.2. Ionisation par impact électronique (IE) : La molécule est bombardée par des électrons de haute énergie (70ev) qui éjectent de la molécule un électron faiblement lié (Figure 61).

$$M + e^- \rightarrow M^{+\bullet} + 2\ e^- \quad (4)$$

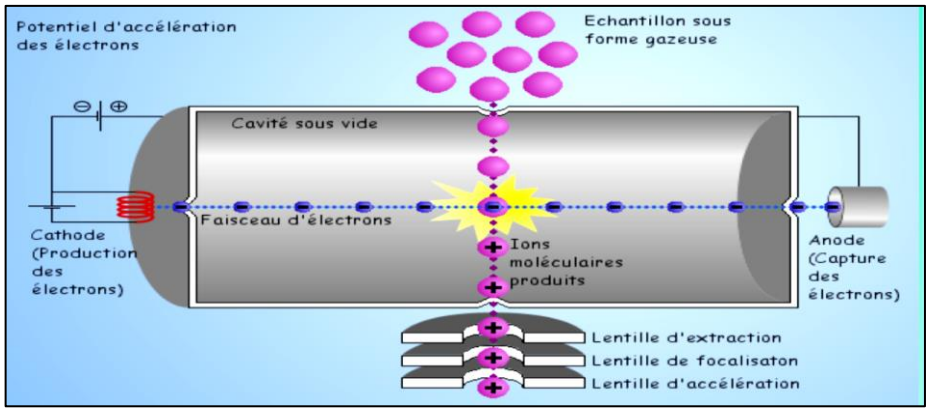


Figure 61. Principe d'ionisation par IE.

L'excès de l'énergie d'ionisation permet à l'ion moléculaire de subir une fragmentation en partie en produisant des ions de fragmentation, radicalaires ou moléculaires. Les ions fils fragmentent à leurs tours et ainsi de suite.

L'étude de ces ions fils permet d'élucider la structure de la molécule (M).

b. Chambre d'ionisation et accélération des ions

Dans la chambre d'ionisation, il se forme un plasma d'ions dont le plus léger est le H^+ et le plus lourd est $M^{+\bullet}$(IE). Afin d'éviter les collisions entre les ions positifs et négatifs, un potentiel électrique est appliqué à la sortie de la chambre d'ionisation. Ainsi, au cours de la fragmentation, les fragments neutres formés sont éliminés par un système de pompage. A la sortie de la chambre d'ionisation, tous les ions de même charge ont la même énergie cinétique. Ces ions, de masses différentes et de vitesses différentes, sont accélérés au moyen de plusieurs plaques portées à des potentiels négatifs croissants (cas des ions chargés positivement), la tension totale U étant comprise entre 2 et 10 kV ($E_c = z \cdot e \cdot U$) et le vide doit être poussé ($P < 10^{-4}$Pa).

c. Analyseur de masse

L'analyseur sert à séparer les ions formés selon leurs rapport m/z. Il existe plusieurs types d'analyseurs de masse : à secteur magnétique, quadripolaire, à piège ionique et à temps de vol.

Dans un contexte de couplage GC-MS, on parle souvent abusivement de mesure de masse car z = 1, les ions étant trop petits pour être chargés plusieurs fois (on considère qu'en phase

gazeuse un ion peut porter une charge pour environ 1 000 unités de masse). Les analyseurs sont caractérisés par quatre paramètres : la résolution, la vitesse de balayage, la gamme de rapports masse/charge balayée et la transmission. La résolution traduit la précision sur la mesure des rapports m/z des ions. Celle d'un analyseur dit « quadripolaire » est liée à sa vitesse de balayage en m/z : plus le balayage est rapide et est la résolution moins bonne.

c.1. Quadripôles

Comme le montre la figure 62, un quadripôle est systématiquement associé à un système d'extraction et de focalisation des ions produits dans la source. Il s'agit le plus souvent d'un hexapôle ou d'une lentille électrostatique (analogue électrique d'une lentille optique). Le quadripôle est constitué de quatre électrodes métalliques parallèles raccordées électriquement deux à deux, de section idéalement hyperbolique. Ces électrodes sont cylindriques et longues de 12 à 20 cm selon les modèles. L'application d'un potentiel de type U + Vcosωt crée un champ quadripolaire entre les électrodes. Deux électrodes symétriques par rapport à l'axe central du quadripôle sont portées à un potentiel de type U + Vcosωt, les deux autres au même potentiel mais de signe opposé (- U - Vcosωt). U et Vcosωt sont, respectivement, les composantes de tension continue et de tension alternative du potentiel de radiofréquence. V et ω sont, respectivement, l'amplitude et la pulsation de la tension alternative. Dans la pratique, le quadripôle fonctionne comme un filtre à ions : on fait varier simultanément les valeurs de U et de V de manière à ce que les ions produits par la source soient stables à tour de rôle. A un instant t donné, ne sont détectés que les ions d'un rapport m/z donné. Les autres ions vont heurter les électrodes ou les parois internes du spectromètre ; ils se déchargent et sont entraînés par le système de pompage.

d. Détecteurs

Le rôle du détecteur est double : détecter les ions proportionnellement à leur nombre et amplifier le courant correspondant (de l'ordre de 10^{-12} ampères) pour le rendre détectable par l'électronique du système. La plupart des appareils de GC-MS sont équipés de détecteurs de type chaneltron. Un « chaneltron » présente la forme d'un entonnoir courbe ou d'une corne d'abondance. L'intérieur est enduit d'un alliage plomb/oxyde de plomb qui a la propriété d'émettre des électrons sous l'effet d'un choc. Une différence de potentiel de 1 000 à 3 000 V est appliquée entre l'entrée et la sortie de l'entonnoir. Lorsqu'un ion vient heurter la paroi

interne, il y a émission d'électrons qui, accélérés par la différence de potentiel, rebondissent de part et d'autre de la paroi. Chaque choc décroche de nouveaux électrons qui sont eux-mêmes accélérés ; on parle de « cascade électronique ». Un chaneltron fournit un gain de l'ordre de 10^5.

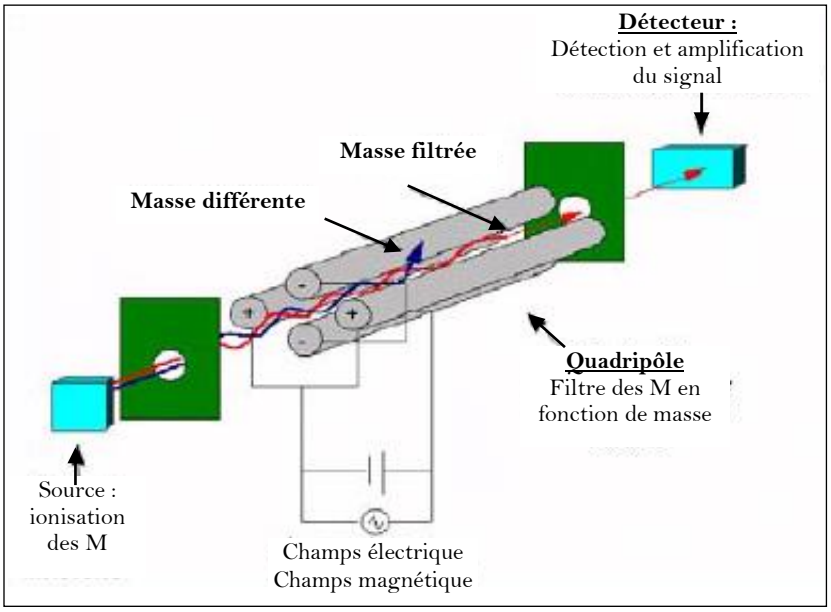


Figure 62. Constituants d'un spectroscope de masse à détecteur type quadripôle.

e. Interfaces chromatographe/spectromètre de masse

L'utilisation de colonnes capillaires en couplage (CG/SM) s'est généralisée et les interfaces appropriées font partie de la configuration de base. Trois types d'interfaces pour colonnes capillaires sont généralement rencontrées :

- L'interface directe : la totalité de l'effluent sortant de la colonne arrive dans la source d'ionisation. Une bonne sensibilité est obtenue mais le diamètre interne maximal permis pour la colonne dépend du débit de pompage.
- L'interface open-split : l'effluent sortant de la colonne chromatographique est dilué par un gaz de balayage additionnel ; une partie du mélange gazeux entre dans la chambre d'ionisation par un tube capillaire qui fait office de restricteur, le reste du mélange est aspiré par la pompe.

- Le séparateur à jet : la plus grande partie du gaz vecteur est éliminée ; il en résulte un enrichissement relatif de l'effluent en molécules à analyser. L'interface la plus simple et la plus courante est l'interface directe. L'interface « open-split » et le séparateur à jet sont habituellement utilisés pour les colonnes de type mégabore. L'interface est indépendante de la chambre d'ionisation, dans laquelle les molécules sont ionisées par ionisation électronique (IE), ionisation chimique positive (IC+) ou ionisation chimique négative (IC -).

Chapitre VI. e : HPLC et Coupage HPLC/ICP/MS

I. Introduction

Le pouvoir de séparation d'une colonne chromatographique augmente avec la longueur et l'efficacité. Ainsi, ce dernier est lié à la nature et à la surface présentée par la PS, toutefois, dans le cas d'une chromatographie conventionnelle, la PM traverse la PS par gravité ou sous faible pression (~0.1 MPa). Afin d'augmenter le débit, des pressions plus élevées (~10 MPa) ont été appliquées. Très rapidement les performances de ce dernier cas sous forme d'optimisation de la technique ont été mises en application, tels que la diminution de la taille des particules, régularité et compacité de remplissage, utilisation de détecteurs, etc.

Toutes les méthodes chromatographiques déjà vues, sont couramment impliquées dans la CLHP :

- De partage en phase normale ou inversée,
- D'adsorption,
- D'exclusion stérique,
- Echangeuse d'ions.

II. Principe

Le mélange liquide à séparer est introduit dans la PM qui traverse une PS très bien élaborée et finement devisée (diamètre de 2 à 5µm) ou un matériaux monolithique poreux, sous une haute pression assurée par un système de pompage afin de minimiser la perte de charge crée et assurée un écoulement régulier et continu de la PM. La séparation des composés est assurée selon les différences d'affinité entre les phases. Cette chromatographie doit être accompagnée par un système de détection.

III. Conception d'un appareil de CLHP

Une installation de CLHP comporte divers modules spécialisés, (Figure 63) : système de pompage, injecteur, colonne et détecteur.

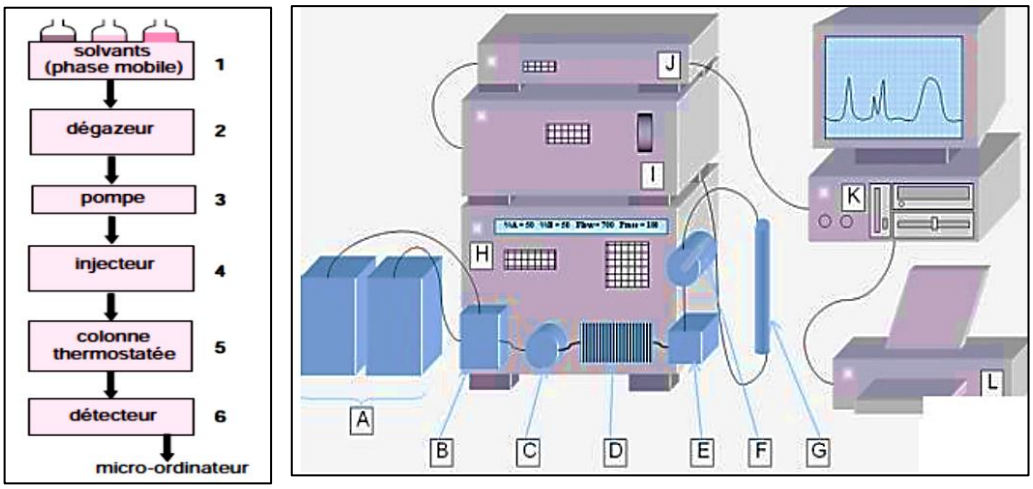


Figure 63. Schéma simplifié d'une CLHP : a) ; composants d'un HPLC.
A : Réservoir de PM, B : Vanne é-Mag, C : pompe, D : Egaliseur de pression, E : Chambre de mélange, F : injecteur, G : colonne, H : Unité HPLC, I : détecteur, J : interface.

A) Système de pompage : Toute installation de CLHP comporte au moins une pompe pour forcer le passage de la phase mobile à travers la colonne. Ces pompes sont conçues pour maintenir un débit non pulsé et stable (*0,1 et 10 ml/min*), tout en minimisant la contrainte de la perte de charge (Chapitre IV.a, expressions : (IV.30) et (IV.31)).

$$\Delta P = \frac{\eta . L . u}{K_0} \qquad \text{(IV.30)}$$

$$K_0 = \frac{d_p^2}{180} . \frac{\varepsilon^3}{(1-\varepsilon)^2} \qquad \text{(IV.31)}$$

η : Viscosité (Pa.s)

L : Longueur de la colonne, (m)

u : Vitesse de la PM, (m/s)

dp : Diamètre moyen des particules de la PS, (m)

K_0 constante de perméabilité (cm^2)

ε : porosité interstitielle (volume interstitiel de la colonne/volume total).

De ce fait, selon le mode d'alimentation de la PM, il existe deux types de chromatographie :

– ***Chromatographie isocratique*** : où la composition de la PM est maintenue constante pendant la séparation.

– ***Chromatographie en gradient*** où la composition de la PM varie progressivement ou par palier. L'élution graduée lors de la séparation des mélanges complexes permet, par modification de la composition de la PM, 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 est réglée selon le débit imposé à la phase mobile, sa viscosité ainsi que selon la nature de la phase stationnaire.

B) Injecteurs de l'échantillon, (Figure 64) : L'injection d'un volume précis de l'échantillon en tête de colonne doit se faire en un temps bref afin de ne pas perturber le régime de circulation de la PM et cela par une vanne haute pression à plusieurs voies, manuelle ou motorisée dans le cas des injecteurs automatiques. L'injection dans le cas du système avec boucle se fait en deux étapes :

• Position chargement (a) : remplissage de la boucle où la seringue est introduite à la position N° 4

• Position injection (b) : insertion de l'échantillon dans le flux de la PM par rotation de 60° d'un levier qui permet d'inverser le sens de circulation dans la boucle

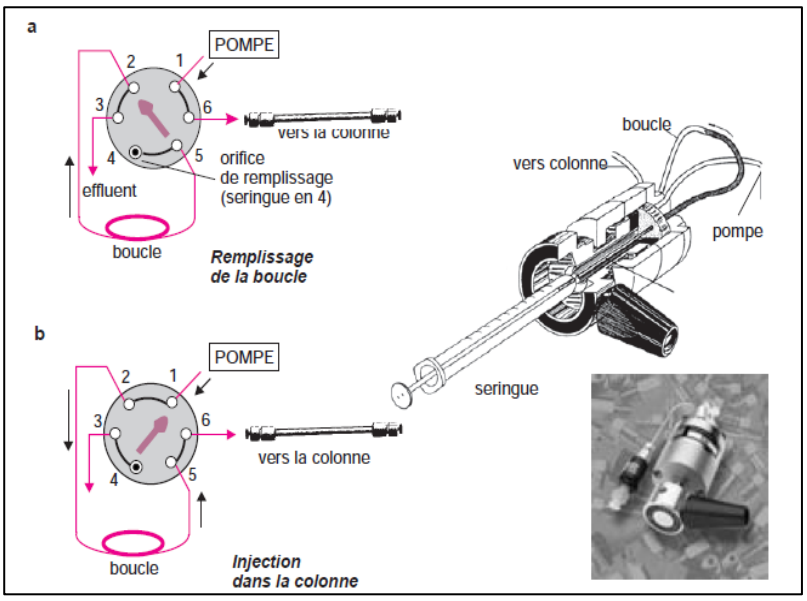


Figure 64. Système d'injection dans une de CLHP (ou HPLC)

c. Colonnes

C'est un tube, le plus souvent en acier ou en verre (pour des pressions < 40 bars, afin qu'elles résistent aux fortes pressions), dont la longueur et le diamètre présentent des différences selon les modèles. Les colonnes utilisées en CLHP ont un diamètre interne (d_I) de 3 à 5 mm (voire 2 mm) et de longueur de 5 à 30 cm (figure 65). La phase stationnaire est maintenue dans la colonne entre deux disques poreux situés à chacune des extrémités (Figure 65)

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'augmenter la durée de fonctionnement.

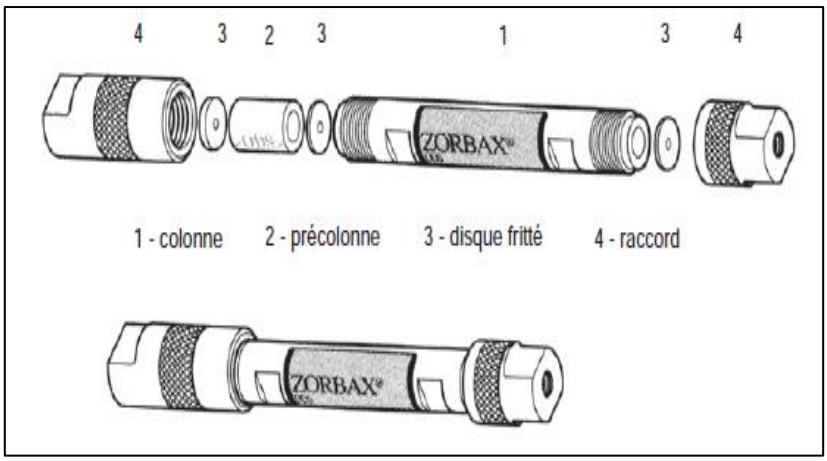


Figure 65. Colonne standard avec précolonne de CLHP

Selon la longueur et le diamètre présentent des différents modèles se présentent :

- Colonnes standard sont de diamètre interne (d_I) d'environ 4,5 mm et de longueur de 10 cm.
- Colonnes baptisées narrow-bore (d_I 2-4 mm).
- Colonnes micro-bore (d_I 1-2 mm).
- Colonnes capillaires remplies (d_I 0,1-1 mm).

Pour ces colonnes, le débit est de quelques µl/min d'où il nécessite des pompes et des détecteurs spéciaux. Ces colonnes étroites non seulement réduisent considérablement la

quantité de la PM (quelques gouttes sont suffisantes pour éluer tous les composés), mais améliorent aussi la résolution par diminution de la diffusion à l'intérieur de la colonne. Ils ont également une plus grande sensibilité et permettent aussi le couplage HPLC-MS.

D. Phases stationnaires

Sur la PS il y aura autant d'interactions particulières des trois constituants : MP/composé/PS, qu'il y a d'analytes dans l'échantillon. De nombreux matériaux organiques et inorganiques ont été testés pour être utilisés comme garnissage de colonnes. Trois types de PS sont fréquemment utilisées : supports microporeux, supports pelliculaires (superficiellement poreux), (figure 4) et phases greffées.

d.1. Gel de silice

Sa description a été déjà entamée dans le chapitre (IV.b : CCM). Le gel de silice un matériau très polaire, se présente sous forme de particules sphériques, parfois poreuses, d'un diamètre compris entre 2 et 5 μm. Ceci assure un garnissage compact et homogène de la colonne qui permet une circulation régulière de la phase mobile sans formation de voies préférentielles dans la colonne. Récemment, un nouveau type monolithique est apparu, il est garni d'un gel de silice poreux qui s'unit pour former une seule entité (Figure 66). Ce matériau est plus perméable aux solvants que les phases stationnaires de type billes traditionnelles. Les caractéristiques de gel de silice dépendent de plusieurs paramètres : structure interne, taille des particules, porosité (dimension et répartition des pores), surface spécifique, résistance à l'écrasement et la polarité. Les gels de silice utilisés en HPLC contiennent environ cinq groupes silanol par μm^2. Ils peuvent être non poreux ou poreux (taille des pores de l'ordre de 10 nm). Le volume de la PM varie de 30 à 70 % du volume total de la colonne.

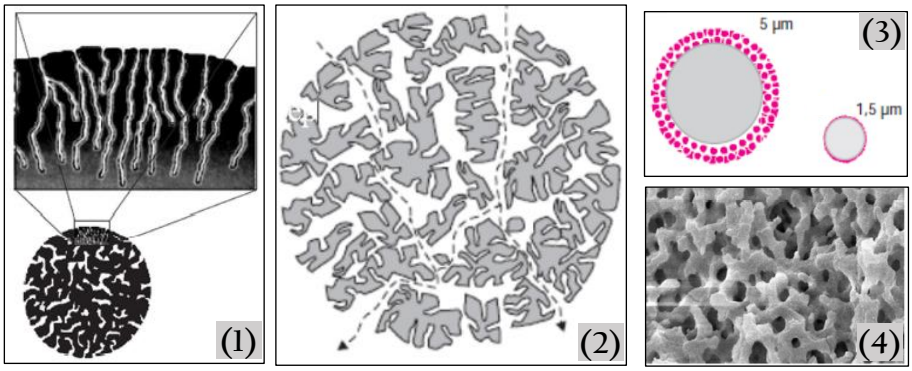


Figure 66. Représentations de quelques types de gels de silice (porosité et dimensions) : **1-** structure poreuse. **2-** structure comportant des fissures de perfusion pour accélérer le processus de transfert. **3-** Particules poreuse en surface non poreux. **4-** Structure d'un remplissage du type monolithique.

d.2. Gels de silice greffés

Dans ce dernier cas, le gel de silice ainsi modifié devient assimilable à un liquide immobilisé. Ces phases greffées, dont la polarité peut être ajustée avec précision, sont utilisées dans quasiment toutes les séparations. Ces modifications de la surface du gel conduisent à deux types de phases (figure 67):

➢ **Phases monomériques (10–15 µm d'épaisseur).** Elles sont obtenues en faisant réagir un monochlorosilane sur les fonctions silanols de surface. Les PS inverses les plus utilisées sont : C8 (ou RP8) et C18 (ou RP18).

➢ **Phases polymériques (25 µm ou plus en épaisseur).** On utilise cette fois un di- ou trichlorosilane.

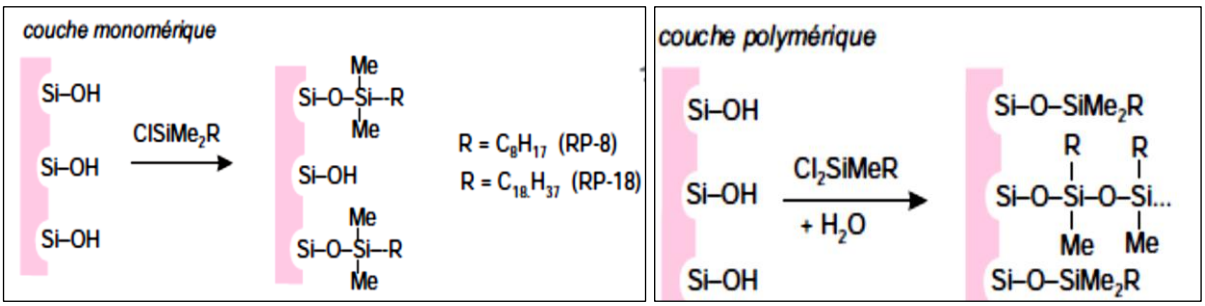


Figure 67. Formation d'organosilanes greffés à l'interface du gel de

e. Phases mobiles

Les PM utilisées sont celles décrites pour les types de chromatographies déjà vues. Elles peuvent être constituées d'un seul solvant ou plus. Les PM utilisées doivent présentées :

- Une compatibilité avec le détecteur.
- Une miscibilité entre les solvants.
- Une solubilité des solutés.
- Une faible viscosité.
- Une Inertie chimique.
- Une force éluante suffisante vis-à-vis la désorption soluté retenu sur la PS.

f. Détecteurs

Le détecteur doit réunir un certain nombre de qualités :

- Linéarité : réponses proportionnelles à la conc à chaque instant
- Sensibilité.
- Réponse rapide.
- Reproductibilité.
- Stable dans le temps.
- Peu de bruit de fond (variation aléatoire de la ligne de base).
- Limite de détection faible.
- Compatible avec les résultats attendus.
- Volume mort le plus réduit possible.

Les modes de détection les plus courants reposent sur les propriétés optiques des composés : absorption, fluorescence et indice de réfraction.

f.1. Détecteurs spectrophotométriques : elle est basée sur la loi de Lambert-Beer (dont λ varie de 190 à 800 nm) : l'absorbance *A* de la PM mesurée en sortie de colonne, est différente de celle de soluté.

f.2. Détecteur réfractométrique : il comporte un réfractomètre différentiel qui a pour objet de mesurer en continu la différence d'indice de réfraction entre la phase mobile et l'effluent de la

colonne. Ce détecteur est considéré comme quasi universel, il présente l'inconvénient d'être moins sensible que le détecteur UV, et d'être trop sensible aux variations de température.

g. Enregistreur : le signal transmis par le détecteur est enregistré sous forme de spectres (chromatogramme) et l'intégrateur s'occupe au calcul des différents paramètres.

IV. Couplage HPLC-ICP-MS

Nommée en anglais : liquid chromatography Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry ou en français : Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse à plasma induit. C'est l'une des techniques les plus utilisées pour l'analyse des formes chimiques des **éléments trace**.

L'ICP-MS est un détecteur élémentaire performant qui permet d'atteindre de très faibles concentrations avec une bonne spécificité. Ce détecteur couplé en ligne avec l'HPLC, est largement priorisé dans les analyses de spéciation pour plusieurs raisons :

- C'est un détecteur élémentaire spécifique, par conséquent la présence d'autres éléments ne perturbe à priori pas l'analyse des espèces de l'élément considéré ;
- Sa grande sensibilité pour une large gamme d'éléments élimine souvent le besoin d'une pré-concentration post-colonne ou lors du prétraitement de l'échantillon ;
- La stabilité de la ligne de base est bonne en comparaison à d'autres détecteurs et aucun signal négatif ne peut apparaître, ce qui facilite le traitement du signal ;
- Sa capacité multi-élémentaire apporte une information plus complète sur le contenu en différents éléments chimiques d'échantillons complexes ;
- Analyse simultanée de plusieurs isotopes d'un élément permet d'utiliser des méthodes de quantification de haut standard métrologique comme la méthode de dilution isotopique ;
- Débit d'introduction de l'échantillon est compatible avec la chromatographie liquide, ce qui permet une mise en œuvre facile du couplage.

Pour toutes ces raisons et malgré son coût élevé en investissement et fonctionnement, l'ICP-MS est le détecteur de choix après séparation des espèces chimiques par HPLC.

IV.1. Principe

La spectrométrie de masse à couplage inductif (ICP-MS) est une technique d'analyse permettant l'atomisation, l'excitation et l'ionisation des espèces métalliques et non métalliques dans les échantillons liquides et même les isotopes du même élément de très faible concentration (pouvant aller jusqu'à une partie par billiard (10^{-15}) , à l'aide d'un plasma induit à haute fréquence. Le spectromètre de masse a pour rôle de séparer les différents ions présents et de sélectionner spécifiquement l'analyte et de l'envoyer au détecteur.

IV.2. Qq définitions

- *L'atomisation* : consiste à créer des ions atomiques et polyatomiques de petite taille
- *Le plasma* : souvent considéré comme un quatrième état de la matière, est défini comme un gaz à haute température (7000 K), avec une forte densité d'ions et d'électrons libres, électriquement neutre. Le plasma à courant induit est maintenu par une énergie fournie sous forme de champ électrique par un générateur de radiofréquence.

IV.3. Conception de l'installation couplage HPLC – ICP-MS

L'installation du couplage est réalisée en connectant simplement la sortie de la colonne chromatographique avec l'entrée du nébuliseur (Figure 68). Cette opération est rendue possible du fait de la compatibilité entre le débit de sortie de la colonne chromatographique et le débit d'entrée d'un nébuliseur pneumatique classique (~ 1 mL/min). De plus, dans le module chromatographique, les mécanismes de séparation peuvent être : échange d'ions, chromatographie de phase inverse avec ou sans appariement d'ions et exclusion stérique, ce qui permet l'analyse des composés chimiques très différents comme les espèces redox, les composés organométalliques, les biomolécules, des métabolites de xénobiotiques. La principale limitation de ce type de couplage est le manque de compatibilité de la PM d'HPLC avec l'ICP-MS. En effet, des teneurs trop élevées en sels ou en solvants organiques peuvent induire des perturbations au niveau du nébuliseur, du plasma et/ou des cônes.

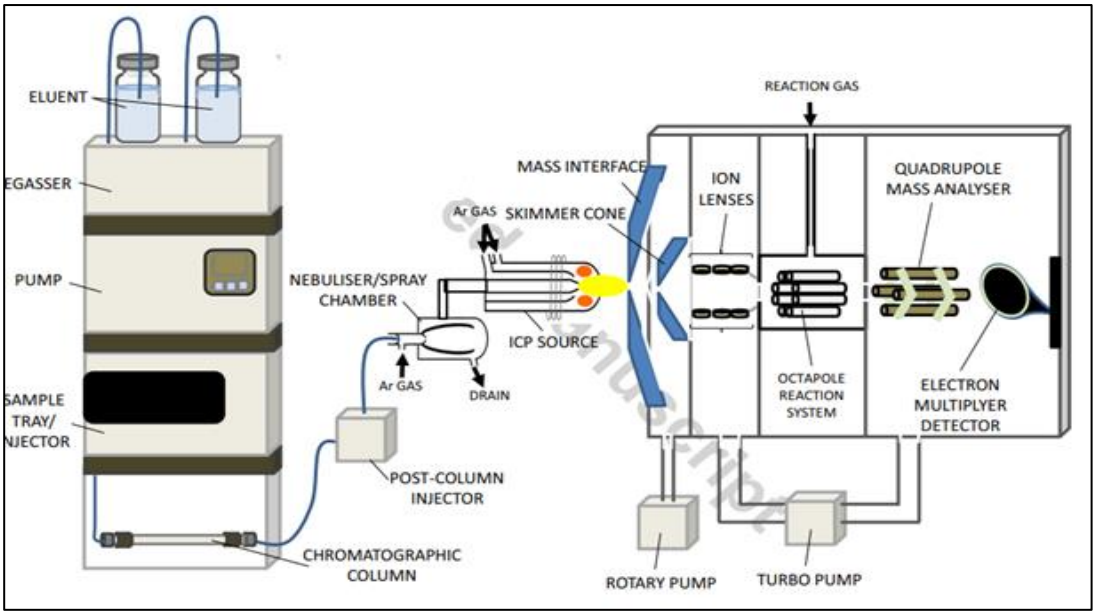


Figure 68. Schéma général du couplage HPLC – ICP-

a) La source

Le plasma le plus utilisé est le plasma d'argon car ce gaz présente les caractéristiques suivantes :

- Il ne se recombine pas avec les espèces chimiques d'une façon stable
- Il possède un potentiel d'ionisation très élevé (15,6 eV), ce qui permet l'excitation de la majorité des ions.
- Il s'agit d'un gaz rare, il est ainsi difficile à ioniser et peut atteindre une température de plasma très élevée (de l'ordre de 10 000 K).
- Il possède l'avantage d'être un des gaz les plus présents sur Terre. L'hélium pourrait être utilisé, mais possède l'inconvénient d'être cher. Un plasma d'argon (Figure 69) est ainsi constitué d'atomes d'argon, d'ions argon Ar^+ et d'électrons. L'inconvénient de l'argon est que celui-ci a une mauvaise conductibilité thermique, il est donc nécessaire d'avoir une bonne optimisation des paramètres pour permettre d'avoir des conditions très proches entre les mesures des différents échantillons, en particulier au niveau de la température.

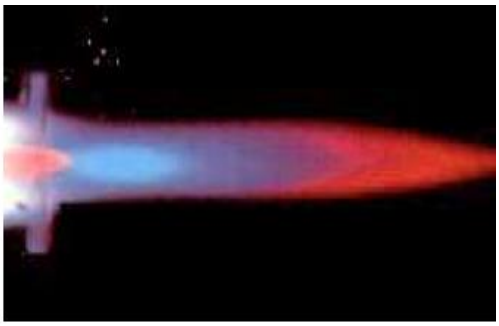


Figure 69. Photographie d'un plasma d'argon.

b) Système d'introduction de l'échantillon

Il est constitué d'un nébuliseur et d'une chambre de nébulisation. Le nébuliseur transforme l'échantillon qui est sous forme liquide en sortie de colonne en un aérosol dense, composé de très fines gouttelettes (1-10 μm). La chambre de nébulisation quant à elle limite la charge en solvant dans le plasma et pour cela homogénéise l'aérosol formé, en limitant la taille des gouttelettes et en réduisant la vitesse de l'aérosol, (Figure 70). Plusieurs interfaces sont connues : les nébuliseurs pneumatiques, microconcentriques (MCN), nébuliseurs à ultrasons et nébuliseurs à injection directe. Ce dernier est utilisé spécifiquement pour l'interface LC-ICP-MS, il est placé à l'intérieur de la torche ICP. L'efficacité de nébulisation peut atteindre 100% et débits sont ~(30-150) μl/min. le MCN est aussi utilisé pour les faibles débits ~(30-150) μl/min avec une très haute efficacité.

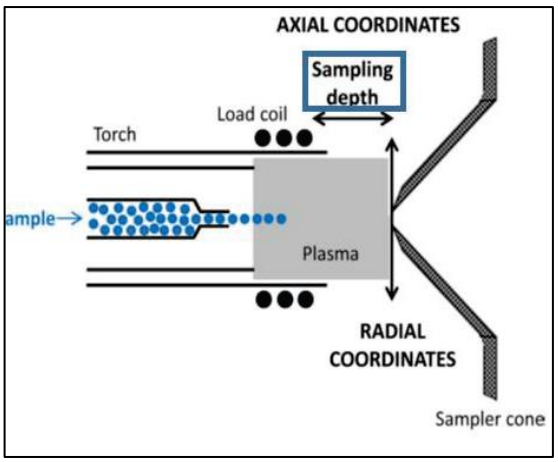


Figure 70. Représentation schématique de l'introduction de l'échantillon dans le plasma

Il existe deux types de chambre de nébulisation : chambre cyclonique et chambre à rotation verticale (figure 71). Les fines gouttelettes et le gaz vecteur sont dirigés vers la torche par le haut de la chambre tandis que les grosses gouttelettes sont dirigées vers le bas et sont drainées sous forme liquide. Seules les gouttelettes de diamètre inférieur à 10 µm passent dans le plasma. Ainsi, seulement 1 % de la solution aspirée passe dans le plasma.

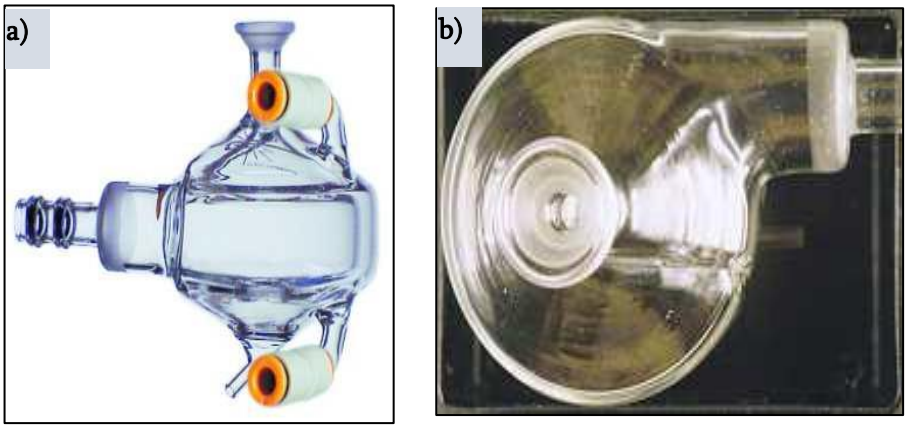


Figure 71. Chambres de nébulisation, Chambre cyclonique : a) et chambre à rotation verticale : b)

c) Système d'atomisation et d'excitation

Le système d'excitation représente tous les phénomènes se produisant dans le plasma. Le nébulisat, obtenu après nébulisation de l'échantillon, subit différents processus (désolvatation, vaporisation, atomisation et éventuellement ionisation) avant l'excitation des atomes ou des ions de l'échantillon (voir Figure 72).

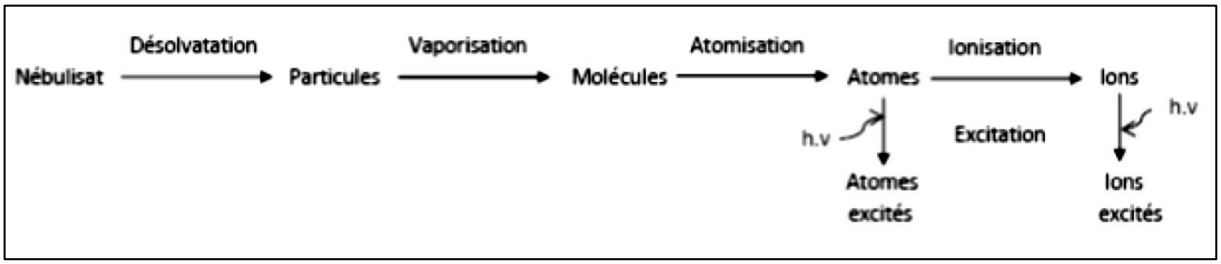


Figure 72. Schéma représentant les différents processus lors de l'atomisation et l'excitation

Lors de la collision d'une particule et d'un atome pendant l'atomisation et l'ionisation, trois processus peuvent se produire, (Réactions (4) à (6) :

- Excitation : $Ar + M \rightarrow Ar + M^*$ ou $Ar^+ + M \rightarrow Ar^+ + M^*$ (4)

- Ionisation : $Ar + M \rightarrow Ar + M^{+}* + e^-$ ou $Ar^+ + M \rightarrow Ar^+ + M^{+}* + e^-$ (5)

- Transfert de charge : $Ar^+ + M \rightarrow Ar + M^+$ (6)

L'excitation et l'ionisation se produisent à haute vitesse de collision, de ce fait dans la partie la plus chaude du plasma, tandis que le transfert de charge a lieu à faible vitesse, de ce fait dans la partie la moins chaude du plasma.

d) Système de détection : SM

Pour le couplage en spectrométrie de masse, les ions du plasma sont extraits à travers une série de cônes vers le spectromètre, généralement un analyseur quadripolaire. Le quadripôle fonctionnant sous vide et à température ambiante. Une interface constituée de deux cônes successifs est nécessaire. Les ions sont séparés en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) et un détecteur reçoit un signal proportionnel à la concentration en ions.

V. Quelques applications

Le domaine d'application de la technique (CLHP-ICP-MS) est très vaste :

- Industrie pharmaceutique
- Analyse élémentaire
- Spéciation métallique
- Quantification des protéines et des biomolécules

Chapitre V : Electrophorèse

I. Introduction

L'électrophorèse constitue la principale technique en biologie moléculaire et en biochimie pour l'analyse et la purification des molécules biologiques chargées comme les protéines et les acides nucléiques. Elle constitue la technique tres puissante et tres facile à utiliser dans la séparation des macromolécules d'intérêt.

Le terme " électrophorèse " est composé :

- Le préfixe " électro" de l'électricité, du grec *èlektron, il* signifie l'ambre jaune et la racine
- La racine :"phorèse" du grec *phoros,* qui signifie " porter d'un côté à l'autre.

L'électrophorèse est définie comme une méthode de séparation, d'analyse (pouvant être qualitative et quantitative), généralement préparative, basée sur le déplacement différentiel de particules, chargées électriquement sous l'influence d'un champ électrique.

II. Principe

Le principe consiste à soumettre un mélange de molécules chargées sous un champ électrique en entraînant leurs migrations en fonction de leurs charge électrique.

D'autres paramètres peuvent influencés fortement le phénomène de migration sont : la forme, la nature du support et les conditions physico-chimiques).

La vitesse de migration des molécules est variable, ce qui conduira à la séparation des différentes molécules.

La migration électrophorétique dépend de plusieurs paramètres :

II.1. Mobilité électrophorétique, (μ)

Elle caractérise la vitesse de migration, elle dépend de la charge et de lap géométrie de la particule. Par application d'un champ électrique **E** sur une particule ayant charge électrique **q**,

, cette dernière sera soumise à une force **F** qui entraînant son déplacement vers l'électrode de signe opposé, (expression V.1) :

$F = q.E$ (V.1)

Pendant sa migration la particule est soumise ainsi sous force de frottement, F_f, (expression (V.2) :

$F_f = \mathbf{6\pi}.\eta.\mathbf{r}.\mathbf{v}$ (V.2)

Avec :

η : Viscosité du milieu

v : Vitesse de migration de la particule

r : Rayon de la particule

À l'équilibre, (Figure 73), où la vitesse de migration est constante, on écrit les relation (V.3) et (V.4):

$\mathbf{Q}.\mathbf{E} = \mathbf{6\pi}.\eta.\mathbf{r}.\mathbf{v}$ (V.3)

D'où :

$\mathbf{v} = \mathbf{Q}.\mathbf{E}/\mathbf{6\pi}.\eta.\mathbf{r}$ (V.4)

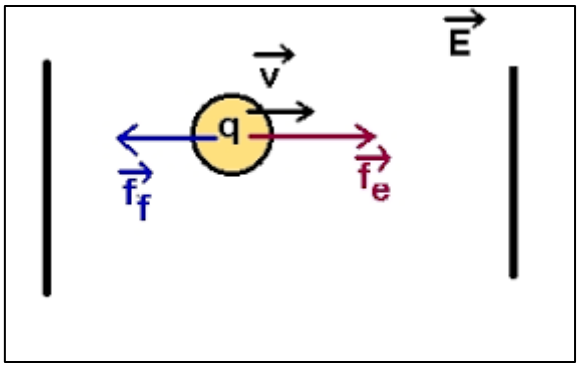


Figure 73 : principe de la mobilité

La mobilité électrophorétique est définie par le rapport de l'expression (V.5) :

$$\mu = \frac{v}{E}$$

D'où l'expression (V.6)

$$\mu = \frac{q}{6.\pi.\eta.r} \quad \text{(V.6)}$$

La mobilité électrophorétique est indépendante du champ électrique, elle est fonction des propriétés de la particule à séparer.

La charge q est fonction du pH isoélectrique de la particule et du pH du solvant, la différence entre ces pH détermine l'intensité et le signe de la charge q :

si pH > pHi	q < 0 : (anion)	Migration vers l'anode
si pH < pHi	q > 0 : (cation)	Migration vers la cathode
si pH = pHi	q = 0	Pas de migration

II.2. Le champ électrique E : exprimé par la relation (V.7)

$$E = v/\mu \qquad (V.7)$$

II.3. Courants liquidiens

a. Courant d'électroendosmose

Le support peut avoir une charge globale nette, ce qui provoque une accélération ou un ralentissement, des particules soit vers l'anode ou la cathode.

b. Courant d'évaporation

Pendant le passage du courant électrique, le support se chauffe ceci entraine l'évaporation de l'eau de la phase liquide, dont il s'établit un courant liquidien à chaque extrémité vers le centre de la bande. Pour délimiter ce phénomène, la cuve est fermée et mise sous refroidissement.

II.4. Durée de migration

Elle influe sur la distance de migration selon la relation (V.8):

$$d = v.\ t \qquad (V.8)$$

Avec :

d: distance parcourue

v = vitesse de migration

t = temps de passage du courant

Dans le cas de l'électrophorèse sur support, la formule précédente n'est pas applicable, vu que les molécules suivent un trajet non linéaire à travers les micro-canaux du support.

II.5. Facteurs liés à la nature du support

La nature du support affecte la migration des particules, ceci par effet d'adsorption et la texture du support.

III. Types d'électrophorèse

III.1. Electrophorèse de zone (ou zonale) : on distingue deux types :

a. Sur couche mince

Les supports les plus utilisés sont sous forme solide : papier ou l'acétate de cellulose ou la silice. Appliquée pour la séparation des AA, peptides, protéines et les nucléotides.

b. Sur gel

Le gel occupe la place des supports poreux. Les gels sont caractérisés par leur propriété hydrophile, semi colloïdale et l'insolubilité dans l'eau, ce qui leur confère une large utilisation (résolution). Les gels utilisés sont d'amidon, d'agarose et de polyacrylamide, (Figure 74).

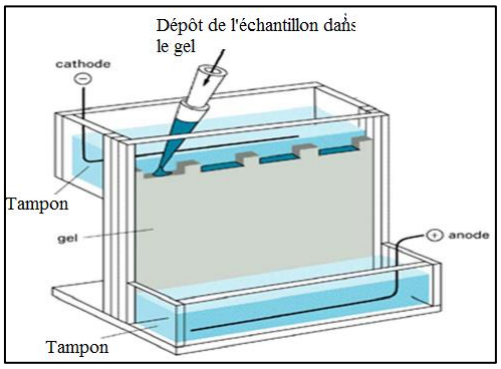


Figure 74. Electrophorèse sur gel

1. Electrophorèse sur gel polyacrylamide (PAGE) : le monomère est le (CH_2=CHCO-NH_2) est polymérisé avec un agent de réticulation : CH_2(NH-CO-CH=CH_2)$_2$) en formant le polymère: Ces gels sont caractérisés par un % d'acrylamide qui varie entre 3 et 30 % (donnant des différents diamètres de pores) ce qui permet d'effectuer une séparation des molécules allant d'un poids moléculaire de 10^6 à 10^4, (Tableau 6). Ainsi, le gel présente une faible capacité d'absorption n'absorbe les UV.

Tableau 6. Pourcentage de polyacrylamide en fonction de l'intervalle de séparation du PM

polyacrylamide	Gamme séparation
7.5 %	40-400 kDa
10 %	20-300 kDa
12 %	15-200 kDa
15 %	6-90 kDa

La méthode est résumée comme suit :

Les échantillons sont déposés dans des puits préformés au sommet du gel et le tampon est le même dans les réservoirs du haut et du bas (pH basique déterminé pour que toutes les protéines aient une même charge -), un courant continu de 100 à 200 volts parcourt le gel pendant la durée de migration.

- les protéines migreront vers l'anode (+) selon leur ratio charge/masse.
- après migration, le gel est retiré et les bandes de protéine sont visualisées par révélation.

2. SDS-PAGE : très utilisée pour la séparation et la détermination des poids moléculaire des protéines.

Le SDS : Dodécylsulfate de sodium ou laurylsulafate de sodium est un détergent anionique qui se lie fortement aux protéines et les dénature : Le SDS forme une micelle dont la charge est α à la longueur de la chaine peptidique, la forte charge négative globale apportée par le SDS masque la charge intrinsèque des protéines, par conséquence le rapport charge/masse sera le même pour toutes les protéines de même masse et la séparation électrophorétique du gel avec du SDS dépendra uniquement du phénomène de gel-filtration par les pores du gel. Il a été démontré qu'on peut obtenir une relation linéaire entre la mobilité électrophorétique et le logarithme du poids moléculaire (Figure 75).

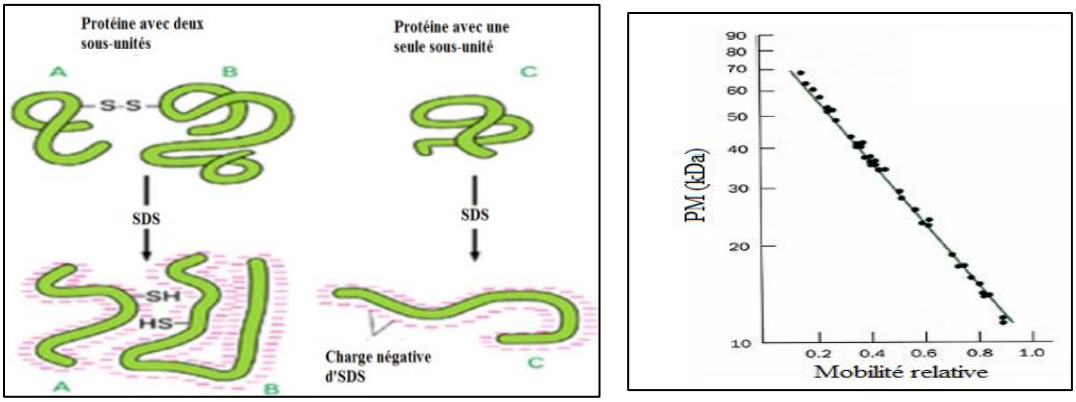


Figure 75 Électrophorèse en SDS-page : détermination de la MM

III.2. Electrophorèse de focalisation isoélectrique

Les molécules biologiques amphotères sont séparées par un gradient de pH où la région anodique à un pH inférieur à la région cathodique. Lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique et au-dessous de leur point isoélectrique les analytes sont chargés positivement et sont migrés vers la cathode où ils rencontrent un milieu dont à pH donné ils se comportent comme des zwitterion : arrêt de migration : formation des bandes pour les différents pHi.

Sous l'effet d'un voltage important (~1kV) les bandes stationnaires formées par les analytes se focalisent pendant une durée de qq dizaines d'heures, (Figure 76).

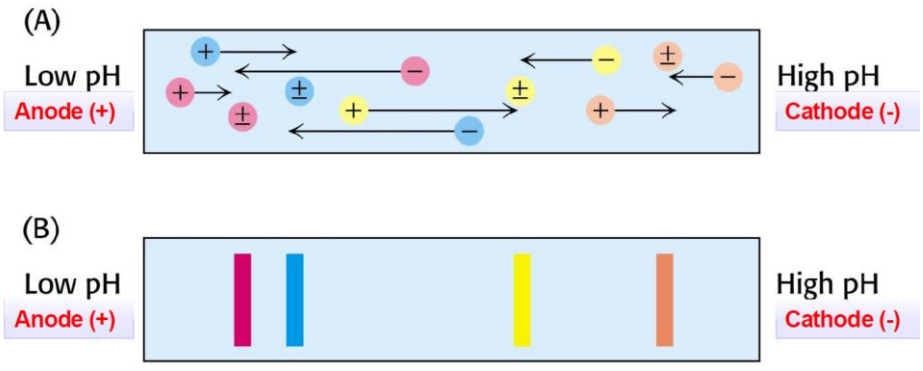


Figure 76. Focalisation isoélectrique

Références bibliographiques

[1] M. Bernardin, « Potentiel du couplage de la chromatographie en phase liquide bidimensionnelle avec l'ICP-MS/MS pour l'analyse de matrices organiques complexes », Thèse De Doctorat, Université De Lyon, 2019.

[2] Analyses dans l'environnement : méthodologies, Technique de l'ingénieur, 42382 | 3ème édition, TI630.

[3] F. Rouessac, A. Rouessac, D. Cruché, « analyse chimique, Méthodes et techniques Instrumentales modernes », 6e édition, Dunod, Paris, 2004.

[4] S.M. Khopkar, « Basis concepts of analytical chemistry", New age international limites, publisher, 1998.

[5] R. Bock, R. Niebner, "Separation techniques in analytical chemistry », De Gruyter Textbook, 2023.

[6] HandBook of Methods and instrumentation in separation science, 1st edition, Colin Poole, 2009.

[7] HandBook in separation science: Liquid chromatography, Volume 1, Fundamentals and instrumentation, 3rd edition, Elsevier, 2023.