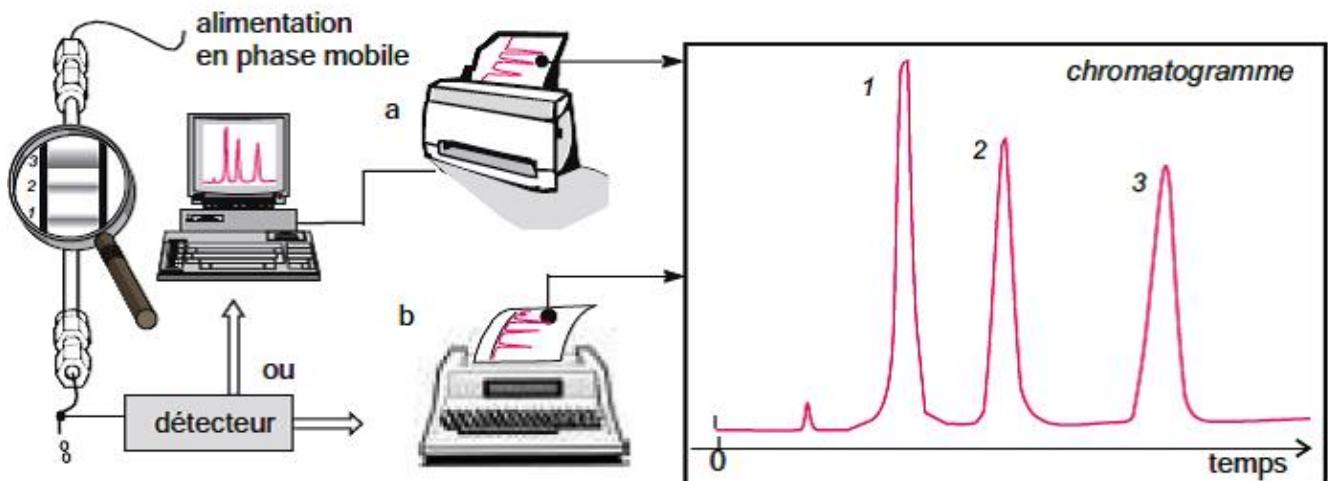




Université Mohamed Seddik Ben Yahia-Jijel  
Faculté des Sciences Exactes et Informatique  
Département de chimie

## Polycopié du Cours Séparation en chimie analytique

Public cible: 3<sup>ème</sup> année chimie organique



Présenté par Dr. BOUTAOUI Nassima

Année: 2020/2021

**Intitulé du Licence:** Licence chimie organique

**Intitulé du cours:** Séparation en chimie analytique

**Semestre:** 05

**Crédit:** 6

**Coefficient:** 3

**Contenu de la matière:**

### **Méthodes de séparation en chimie analytique**

- Généralités sur les méthodes de séparation
- Séparation par rupture de phase
- Osmose et dialyse
- Extraction par un solvant non miscible
- Séparation à contre-courant
- Extraction par un solide
- Séparation par changement d'état

### **Séparation par Chromatographie**

- Notion de base
- Chromatographie CCM.
- Chromatographie sur papier.
- Chromatographie sur colonne par gravité.
- Chromatographie HPLC.
- Chromatographie CPG.
- Chromatographie ionique
- Chromatographie d'exclusion stérique
- Chromatographie d'interactions hydrophobes (notions générales)
- Chromatographie en phase supercritique

## SOMMAIRE

### PARTIE I : METHODES DE SEPARATION EN CHIMIE ANALYTIQUE

<b>1. Généralités sur les méthodes de séparation .....</b>	1
<b>2. Filtration .....</b>	2
2.1. Définition .....	2
2.2. Matériel de filtration.....	2
2.2.1. Les produits minéraux.....	2
2.2.2. Les matières organiques .....	2
2.2.3. Les filtres membranes.....	2
2.2.4. Les entonnoirs.....	3
2.3. Techniques de filtration.....	3
2.3.1. Selon la manière de réaliser le gradient de pression.....	3
2.3.2. Selon la taille des particules retenues.....	4
<b>3. Centrifugation .....</b>	5
3.1. Définition.....	5
3.2. Principe.....	5
3.3. Matériel de centrifugation.....	5
3.4. Type de centrifugeuses .....	6
<b>4. Séparation par rupture de phase.....</b>	7
4.1. Cas d'un mélange solide.....	7
4.2. Cas d'une solution liquide.....	7
4.2.1. Elimination du solvant .....	7
4.2.2. Diminution du pouvoir solvant.....	7
4.2.3. Relargage.....	7
<b>5. Séparation par membrane.....</b>	8
5.1. Définition.....	8
5.2. L'osmose.....	8
5.3. Osmose et pression osmotique.....	9
5.4. Dialyse.....	10
<b>6. Extraction .....</b>	10
6.1. Extraction par un solvant non miscible (extraction liquide-liquide).....	10
6.1.1. Principe.....	10
6.1.2. Expression du rendement.....	11
6.1.3. Processus d'extraction par solvant: .....	11
6.1.4. Le choix du solvant d'extraction.....	12

<b>6.2. Extraction solide-liquide.....</b>	<b>12</b>
6.2.1. Définition.....	12
6.2.2. Techniques de dissolution .....	12
6.2.3. Principes des techniques de dissolution .....	12
6.2.4. L'extracteur de Soxhlet.....	13
6.2.5. Extraction discontinue .....	14
6.2.6. Extraction continue .....	14
6.2.7. Extraction par hydrodistillation .....	15
<b>7. Séparation à contre-courant.....</b>	<b>15</b>
7.1. Définition.....	15
7.2. Appareil de CRAIG .....	16
7.2.1. Description.....	16
7.2.2. Fonctionnement.....	17
<b>8. Extraction par un solide.....</b>	<b>17</b>
8.1. Définition.....	17
8.2. Principe.....	18
8.3. Processus d'extraction.....	18
8.4. Choix de l'adsorbant SPE.....	18
8.5. Mécanisme mis-en jeux.....	19
8.5.1. L'adsorption.....	19
8.5.2. Partage.....	19
8.5.3. L'échange d'ions.....	19
8.6. Les conditionnements.....	20
<b>9. Séparation par changement d'état.....</b>	<b>22</b>
9.1. Sublimation.....	22
9.2. Distillation.....	22
9.2.1. Distillation simple.....	23
9.2.2. Distillation fractionnée .....	24
<b>EXERCICES D'APPLICATION .....</b>	<b>26</b>

## PARTIE II : SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE

<b>1. Notion de base.....</b>	<b>31</b>
1.1. Définition.....	31
1.2. Principe de la séparation.....	31
1.3. Classification des méthodes chromatographiques.....	31
1.3.1. Classification selon la nature physique des phases.....	31

1.3.2. Classification selon le phénomène mis en œuvre.....	32
1.3.3. Classification selon le procédé opératoire.....	32
1.4. Chromatogramme.....	32
1.5. Pic d'élution parfait.....	33
1.6. Les principaux paramètres.....	33
1.6.1. Notion de temps.....	33
1.6.2. Efficacité N.....	34
1.6.3. La hauteur équivalente à un plateau théorique H.....	35
1.6.4. Volume d'élution.....	35
1.6.5. Volume mort.....	35
1.6.6. Volume de phase stationnaire.....	35
1.6.7. Rapport de phase .....	35
1.6.8. Facteur de rétention .....	35
1.6.9. Sélectivité $\alpha$ .....	35
1.6.10. Facteur de résolution.....	36
1.7. Effet de la vitesse d'élution sur l'efficacité de la colonne; Equation de Van Deemter ....	36
1.8. Optimisation d'une analyse chromatographique.....	38
<b>2. La chromatographie planaire.....</b>	<b>39</b>
2.1. Chromatographie sur couche mince.....	39
2.1.1. Définition.....	39
2.1.2. Mise en œuvre de la chromatographie planaire.....	39
2.1.3. Paramètres de séparation et de rétention.....	41
2.2.Chromatographie sur papier.....	42
2.2.1. Définition .....	42
2.2.2. Principe .....	42
2.2.3. Appareillage.....	43
2.2.4. Techniques de développement.....	43
2.3. Application .....	43
<b>3. Chromatographie sur colonne par gravité.....</b>	<b>43</b>
3.1. Définition.....	43
3.2. Remplissage de la colonne.....	44
3.2.1. Remplissage par voie sèche.....	44
3.2.2. Remplissage par voie humide.....	44
3.3.Mise en œuvre de la chromatographie sur colonne.....	44
<b>4. Chromatographie Liquide à haute performance.....</b>	<b>45</b>
4.1. Définition.....	45

4.2. Appareillage .....	45
4.3. Etude détaillée des éléments d'un appareil HPLC .....	46
4.3.1. Réservoir de solvant (éluant) .....	46
4.3.2. Pompe.....	46
4.3.3. Vanne d'injection .....	47
4.3.4. Colonne .....	48
4.3.5. Phase stationnaire .....	48
4.3.6. Phase mobile.....	49
4.4. DéTECTEURS .....	50
4.5. Quelques applications.....	51
<b>5. Chromatographie en phase gazeuse GC.....</b>	<b>51</b>
5.1. Définition.....	51
5.2. Description de l'appareil CPG.....	52
5.3. Gaz vecteur.....	53
5.4. Injecteur.....	53
5.5. Types des injecteurs.....	54
5.6. Enceinte thermostatée.....	56
5.7. Colonnes et types des colonnes.....	56
5.8. Phases stationnaires.....	57
5.9. Principaux détecteurs.....	59
5.10. Indice de Kovats.....	61
5.11. Constante de McReynolds des phases stationnaires.....	62
<b>6. Chromatographie ionique .....</b>	<b>63</b>
6.1. Définition.....	63
6.2. Schéma de principe d'une installation de chromatographie ionique.....	63
6.3. Phases mobiles.....	63
6.4. Phases stationnaires.....	64
6.5. Principe de séparation.....	64
6.6. Détecteurs à conductivité.....	66
6.7. Le suppresseur d'ions de l'électrolyte.....	66
6.8. Séparation des acides aminés.....	67
<b>7. Chromatographie d'exclusion stérique.....</b>	<b>69</b>
7.1. Définition.....	69
7.2. Principe.....	69
7.3. La théorie de la CES.....	70
7.4. Phases stationnaires.....	71

7.5. Exemples de gels de filtration.....	71
7.6. Instrumentation.....	72
7.7. Applications de la CES.....	73
<b>8. Chromatographie en phase supercritique.....</b>	<b>73</b>
8.1. Définition.....	73
8.2. Rappel sur les fluides supercritiques.....	73
8.3. Appareillage.....	74
8.4. Phases stationnaires.....	75
8.5. Phases mobiles.....	75
8.6. DéTECTEURS.....	75
8.7. Application.....	76
<b>EXERCICES D'APPLICATION.....</b>	<b>77</b>
Références bibliographiques.....	



Les séparations sont extrêmement importantes lors des synthèses. En chimie industrielle, dans les sciences biomédicales et pour les analyses chimiques, tel que la raffinerie de pétrole. La première étape d'un processus de raffinage est la séparation du pétrole en fraction sur base de leur point d'ébullition dans de grandes tours de distillation. On introduit le pétrole dans un grand récipient où ce mélange est chauffé. Les composés qui ont le point d'ébullition le plus bas se vaporisent les premiers. La vapeur monte dans la grande tour de distillation où elle se condense en un liquide plus pur. En réglant les températures, on peut contrôler les domaines de point d'ébullition des fractions condensées.

Les séparations analytiques s'effectuent à une échelle de laboratoire beaucoup plus petite que cette distillation à l'échelle industrielle. Les méthodes de séparation introduites dans cet ouvrage comprennent la précipitation, la distillation, l'extraction, l'échange d'ions et diverses techniques chromatographiques.

En général, le but d'une séparation analytique est d'éliminer ou de réduire les interférences pour que l'on puisse obtenir des informations analytiques quantitatives sur les mélanges complexes.

Les séparations peuvent aussi permettre d'identifier des constituants isolés si l'on fait de corrélations appropriées ou si l'on utilise une technique de mesure sensible à la structure, comme la spectrométrie de masse avec des techniques telle que la chromatographie, on obtient une information quantitative quasi simultanément à la séparation.

La chromatographie est une méthode largement utilisée pour la séparation, l'identification et le dosage des constituants chimiques dans des mélanges complexes. Aucune autre méthode de séparation n'est aussi puissante et d'application aussi générale. C'est une méthode analytique basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire, l'autre mobile.

Les méthodes chromatographiques peuvent être classées en fonction de la nature physique des deux phases. Les plus courantes sont la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et la chromatographie liquide (CL). La chromatographie liquide sur colonne classique a été rattrapée par la chromatographie sur colonne moderne ou à haute performance CLHP (HPLC en anglais). Selon la nature de la phase stationnaire, elle peut être d'adsorption, de partage, d'échange d'ions ou d'exclusion.

La chromatographie a beaucoup évolué. Elle est utilisée pour analyser des substances, contrôler une réaction chimique, séparer des mélanges et purifier des substances obtenues par voie synthétique ou extraction phytochimique.

Dans cet ouvrage, j'ai présenté dans la première partie les principales méthodes de séparation, les appareillages susceptibles d'intéresser un chimiste ou un chercheur.

La deuxième partie renferme les différentes méthodes chromatographiques, les appareillages ainsi que les applications pratiques.

Ce cours est surtout destiné aux étudiants préparant une licence en chimie organique ou pharmaceutique. Ils trouveront à la fin de chaque partie une série d'exercices de révision corrigés pour le but d'améliorer la compréhension des différentes applications des techniques étudiées.

L'auteur

Dr. Nassima BOUTAOUI

**PARTIE 1**

**SEPARATION EN CHIMIE  
ANALYTIQUE**

## 1. Généralités sur les méthodes de séparation

Les méthodes de séparation analytique peuvent être classées en deux catégories :

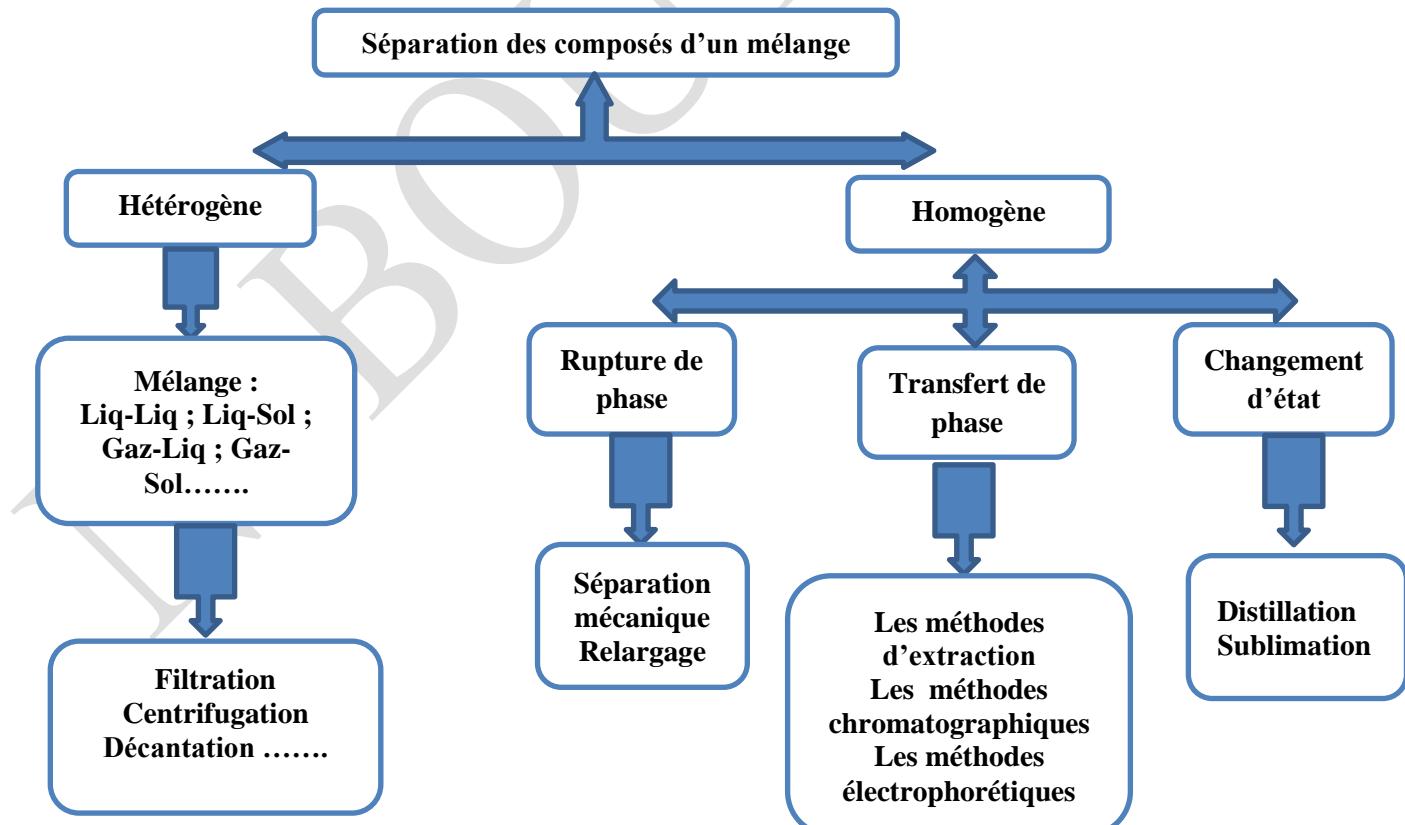
### 1.1. Séparation macroscopique

Ces méthodes de séparation à grande échelle permettent de séparer un constituant d'un autre ; elles regroupent la filtration, centrifugation, les méthodes impliquant des effets de la température (distillation, évaporation ou rupture de phase) et de solubilité (extraction par solvant, cristallisation et précipitation), l'échange d'ions, la séparation membranaire (l'osmose et dialyse). Un nombre de ces techniques entrent dans la catégorie des manipulations classiques de laboratoire.

### 1.2. Séparation microscopique

Les plus courantes de ces méthodes sont la chromatographie (CPG, CHLP, CCM, CPS) et celles basées sur l'électrophorèse. Pour ces méthodes, les quantités d'analyse requises sont souvent de l'ordre du mg (ou moins) et sont trop faible pour être physiquement observables.

Une autre classification consiste à regrouper les méthodes de séparation selon la nature du mélange initiale comme le montre l'histogramme suivant :



**Figure I.1.** Séparation des composés d'un mélange.

## 2. Filtration

### 2.1. Définition

La filtration est un procédé de séparation permettant de séparer les constituants d'un mélange qui possède une phase liquide et une phase solide au travers d'un milieu poreux. C'est une technique très utilisée que ce soit dans le domaine de l'agro-alimentaire, de la pharmacie et de la chimie. L'utilisation d'un filtre permet de retenir les particules du mélange hétérogène qui sont plus grosses que les trous du filtre (porosité). Le liquide ayant subi la filtration se nomme filtrat, et ce que le filtre retient se nomme un résidu.

### 2.2. Matériel de filtration

Ce sont des substances fibreuses ou poreuses minérales ou organiques.

#### 2.2.1 Les produits minéraux

Substances fibreuses ou poreuses et sont des dérivés de la silice:

- coton de verre
- verre fritté.

#### 2.2.2. Les matières organiques

Substances poreuses, et sont des produits à base de cellulose:

- papier filtre
- pâte de cellulose
- polymères organiques: membranes filtrantes, disques en polymère de porosité parfaitement définie.

#### 2.2.3. Les filtres membranes (écrans ou de surface)

Les plus utilisés sont les membranes millipores. 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 (figure I.2). Le diamètre des pores est faible, et varie de 5 à 35 nm pour l'ultrafiltration et de 0.1 à 8 µm pour la microfiltration.



**Figure I.2.** La membrane millipore.

#### 2.2.4. Les entonnoirs

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

### 2.3. Techniques de filtration

#### 2.3.1. Selon la manière de réaliser le gradient de pression

##### ❖ Filtration gravimétrique (filtration par gravité)

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 I.3).

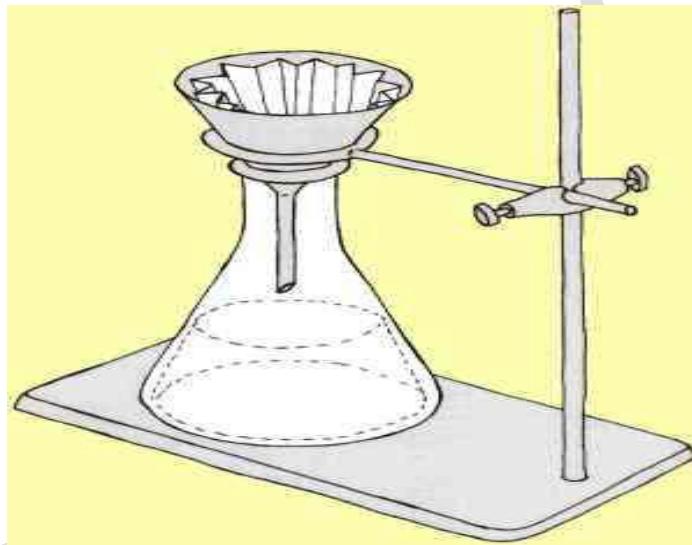
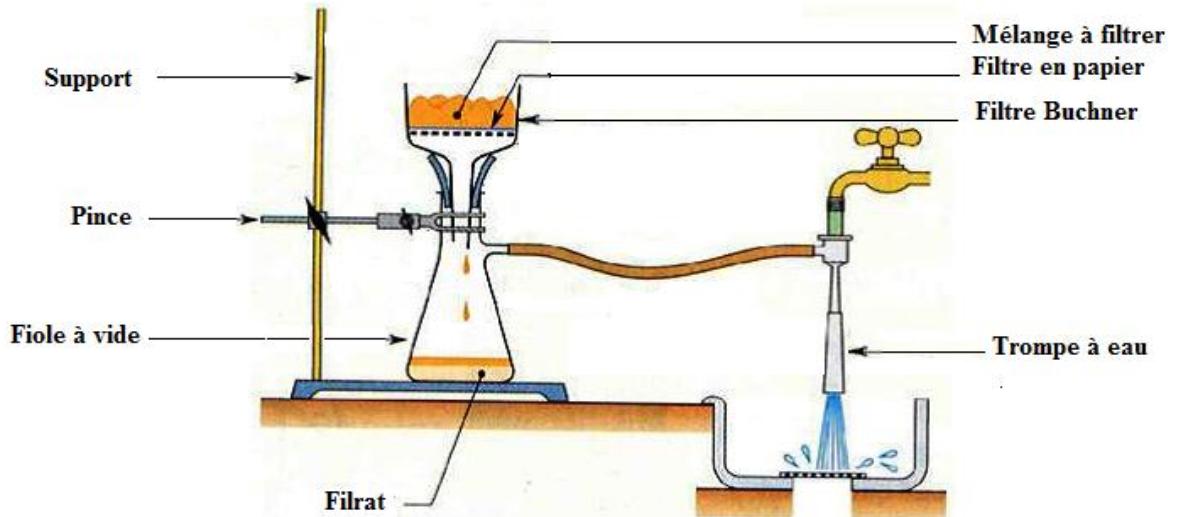


Figure I.3. La filtration par gravité.

##### ❖ Filtration sous vide

La vitesse de filtration est augmentée par la création d'une dépression en aval du matériau filtrant (figure I.4). C'est le mode de filtration utilisé d'une manière courante pour les verres frittés et les membranes filtrantes. Des entonnoirs spéciaux (Büchner) adaptés sur une fiole à succion, dans laquelle on crée une dépression, sont utilisés. L'entonnoir est adapté sur la fiole par l'intermédiaire d'un cône en caoutchouc, qui collera à la fiole et l'entonnoir lorsque la dépression est établie (figure I.4).



**Figure I.4.** La filtration sous vide.

#### ❖ Filtration sous pression

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 I.5). 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.



**Figure I.5.** La filtration sous pression.

#### 2.3.2. Selon la taille des particules retenues

- Filtration clarifiante:  $\Phi > 450 \mu\text{m}$
- Microfiltration :  $10 < \Phi < 0,01 \mu\text{m}$
- Ultrafiltration :  $0,01 < \Phi < 0,001 \mu\text{m}$

- Osmose inverse:  $0,001 < \Phi < 0,0001 \mu\text{m}$
- Filtration stérilisante = rétention des micro-organismes :  $\Phi > 0,22 \mu\text{m}$

### 3. Centrifugation

#### 3.1. Définition

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

L'ultracentrifugation utilise des vitesses de rotation encore plus grandes (allant jusqu'à 75000 tours par minute) et permet la sédimentation de particules ultramicroscopiques.

#### 3.2. 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 à deux forces:

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

Pour une vitesse de rotation donnée, chaque rotor a une force relative de centrifugation en  $x.g$  (force de gravité relative ou accélération) qui peut être exprimée en vitesse de rotation en rotations par minute selon la formule mathématique de conversion. Celle-ci est:

$$g = 1.119 \times 10^{-5} \times r \times N^2$$

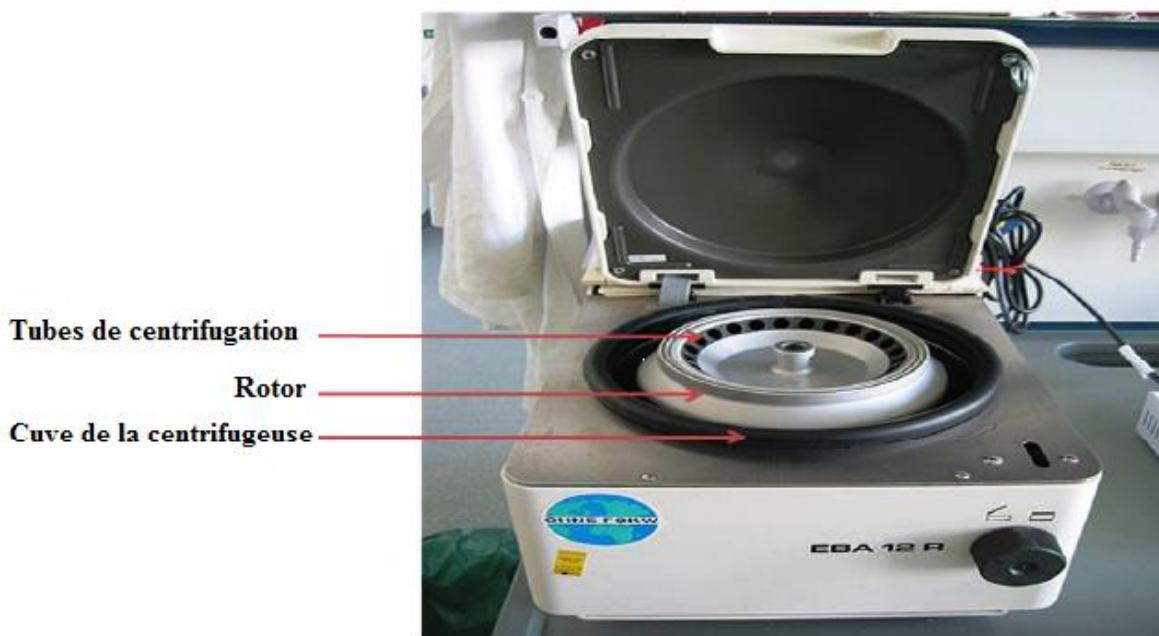
Où  $g$  est la force relative de centrifugation,  $r$  est le rayon de rotation du rotor (en cm) et  $N$  (rotations par minute: rpm) exprime la vitesse de rotation.

#### 3.3. Matériel de centrifugation

La centrifugeuse est l'appareil utilisé pour la centrifugation. La centrifugeuse est constituée d'un axe de rotation enfermé dans une chambre de centrifugation.

A l'exception des centrifugeuses de paillasse dont la vitesse de rotation et le temps d'utilisation sont relativement limités, il est nécessaire d'empêcher l'échauffement des échantillons. Pour cela, la chambre de la centrifugeuse doit être réfrigérée (figure I.6).

Les échantillons à centrifuger doivent être équilibrés deux à deux. Chaque couple doit être placé symétriquement par rapport à l'axe de rotation.



**Figure I.6.** Modèle d'une centrifugeuse.

### 3.4. Type de centrifugeuses

La force du moteur qui le fait tourner constitue la principale limite qui détermine la vitesse de rotation du rotor. Plus le rotor est lourd et volumineux, plus l'effort que doit fournir le moteur est grand. Selon les besoins expérimentaux (accélérations, volume du matériel à centrifuger, la température de travail), plusieurs types de centrifugeuse ont été développés.

**Tableau I.1.** Types de centrifugeuse.

Types de centrifugeuses	Accélération	contenance	Système de réfrigération
Centrifugeuse de table	1000 à 3000 g	Petits volumes 10 ml	±
Centrifugeuse au sol	20 000 g	Gros volumes 4 ou 6 bouteilles de 250 ml	+
ultracentrifugeuses	300 000 g	Dizaine de tube de 40 ml	+
Micro-centrifugeuses	12-15 000 g	Micro volumes Micro tubes de 1,5 ml	+

(+), (-) : avec ou sans réfrigérant.

## 4. Séparation par rupture de phase

### 4.1. Cas d'un mélange solide

On peut utiliser la séparation mécanique des cristaux selon leur couleur, leur fluorescence, ou leur forme. Il est plus facile de réaliser une séparation fondée sur la différence de densité des différents constituants (exp : filtration).

### 4.2. Cas d'une solution liquide

#### 4.2.1. Elimination du solvant

On réalise la concentration de la solution par évaporation du solvant, le soluté précipite.

- **Concentration à la pression atmosphérique**

Nécessite une élévation importante de température et entraîne ainsi le risque d'oxydation ou la dégradation des substances fragiles.

- **Concentration sous pression réduite**

À l'abri de l'air et à température plus basse que précédemment. On utilise généralement un évaporateur rotatif.

#### 4.2.2. Diminution du pouvoir solvant

Elle peut être réalisée de plusieurs manières:

- **Variation de température**

Le cas le plus fréquent correspond à la technique bien connue de la recristallisation, une dissolution à chaud dans un solvant bien étudié suivie d'un lent retour à la température ordinaire entraîne l'apparition de cristaux.

- **Addition d'un non-solvant**

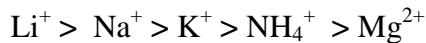
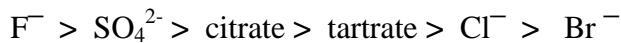
L'apport d'un second liquide miscible au premier solvant mais n'ayant pratiquement aucun pouvoir de dissolution vis-à-vis des substances existant dans la solution initiale peut entraîner une précipitation (saturation ou solubilité préférentielle).

Cette méthode ne permet pas d'obtenir des cristaux purs que la précédente car la diminution du pouvoir solvant entraîne la précipitation des impuretés.

#### 4.2.3. Relargage

Cette méthode consiste à ajouter à la solution, un nouveau soluté qui entraîne la séparation d'un solide ou d'un liquide. Le composé relargant est généralement un sel minéral (saturation par un sel minéral).

Les agents relargants doivent être solubles dans le solvant (généralement dans l'eau). On peut classer d'après leur pouvoir relargant décroissant les différents anions et cations, à titre d'exemple:



## 5. Séparation par membrane

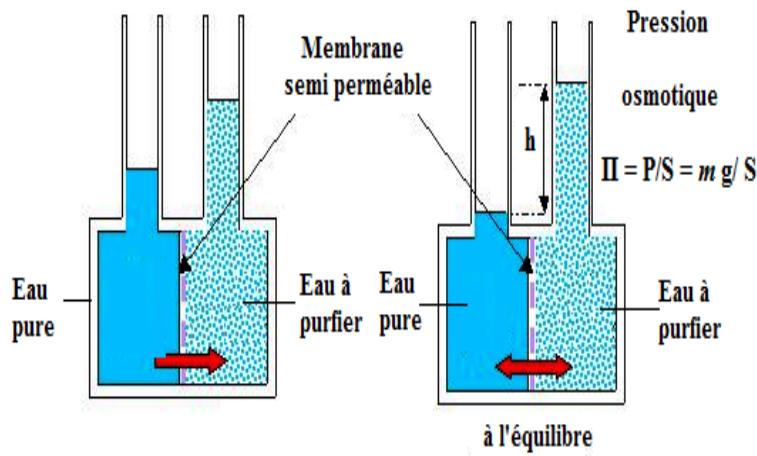
### 5.1. Définition

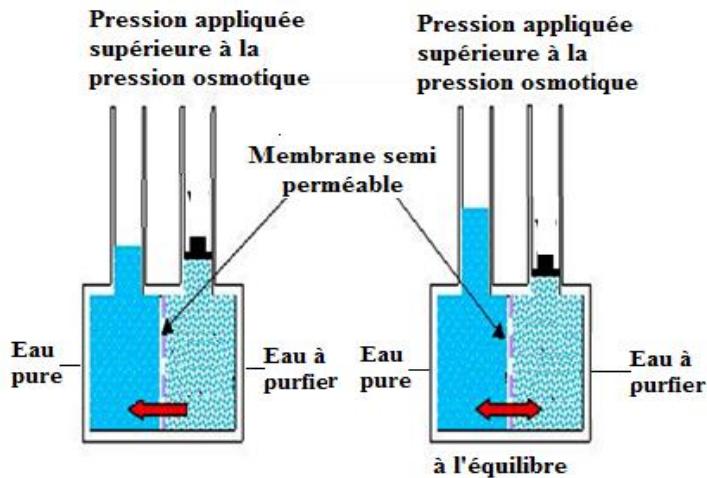
Pour réaliser un transfert de phase entre une solution initiale et un second solvant, il faut qu'il y ait possibilité de séparer les deux phases. Si les deux solvants ne sont pas miscibles, il n'y a pas de problème de séparation. Mais si le second solvant est potentiellement miscible à la solution, il faut réaliser une séparation entre les deux à l'aide d'une membrane poreuse.

Une membrane est une barrière matérielle (film polymère, céramique ou, rarement, métallique) qui permet le passage sélectif de certains composés du fluide à traiter, sous l'action d'une force agissante: gradient de pression, de potentiel électrique ou de potentiel chimique.

### 5.2. L'osmose

L'osmose, peu importe le sens qu'on lui donne, se résume à l'échange d'un solvant à travers des membranes semi-perméables (Voir cours 2<sup>ème</sup> chimie) (figure I.7).





**Figure I.7.** Principe d'osmose et d'osmose inverse.

L'osmose inverse, la mieux connue, est définie comme le transfert opposé à l'osmose naturelle, obtenu en exerçant sur la solution concentrée une pression supérieure à sa pression osmotique (figure I.7).

### 5.3. Osmose et pression osmotique

On définit donc la pression osmotique comme la pression minimum qu'il faut exercer pour empêcher le passage d'un solvant d'une solution moins concentrée à une solution plus concentrée au travers d'une membrane semi-perméable.

$$\Pi = P/S = m \text{ g/S}$$

Où  $m$ : est la masse et  $g$  l'accélération de la pesanteur

$$m = V \times d$$

$d$  est la densité et  $V$  l'augmentation de volume, correspondant au produit de la hauteur  $h$  par la surface  $S$  :

$$V = h \times S$$

Donc :

$$\Pi = h \times d \times g$$

Van't Hoff a montré que  $\Pi$  provoquée par une substance dissoute dans un solvant ou elle existe sous forme de solution, présente la même valeur que  $\Pi$  que prendrait cette même substance si elle se trouvait à l'état gazeux et à la même température:

$$\Pi V = n R T$$

$n$  : le nombre de moles de soluté contenu dans le volume  $V$ .

Dans le cas d'un gaz, on remplace  $V$  par  $V'$  (le volume occupé par une mole de gaz)

$$\Pi V' = R T$$

Il est donc possible de déterminer la molarité du soluté à partir de  $V'$  :  $C = \frac{1 \text{ mole}}{V'}$

On obtient à la fin :

$$\Pi = R T C$$

Une molécule introduite au départ dans le solvant à la concentration  $C$ , qui se dissocie en un nombre  $v$  d'ions, provoque une élévation de la pression osmotique qui tend vers:

$$\Pi = R T v C$$

## 5.4. Dialyse

Dialyse est un procédé de séparation par membrane des molécules ou des ions en solution au même titre que l'osmose inverse. Ces techniques diffèrent par la force utilisée pour que les espèces chimiques ou les ions puissent traverser la membrane semi-perméable, c'est-à-dire la barrière relativement mince séparant deux milieux liquides. Ces forces sont :

- Un gradient de pression dans l'osmose inverse, l'ultrafiltration ou encore un gradient de pression partielle lors de la diffusion des gaz à travers une membrane poreuse ;
- Un gradient de potentiel électrique dans l'électrodialyse ;
- Et enfin un gradient de concentration dans la dialyse.

L'avantage de cette dernière réside dans le fait que les séparations se font dans la majeure partie des cas à température ambiante, respectant ainsi les substances thermolabiles.

Un rein artificiel efficace est un excellent exemple de l'application de la dialyse.

## 6. Extraction

### 6.1. Extraction par un solvant non miscible (extraction liquide-liquide)

On parle d'extraction liquide-liquide (LLE), le principe est fondé sur la distribution d'un soluté donné entre les deux solvants en fonction de sa solubilité dans chacun d'entre eux.

#### 6.1.1. Principe

La distribution d'un soluté entre deux phases non miscible est un phénomène d'équilibre qui est régi par la loi de distribution. Lorsqu'un soluté A se distribue entre une solution aqueuse et une phase organique.

A toute température on a :

$$K = \frac{C_A \Phi_{org}}{C_A \Phi_{aq}}$$

La constante d'équilibre K est appelée la constante de distribution ou coefficient de partage. Plus la constante d'équilibre est grande meilleur est l'extraction.

$K = \text{cte}$  : on dit alors que la distribution du soluté entre les deux solvants est régulière.

Le coefficient de partage dépend de la solubilité du soluté S dans les deux solvants A et B.

On peut ainsi écrire :

$$K = \frac{S_B}{S_A}$$

Le caractère constant de K s'exprime par la loi de **Berthelot-Jungfleisch** : « Quelle que soient les valeurs de la solubilité d'un corps à partager entre deux solvants non miscibles et quels que soient les volumes de ces solvants mis en œuvre, le corps se répartit à l'équilibre de telle sorte que les concentrations soient dans un rapport constant ».

### 6.1.2. Expression du rendement

Il correspond au rapport entre la quantité totale de soluté extraite par le solvant B et la quantité initiale en soluté dans le solvant A. Le rendement est donc :

$$\rho = \frac{\Sigma Q_B}{Q_A}$$

$\Sigma Q_B$  : La somme de toutes les quantités  $Q_B$  extraites lors de chaque équilibre.

### 6.1.3. Processus d'extraction par solvant:

L'extraction liquide-liquide est la technique la plus largement utilisée pour les séparations macroscopiques qui nécessitent des quantités appréciables d'analyte. Elle implique un partage de l'analyte entre deux phases liquides non miscibles, habituellement par agitation dans une ampoule à décanter (figure I.8).

La sélectivité de la séparation et son efficacité dépendent du choix des deux phases et de certains de facteurs examinés ci-dessous.

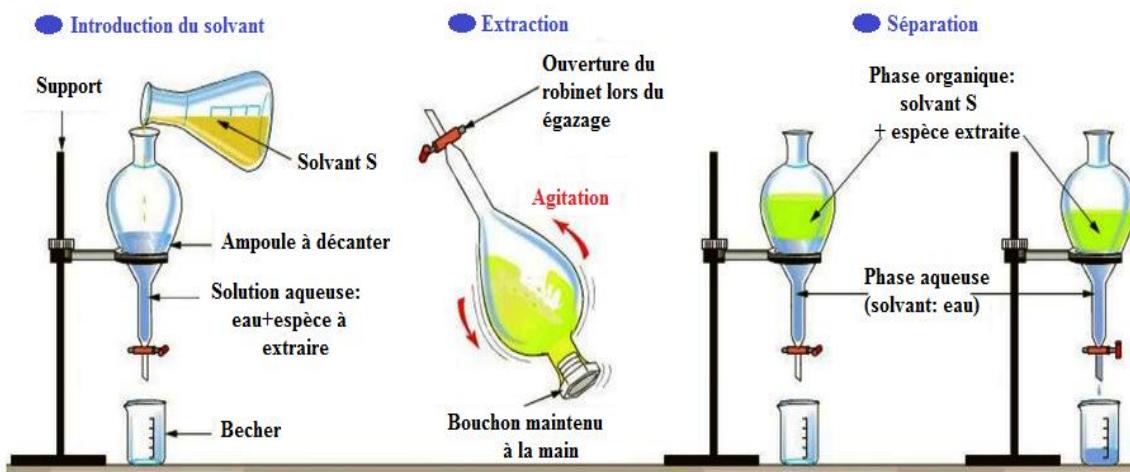


Figure I.8 : Processus d'extraction liquide-liquide.

#### 6.1.4. Le choix du solvant d'extraction

Le solvant d'extraction doit :

- Etre non miscible avec le diluant du soluté.
- Avoir une densité différente à celle du premier.
- Etre non visqueux pour éviter la formation d'une émulsion.
- Avoir une grande solubilité avec le soluté.
- Présenter une bonne tension de vapeur (volatil).
- Etre pur que possible
- Etre le moins toxique possible.
- Avoir une polarité voisine de celle du soluté (analyte).

### 6.2. Extraction solide-liquide

#### 6.2.1. Définition

Lorsqu'une phase solide initiale, contenant plusieurs espèces chimiques, est mise en présence d'un solvant judicieusement choisi, il est possible de réaliser une dissolution selective d'un certain nombre de principes.

Le plus souvent, il est impossible d'obtenir la séparation d'un seul constituant du mélange, et ceci quel que soit le solvant utilisé.

#### 6.2.2. Techniques de dissolution

Il faut avant tout réduire le prélèvement en fines particules ce qui favorise l'action du solvant qui est logiquement fonction de la surface de contact.

Il est possible de procéder en continu ou effectuer des phases successives d'exactions suivies de filtration ou de centrifugation.

#### 6.2.3. Principes des techniques de dissolution

Les principes des techniques de dissolution sont les suivants:

##### La variation du pouvoir solvant

- La dissolution fractionnée: Consiste à utiliser initialement des liquides à faible pouvoir solvant puis à augmenter progressivement la capacité de dissolution par l'emploi des solvants de plus en plus actifs.

- Le gradient de dissolution: Consiste à utiliser de mélanges de solvants.

##### La limitation du volume de solvant

Afin d'éviter l'utilisation de grands volumes de solvants, il faut réaliser l'extraction et la concentration dans le même appareil. En règle générale, un solide ne se laissera pas traverser

par un liquide. Il est donc nécessaire de réaliser plusieurs extractions successives par utilisation d'un extracteur de Soxhlet, ou alors sa variante plus économique.

#### 6.2.4. L'extracteur de Soxhlet

##### a. Définition

Est une pièce de verrerie permettant d'effectuer une extraction solide liquide avec une grande efficacité. L'appareil porte le nom de son inventeur: Franz von Soxhlet . 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 fraîche 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.

##### b. Principe

L'appareil est constitué de:

- Un ballon contenant une réserve de solvant.
- Un appareil (l'extracteur proprement dit) permettant le contact entre le solvant et le solide dans une cartouche poreuse et l'évacuation de la solution vers le ballon par un siphon.
- Un réfrigérant à eau permettant de condenser les vapeurs de solvant dans la cartouche poreuse (figure I.9).

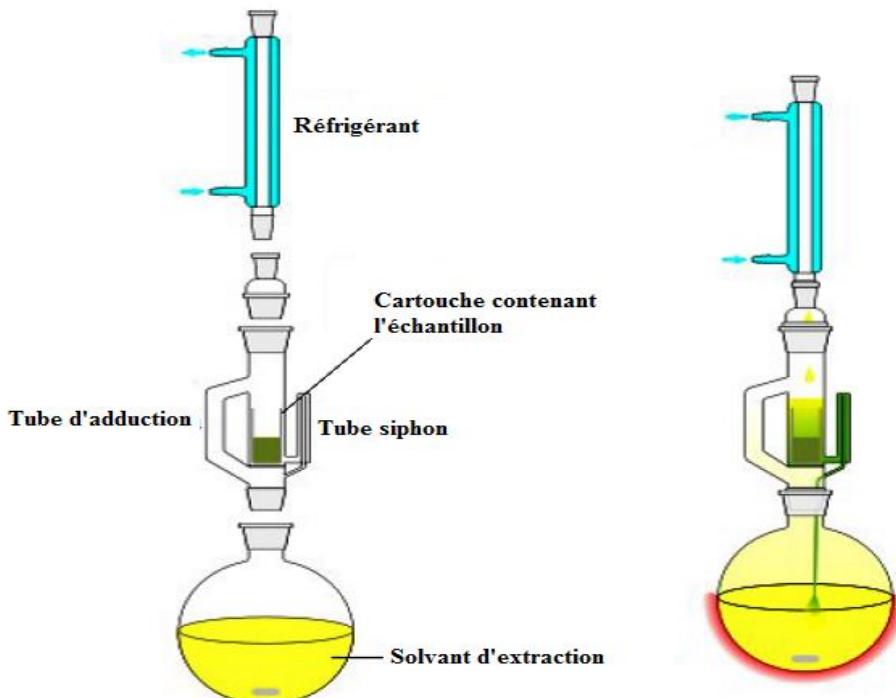


Figure I.9.Extracteur de Soxhlet.

Les opérations d'extraction solide-liquide regroupent plusieurs méthodes consistant toutes à faire interagir le solvant sur le matériau solide afin de dissoudre ses composants solubles:

### 6.2.5. Extraction discontinue

Les méthodes liées à l'extraction discontinue sont multiples:

#### a. La décoction

Est l'opération dans laquelle le solide est plongé dans le solvant liquide mis en ébullition. Il s'agit d'une opération brutale qui doit être réservée à l'extraction de principes actifs non thermolabiles. Elle est cependant très rapide et parfois indispensable.

#### b. La macération

Est une infusion dans un solvant à froid. C'est la seule méthode utilisable dans le cas de l'extraction d'un ensemble de molécules fragiles. Pour être efficace, une macération, peut durer de 4 à 10 jours environ ; ceci peut présenter quelques inconvénients, en termes de fermentation, ou de contamination bactérienne notamment si le solvant utilisé est l'eau. Ces phénomènes peuvent entraîner une dégradation rapide des molécules actives. En vue d'éviter ou de réduire ces inconvénients, la macération peut être opérée dans un récipient couvert, le tout à l'abri de la lumière et, dans certains cas, maintenue dans un réfrigérateur.

#### c. La digestion

Est une macération à chaud (à une température  $< T^{\circ}_{eb}$ ). La digestion et la macération sont utilisées particulièrement en pharmacie et en parfumerie. Il s'agit là d'une opération plus rapide que la précédente.

#### d. L'infusion

Est une décoction durant laquelle le solvant est chauffé sans être mis en ébullition, suivie du refroidissement du mélange. La préparation du thé est l'exemple type de cette opération.

### 6.2.6. Extraction continue

L'extraction continue est une méthode beaucoup plus longue que l'extraction discontinue, mais plus efficace.

#### a. La percolation

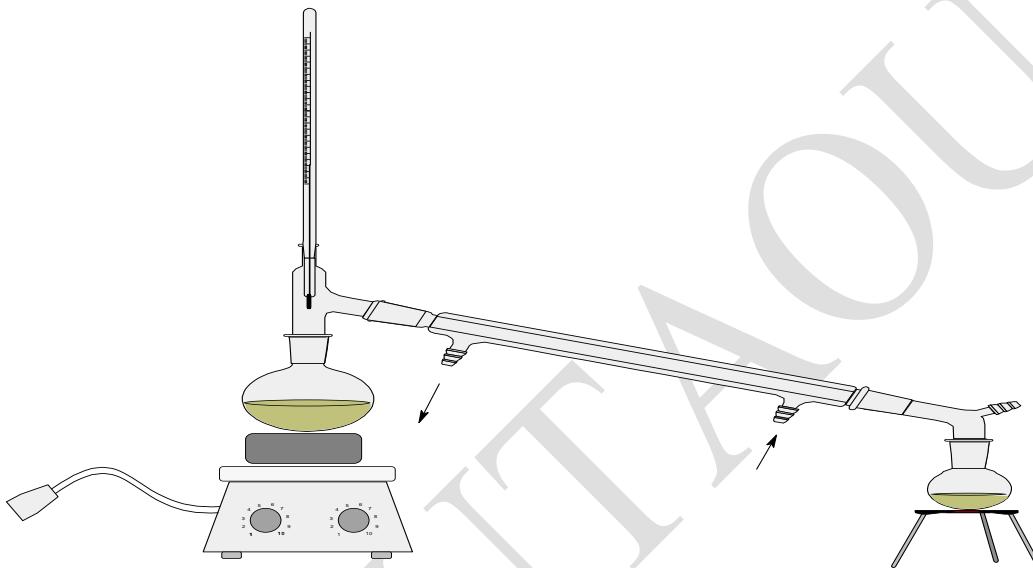
Consiste à laisser couler un solvant (généralement très chaud) sur un lit de solides finement divisés. La préparation du café relève de cette opération.

### 6.2.7. Extraction par hydrodistillation

#### a. Définition

L'hydrodistillation consiste à distiller un composé par entraînement à la vapeur d'eau. L'hydrodistillation est la méthode la plus utilisée pour extraire des huiles essentielles (figure I.10).

Elle montre ses limites lorsque les molécules à extraire sont fragiles et ne résisteront pas au chauffage.



**Figure I.10:** Schéma d'un montage d'hydrodistillation.

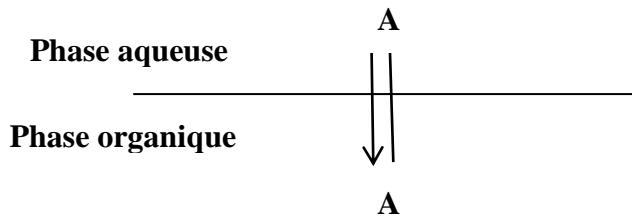
#### b. Principe

La matière première aromatique naturelle est mise dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Sous l'action de la chaleur, les cellules végétales éclatent et libèrent les molécules odorantes qui sont entraînées par la vapeur d'eau formée. Elles passent dans un réfrigérant pour y être condensées par refroidissement. La séparation de l'eau et de l'huile essentielle se fait par différence de densité dans une ampoule à décanter. L'eau décantée appelée distillat reste très parfumée.

## 7. Séparation à contre-courant

### 7.1. Définition

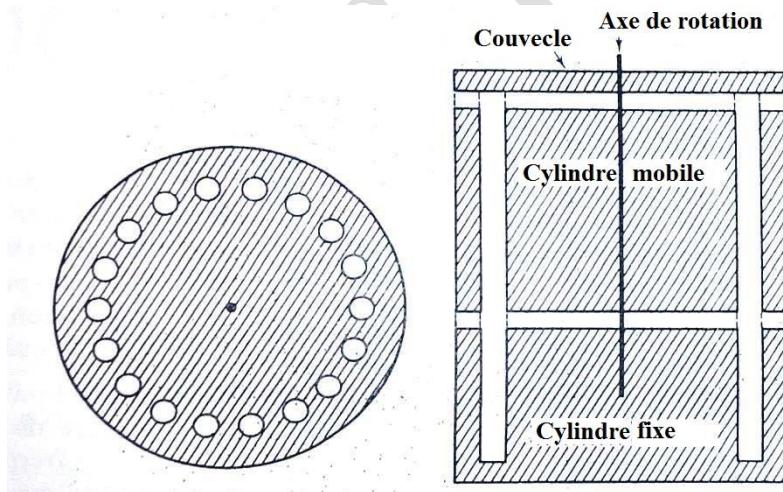
La séparation à contre-courant (Craig 1950) est basée sur la répartition des substances à séparer entre deux phases liquides non miscibles, en les rassemblant dans des fractions distinctes de solvant.



La séparation est possible, si pour les solvants choisis. Les substances ont des coefficients de partage différents. Elle nécessite un équipement comportant fréquemment 100 à 200 et même 400 chambres de séparation dans lesquelles l'équilibre et le transfert des phases peuvent être réalisés automatiquement.

L'opération consiste en une agitation automatique des deux phases et en un transfert de l'une d'elles, dite phase mobile, dans la chambre suivante. Le produit qui possède le plus grand coefficient de partage, présente une plus grande vitesse de migration d'étage en étage et se sépare ainsi peu à peu des composés de plus faible coefficient. Lorsque l'opération est terminée, les divers constituants se retrouvent dans des groupes d'étages différents en fonction des coefficients de partage. Ils sont donc ainsi séparés les uns des autres.

## 7.2. Appareil de CRAIG



**Figure I.11.** Schéma d'un appareil de Craig.

### 7.2.1. Description

Le plus simple des systèmes de séparation à contre-courant initialement mis au point par Craig peut être schématisé de la manière suivante :

- Un bloc inférieur cylindrique est creusé de cavités tubulaires réparties circulairement et d'une façon régulière. Ces divers tubes possèdent tous la même capacité.

- Un bloc supérieur, mobile autour de l'axe du cylindre est creusé d'un même nombre de trous qui se superposent exactement aux tubes du cylindre inférieur
- Tous les tubes sont de volume identique entre eux.
- Les deux cylindres sont ajustables d'une façon hermétique.
- Enfin un couvercle plein peut être rendu solidaire du cylindre mobile en le fermant hermétiquement.
- L'ensemble de deux tubes constitue une colonne.

### 7.2.2. Fonctionnement

- Pour réaliser une séparation, l'appareil est rempli de la manière suivante :
- Si la solution contenant initialement les solutés à séparer, est faite dans le solvant le plus lourd, elle est introduite dans le tube 0. Tous les autres tubes du bloc inférieur sont remplis avec le même volume du solvant lourd pur.
- Le cylindre supérieur mobile est ajusté de telle sorte que les deux tubes supérieurs et inférieurs n° 0 soient superposés. Un même volume du solvant léger pur est introduit dans chacun des tubes supérieurs.
- La méthode débute alors par une agitation énergétique, suivi d'un repos destiné à réaliser la décantation dans chaque colonne verticale formée par l'ensemble des deux tubes correspondant aux cylindres fixe et mobile.
- Le cylindre mobile est soumis à une rotation vers la droite de façon à ce que les ménisques de séparation coïncident exactement avec le plan de rotation séparant ainsi les deux phases.
- L'ensemble d'une agitation, d'une rotation et d'une décantation constitue une opération.
- Les opérations suivantes sont effectuées de manière identique jusqu'à ce que le tube fixe n°0 coïncide avec le tube mobile n° (n-1).

## 8. Extraction par un solide

### 8.1.Définition

L'extraction sur phase solide (SPE : Solid Phase Extraction) est une méthode de traitement de l'échantillon basée sur un principe similaire à la chromatographie liquide. Elle est basée sur le partage de composés entre une phase liquide, l'échantillon, et une phase solide, l'adsorbant.

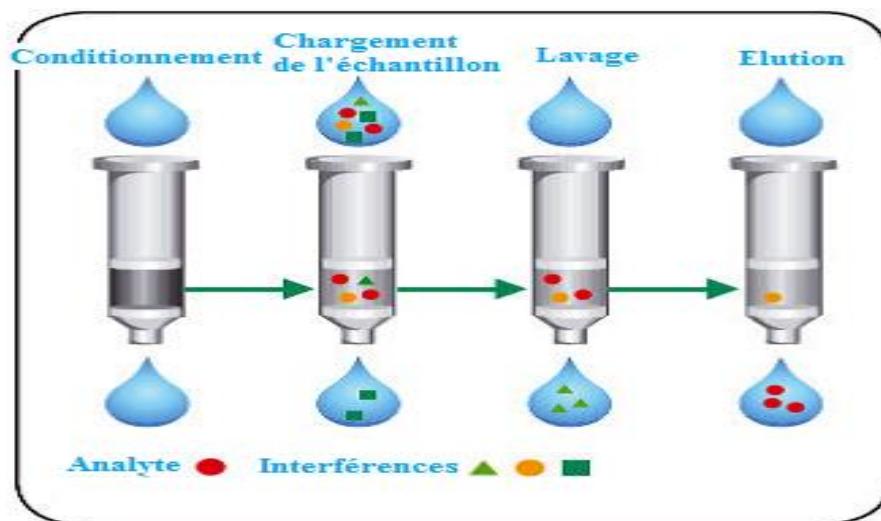
Les techniques d'extraction en phase solide utilisent des membranes ou de petites colonnes ou cartouches à corps de seringue amovible.

## 8.2. Principe

L'extraction en phase solide est basée sur le partage des composés entre une phase liquide, l'échantillon, et une phase stationnaire, l'adsorbant.

## 8.3. Processus d'extraction

Il se compose généralement de quatre étapes (figure I.12).



**Figure I.12.** Les quatre étapes constituant une extraction en phase solide.

L'opération de l'extraction peut se faire en quatre étapes, chaque étapes est caractérisé par la nature et le type de solvant utilisé, qui est de son tour dépendant des caractéristiques du sorbant et du soluté. Les quatre étapes sont les suivantes (figure I.12) :

- ❖ Mouillage et conditionnement du sorbant. Cette opération assure le bon contact entre le soluté et le sorbant,
- ❖ Solubilisation du soluté. Cette opération assure une meilleure percolation du soluté à travers l'adsorbant solide,
- ❖ Rincage ou lavage du sorbant. Cette opération est effectuée avec un solvant approprié, ayant une faible force d'élution, pour éliminer les composants (impuretés) de la matrice qui ont été retenus, avec le soluté, par l'adsorbant sans déplacer les solutés,
- ❖ Elution du soluté cette opération est réalisée par un éluant (solvant) adéquat, ayant une forte force d'élution, pour récupérer le soluté retenu sur le sorbant.

## 8.4. Choix de l'adsorbant SPE

Le choix de l'adsorbant revêt une importance capitale, il faut trouver celui qui pourra extraire avec un excellent rendement le soluté d'intérêt tout en maintenant un extrait propre

c'est-à-dire sans extraire une grande partie des substances endogènes de la matrice. Les facteurs tels que la polarité relative du composé d'intérêt dans la matrice échantillon, la présence de groupements fonctionnels chargés, la solubilité, le poids moléculaire, . . . sont des paramètres qui détermineront la force de rétention qu'aura celui-ci pour l'adsorbant choisi.

On rencontre en général deux grandes familles :

- les polymères ;
- les silices.

### 8.5. Mécanisme mis-en jeux

#### 8.5.1. L'adsorption

Elle correspond à la fixation plus ou moins énergique d'un gaz, d'un liquide ou d'un soluté sur une surface solide.

Exemples des phases adsorbantes:

- Les polymères poreux pour les composés aromatiques.
- Fluorosil ( $Mg_2SiO_3$ ) pour les composés polaires.
- Charbon actif pour les composés organiques.
- La silice pour les composés polaires et les composés acides.
- L'alumine pour les composés polaires et les composés basiques.

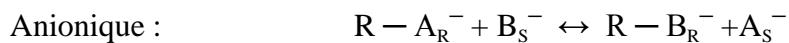
#### 8.5.2. Partage

Le mécanisme de rétention (le partage) des analytes est dû à l'interaction des forces de Van der Waals ou forces dipolaires. On utilise couramment un support en silice greffée (polaires ou apolaires). Les groupements fonctionnels liés au support attirent les composés hydrophobes de l'échantillon par interaction de Van der Waals et les extraient de la solution aqueuse.

#### 8.5.3. L'échange d'ions

L'échange d'ions est un processus par lequel des ions fixés sur un solide poreux insoluble sont échangés avec des ions présents dans une solution mise en contact avec le solide.

Il existe deux catégories d'échangeurs d'ions:



On affecte de l'indice R et S les ions se trouvant respectivement dans les résines et dans la solution.

### ➤ Les échangeurs d'anions

Ils sont sulfoniques ou carboxyliques fortement acide. Les billes chimiques inertes de polystyrène sont traitées par de l'acide sulfurique ou sulfonique concentré. On obtient alors un sulfonates de polystyrène réticulé. Ce produit est la résine échangeuse de cations la plus courante.

### ➤ Les échangeurs de cations

Une variété d'échangeurs d'ions basique, dont la basicité peut être choisie sur mesure en raison du grand nombre d'amines disponibles. Les échangeurs d'anions sont classés par ordre de basicité décroissante. Les résines ayant des groupes ammonium quaternaire sont toutes fortement basiques. Par convention, on appelle:

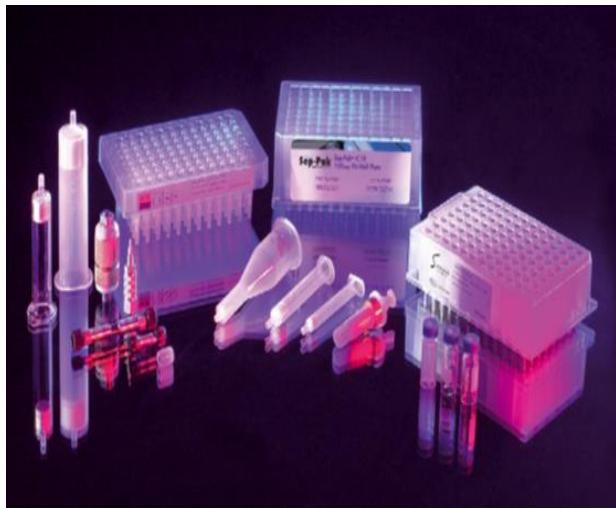
- **Type 1**, les groupes benzyltriméthylammonium, les plus fortement basiques,
- **Type 2**, les benzylidiméthyléthanolammonium, dont la basicité est légèrement plus faible.

## 8.6. Les conditionnements

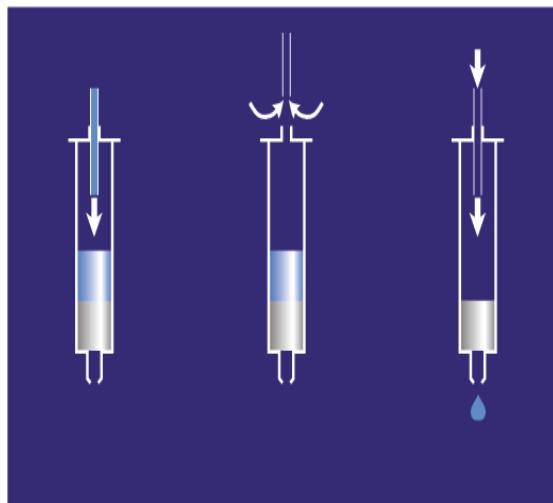
Généralement, pour une extraction ponctuelle ou des petites séries, l'adsorbant est contenu dans une cartouche en polypropylène ou en verre dont la capacité du réservoir peut être de type seringue ou avec un corps évasé (figure I.13). Il est maintenu dans la cartouche entre deux frittés ou bien encore incorporé dans la matrice d'une membrane de filtration.

Les volumes des cartouches les plus utilisées en toxicologie sont compris entre 1 et 5 mL. La quantité de phase est très variable, le plus souvent entre 30 et 500 mg. L'application des fluides peut se faire selon deux principes :

- **Par pression positive** : il s'agit d'un système qui s'adapte sur le haut de la cartouche permettant de pousser les liquides par le biais d'une seringue facilitant le réglage les débits (figure I.14). Cependant, réalisé même pour des petites séries il devient rapidement fastidieux. Ce principe a été automatisé par des industriels autorisant l'extraction de séries ;



**Figure I.13.** Différents conditionnements d'adsorbants disponibles pour l'extraction en phase solide. Source : Waters Corporation.

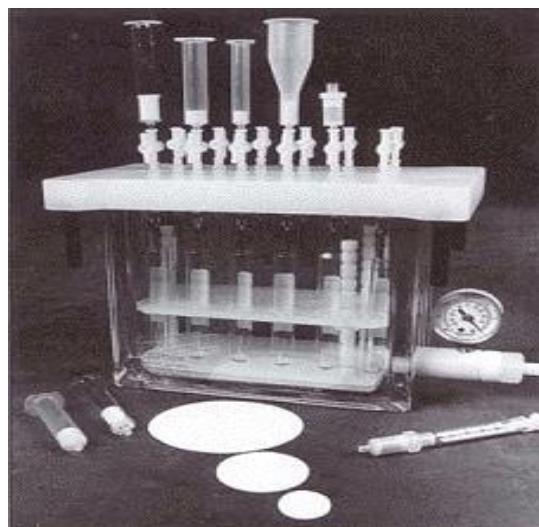


**Figure I.14.** Principe schématique de l'extraction en phase solide réalisée en pression positive.

- **Par pression négative :** c'est la méthode la plus répandue. Il s'agit le plus souvent d'un bac en verre possédant un couvercle adaptable percé de 6 à 24 orifices muni d'un robinet de réglage et d'une pompe ou tout autre système à vide permet de tirer le vide en créant une dépression (figure I.15). L'extraction de grandes séries peut être réalisée selon le même principe sur des plaques plus adaptées à l'extraction de grands nombres d'échantillons composées de 96 puits (figure I.16).



**Figure I.15.** Système d'extraction en phase solide pour plaque 96 puits. Source : Waters Corporation.



**Figure I.16.** Cuve pour extraction en phase solide dite en pression négative.

## 9. Séparation par changement d'état

L'état sous lequel se présente un corps pur dépend essentiellement du degré d'organisation des atomes ou molécule qui le constituent. Il existe trois formes fondamentales: solide, liquide et gazeux (voir diagramme des phases ci-dessous).

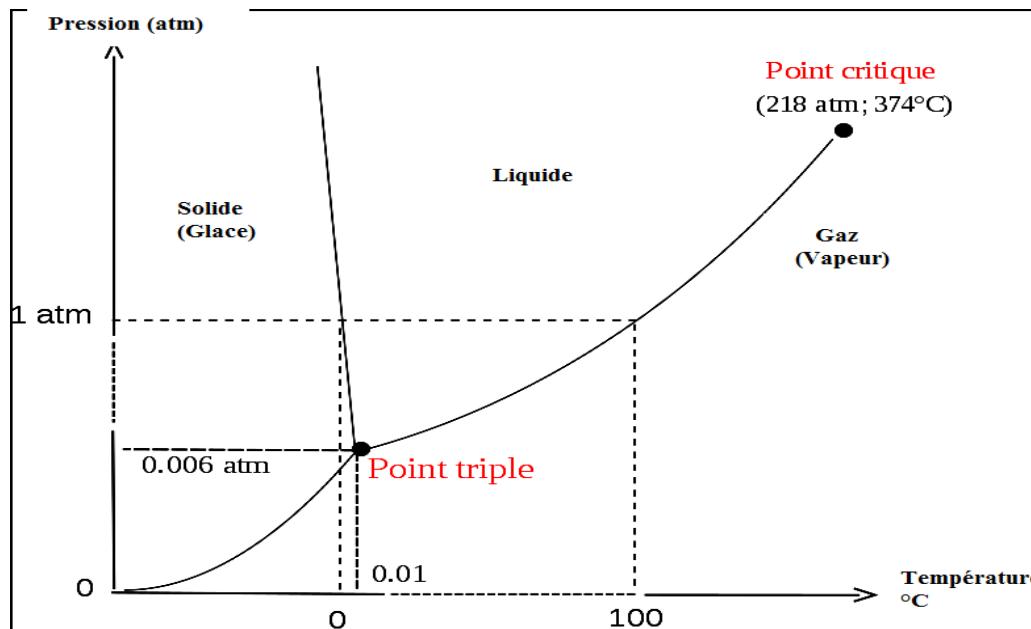


Figure I.17. Diagramme des phases.

### 9.1. Sublimation

La sublimation met à profit le passage de l'état solide à l'état gazeux.

Comme cela est visible sur le diagramme des phases, la sublimation est d'autant plus probable que l'on abaisse la pression en élevant la température.

Certains composés organiques (ou minéraux) sont sublimables à pression ordinaire. Exp: acide benzoïque, camphre, chlorure mercurique.

Les applications les plus intéressantes en pharmacie sont la lyophilisation et la distillation moléculaire réalisées à l'aide d'un vide très poussé ( $10^{-3}$  à  $10^{-5}$  mmHg) obtenu en captant les moindres traces d'eau ou de solvant par des pièges chimiques ou thermiques.

Ces deux méthodes permettent de sublimer, soit la substance, soit le solvant, à basse température et donc avec le minimum d'altération puisqu'on opère en absence d'oxygène.

### 9.2. Distillation

La distillation est une opération de transfert de matière ayant pour but de séparer les constituants d'un mélange liquide, homogène ou hétérogène.

Elle consiste en l'ébullition d'un mélange liquide suivie de la condensation des vapeurs obtenues, en un liquide «pur» ou en fractions liquides plus ou moins riches en constituants du mélange vaporisé. Elle se base sur la différence de volatilité entre ces constituants. C'est l'une des opérations de séparation les plus employées dans le domaine de l'agroalimentaire, la chimie et de la pétrochimie.

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

Il existe deux types de distillation:

- Distillation simple
- Distillation fractionnée

### 9.2.1. Distillation simple

#### a. Principe

Le principe de la distillation est très simple: on chauffe un mélange de liquides pour atteindre le point d'ébullition d'un des constituants: le plus volatile s'évaporera le premier et les vapeurs sont recueillies et condensées dans un autre récipient. Pendant que le premier liquide s'évapore (distillat), le deuxième n'atteint pas sa température d'évaporation et reste sous forme liquide dans le contenant initial (résidu).

Elle se résume en deux actions:

- Chauffer un liquide impur ou un mélange de liquides pour les transformer en vapeurs par ébullition.
- Condenser ensuite les vapeurs par refroidissement et isoler les liquides purs.

#### b. Montage

Le montage se fait en partant le chauffe ballon puis du ballon de réaction et en déposant successivement la tête de distillation, le réfrigérant, l'allonge puis le récipient. Le démontage se fera dans l'ordre inverse (figure I.18).

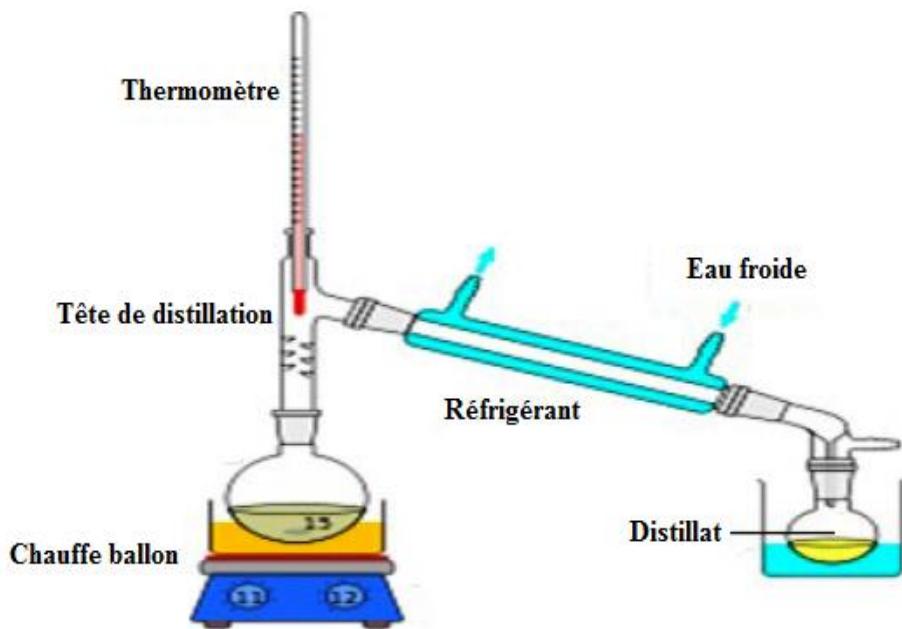


Figure I.18. Montage d'une distillation simple.

### c. Exemple de traitement d'un mélange

La technique de distillation permet de séparer un mélange d'alcool et d'eau, l'alcool à une température d'ébullition plus basse que l'eau alors elle s'évaporera en premier. Les vapeurs d'alcool seront recueillies et refroidies, cette condensation permettra de récupérer l'alcool (distillat) dans un autre contenant. L'eau (résidu) restera dans le contenant initial.

#### 9.2.2. Distillation fractionnée

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

##### a. Principe

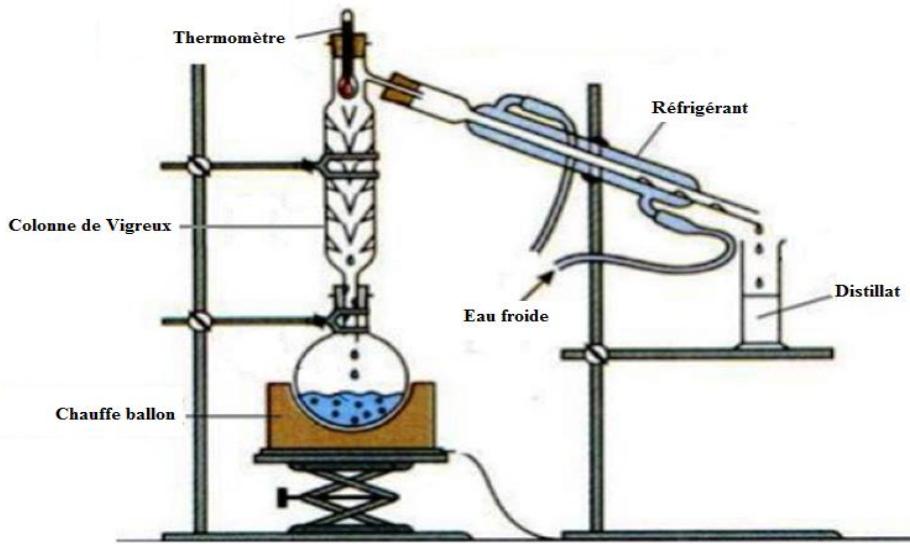
La distillation fractionnée, appelée également rectification, est un procédé permettant de séparer des liquides par fractionnement grâce à la différence de leur température d'ébullition.

Le composant le plus volatil a un point d'ébullition bas s'évapore donc en premier. Le mélange porté à une ébullition lente reste à la même température jusqu'à ce que le composant le plus volatil soit complètement vaporisé, chaque liquide peut ainsi être distillé en fonction de sa température d'ébullition.

**Remarque :** Il est possible de travailler à pression réduite pour abaisser le point d'ébullition des composés (distillation sous vide).

**b. Montage**

Le mélange à séparer est placé dans un ballon (bouilleur) surmonté d'une colonne de distillation (figure I.19). En tête de colonne, on place un réfrigérant droit en position inclinée de façon à permettre l'écoulement des liquides qui se condensent vers une allonge de recette. Un thermomètre est placé en tête de colonne de sorte que son réservoir soit placé au niveau de la jonction avec le réfrigérant (on mesure ainsi la température de l'équilibre liquide-vapeur du composé qui est récupéré dans le distillat).



**Figure I.19.** Montage d'une distillation fractionnée.

**c. Exemple d'application : Un jus d'orange sans pulpe:**

- **Etape 1:** le chauffe-ballon chauffe le mélange dans le ballon et celui-ci se met à bouillir.
- **Etape 2:** la vapeur d'eau ainsi formée monte progressivement dans la colonne de Vigreux.
- **Etape 3:** le thermomètre permet de lire la température de la vapeur qui rentre dans le réfrigérant: elle est proche de 100 °C.
- **Etape 4:** la vapeur d'eau (très chaude) entre en contact avec les parois du réfrigérant. Comme le réfrigérant est froid grâce à la circulation d'eau froide qui se fait autour, la vapeur d'eau se refroidit et se transforme en eau liquide.
- **Etape 5:** les gouttes d'eau liquide ainsi formée roulent vers la sortie du réfrigérant et tombent dans le bêcher. Le liquide ainsi obtenu, qui ne contient que de l'eau, est appelé le distillat.

## EXERCICES D'APPLICATION

### Exercice 1 :

Une membrane semi-perméable sépare deux solutions à 20 °C. La première contient 4 g de glucose (MM = 180 g/mol) complètement dissocié dans 10 L d'eau et l'autre contenant 9,5 g de MgCl<sub>2</sub> (MM = 95 g/mol) dans un même volume d'eau dissocié à 50 %.

1- Quel est le phénomène physique observé (diffusion libre, osmose ou osmose inverse) ?

Expliquer ?

2- Quelle est la pression osmotique résultante exercée sur la membrane ?

### Exercice 2 :

Le coefficient de partage de l'iode (I<sub>2</sub>) entre les deux solvants non-miscibles : tétrachlorométhane et eau, est égal à 100 à 25 °C. À 10 ml de solution aqueuse d'iode à 10 g/l, on ajoute 10 ml de tétrachlorométhane (CCl<sub>4</sub>).

Donnée : I<sub>2</sub> est plus soluble dans le tétrachlorométhane que dans l'eau.

- Déterminer la concentration en iode dans le tétrachlorométhane et dans l'eau, après agitation et décantation.

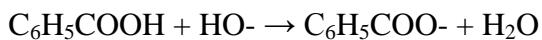
### Exercice 3 :

L'acide benzoïque C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-COOH est assez soluble dans des solvants moins polaires que l'eau : l'éthanol, l'éther diéthylique ou le dichlorométhane. On cherche à extraire l'acide à partir d'une solution aqueuse saturée dans une ampoule à décanter en présence d'un solvant organique non miscible à l'eau.

L'acide passe dans ce solvant et on le récupère après élimination du solvant.

#### A. Dosage de la solution saturée initiale S<sub>0</sub>

On dose un échantillon de volume V<sub>0</sub> = 20,0 mL de la solution S<sub>0</sub> par une solution d'hydroxyde de sodium de concentration molaire C<sub>b</sub> = 2,0 x 10<sup>-2</sup> mol.L<sup>-1</sup> en hydroxyde de sodium apporté. Un indicateur coloré permet de déterminer l'équivalence. A cet instant, tout l'acide benzoïque présent dans l'échantillon a réagi avec un volume V<sub>b</sub> = 22,8 mL de solution d'hydroxyde de sodium. L'équation de la réaction de dosage est :



Calculez la quantité n<sub>0</sub> d'acide benzoïque contenu dans l'échantillon dosé.

**B. Extraction simple Dans une ampoule à décanter,**

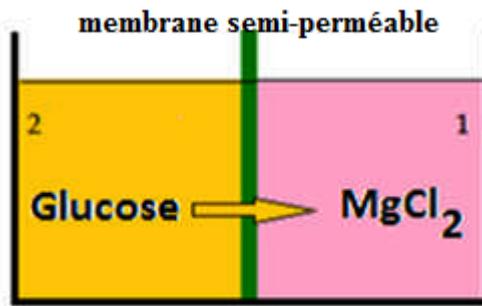
On introduit un volume  $V'_0 = 40,0 \text{ mL}$  de la solution  $S_0$ . On ajoute un volume  $V = 10,0 \text{ mL}$  de dichlorométhane (densité :  $d = 1,33$ ). On bouche l'ampoule, on l'agit et on la retourne plusieurs fois, en n'oubliant pas de dégazer régulièrement. On repose l'ampoule sur son support puis on enlève le bouchon. On recueille un volume  $20,0 \text{ mL}$  de la phase aqueuse que l'on dose avec une solution d'hydroxyde de sodium de concentration molaire  $C'_b = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ . Le volume de soude versé à l'équivalence est  $V'_b = 18,1 \text{ mL}$ .

1. Situez les deux phases dans l'ampoule à décanter.
2. Calculez la quantité  $n_1$  d'acide restant dans la phase aqueuse. En déduire la quantité extraite avec le solvant organique.
3. Dans le cas d'une extraction liquide-liquide, le coefficient de partage  $K$  est défini comme le rapport des concentrations molaires d'un même constituant  $E$  dans deux phases aqueuse et organique non miscibles :  $K = [E]_{\text{org}} / [E]_{\text{aq}}$ . Déterminez le coefficient de partage  $K_1$ .
4. Calculez le rendement  $r_1$  de l'extraction.

**C. Extraction en 2 étapes**

On introduit de nouveau un volume  $V'_0 = 40,0 \text{ mL}$  de solution  $S_0$  dans une ampoule à décanter. On ajoute un volume  $V/2 = 5,0 \text{ mL}$  de dichlorométhane. On recueille la phase aqueuse en totalité et on extrait une seconde fois avec le même volume de  $5,0 \text{ mL}$  de dichlorométhane. On recueille finalement un volume de  $20,0 \text{ mL}$  de phase aqueuse que l'on dose avec la solution d'hydroxyde de sodium de concentration  $C''_b$ . Le volume équivalent est  $V''_b = 4,0 \text{ mL}$ .

1. Calculez la quantité  $n_2$  d'acide restant dans la phase aqueuse.  
En déduire la quantité extraite avec le solvant organique.
2. Calculez le coefficient de partage  $K_2$ .
3. Déterminez le rendement  $r_2$  de l'extraction en 2 étapes.
4. Quelle conclusion peut-on tirer de ces deux expériences ?

Corrigé :Exercice 1 :

Le phénomène observé est l'osmose car la membrane est sélective. Elle ne permet que le passage des molécules de solvant.

- ❖ La pression osmotique résultante :

(On suppose que le solvant se déplace du compartiment 2 vers le compartiment 1)

$$\Delta \pi = \pi_1 - \pi_2$$

Avec :  $\square_1$  : la pression osmotique exercée par le contenu du compartiment 1 ( $MgCl_2$ ) sur la membrane et  $\square_2$  : la pression osmotique exercée par le contenu du compartiment 2 (Glucose) sur la membrane.

On a :

$$\pi_1 = \pi_{MgCl_2} \text{ et } \pi_2 = \pi_{Glucose}$$

$$\Delta \pi = \pi_{MgCl_2} - \pi_{Glucose}$$

Par définition de la pression osmotique exercée par une solution :

$$\pi = \beta \times C_m \times R \times T \text{ et } \beta = 1 + \alpha (n - 1)$$

Tel que :  $\alpha$  est taux de dissociation et  $n$  est le nombre d'ions libérés par une molécule totalement dissociée.

- Le glucose est complètement dissocié :  $\beta = 1$
- 50% des molécules de  $MgCl_2$  sont dissociées :



$$\text{Donc } \beta = 1 + \frac{1}{2} (3 - 1) = 2$$

Finalement :

$$\Delta \square = (\beta_{MgCl_2} \times C_m_{MgCl_2} \times R \times T) - (\beta_{glucose} \times C_m_{glucose} \times R \times T)$$

$$\Delta \square = RT (\beta_{MgCl_2} \times C_m_{MgCl_2} - \beta_{glucose} \times C_m_{glucose})$$

$$\left. \begin{array}{l} C_m = n/V \\ n = m/M \end{array} \right\} C_m = m / MV$$

$$\Delta\pi = RT \left[ \beta_{\text{MgCl}_2} \frac{m_{\text{MgCl}_2}}{M_{\text{MgCl}_2} \times V_{\text{MgCl}_2}} - \beta_{\text{glucose}} \frac{m_{\text{glucose}}}{M_{\text{glucose}} \times V_{\text{glucose}}} \right]$$

$$R = 8,13 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$$

$$T = 20^\circ\text{C} = 293 \text{ K}$$

$$\beta_{\text{glucose}} = 1, \beta_{\text{MgCl}_2} = 2$$

$$m_{\text{glucose}} = 4 \times 10^{-3} \text{ Kg}, m_{\text{MgCl}_2} = 9,5 \times 10^{-3} \text{ Kg}$$

$$M_{\text{glucose}} = 180 \times 10^{-3} \text{ Kg. Mol}^{-1}, M_{\text{MgCl}_2} = 95 \times 10^{-3} \text{ Kg. mol}^{-1}$$

$$V_{\text{glucose}} = V_{\text{MgCl}_2} = 10^{-2} \text{ m}^3$$

$$\left. \begin{array}{l} \\ \\ \\ \\ \end{array} \right\} \Delta\pi = 0,433 \times 10^5 \text{ Pa}$$

### Exercice 2 :

D'après les données de l'exercice, on peut écrire les deux égalités suivantes :

$$K = \frac{(I_2)_{\text{solvant organique}}}{(I_2)_{\text{solvant aqueux}}} = 100 \quad \dots \dots (1)$$

$$(I_2)_{\text{solvant organique}} + (I_2)_{\text{solvant aqueux}} = 10 \text{ g/l} \quad \dots \dots (2)$$

On peut en déduire que :

D'après (1) :

$$(I_2)_{\text{solvant organique}} = 100(I_2)_{\text{solvant aqueux}}$$

D'après (2) :

$$100 \times (I_2)_{\text{solvant aqueux}} + (I_2)_{\text{solvant aqueux}} = 10 \text{ g/l}$$

Donc :

$$(I_2)_{\text{solvant aqueux}} = 10/101 = 0,099 \text{ g/l}$$

$$(I_2)_{\text{solvant organique}} = 100(I_2)_{\text{solvant aqueux}} = 9,9 \text{ g/l}$$

Concentration dans le tétrachlorométhane (solvant organique) = 9,9 g/l

Concentration dans l'eau (solvant aqueux) = 0,099 g/l

### Exercice 3 :

A. Quantité d'acide initialement présente dans 40,0 mL de S<sub>0</sub> :

$$n_0 = C_b \cdot V_b \text{ soit } n_0 = 2,0 \times 10^{-2} \times 22,8 \times 10^{-3} \approx 4,6 \times 10^{-4} \text{ mol}$$

B. 1. La densité de la phase organique est supérieure à celle de la phase aqueuse : la phase organique est sous la phase aqueuse.

2. a) Quantité d'acide restante dans 20,0 mL de S<sub>0</sub> :

$$n_1 = c'_b \cdot V'_b \text{ soit } n_1 = 2,0 \times 10^{-3} \times 18,1 \times 10^{-3} \approx 3,6 \times 10^{-5} \text{ mol}$$

b) Quantité d'acide extraite, à partir de 20,0 mL de S<sub>0</sub>, avec le solvant organique :

$$n_1' = n_0 - n_1 \text{ soit } n_1' = 4,6 \times 10^{-4} - 3,6 \times 10^{-5} \approx 4,2 \times 10^{-4} \text{ mol}$$

En effet, 2n<sub>0</sub> fait référence à un volume de 40,0 mL de S<sub>0</sub> et n<sub>1</sub> fait référence à un volume de 20,0 mL de la même solution.

3. [C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>COOH]<sub>org</sub> = 2n<sub>1</sub>' / V (V étant le volume total de dichlorométhane, il faut considérer la quantité totale d'acide extraite à partir de 40,0 mL de S<sub>0</sub>).

$$[C_6H_5COOH]_{aq} = n_1/V_0 = 2n_1'/V_0 \text{ et } K_1 = [C_6H_5COOH]_{org} / [C_6H_5COOH]_{aq}$$

$$K_1 = \frac{2n_1' V_0}{V n_1} = \frac{2 \times 4,2 \times 10^{4-} \times 20,0 \times 10^{-3}}{10,0 \times 10^{-3} \times 3,6 \times 10^{5-}} \approx 47$$

$$4. r_1 = \frac{n_1'}{n_0} = \frac{4,2 \times 10^{-4}}{4,6 \times 10^{-4}} \approx 9,1 \times 10^{-1} = 91\%$$

C. 1. a) Quantité d'acide restante dans 20,0 mL de S<sub>0</sub> :

$$n_2 = c_b' \cdot V_b \text{ soit } n_2 = 4,0 \times 10^{-3} \times 2,0 \times 10^{-3} = 8,0 \times 10^{-6} \text{ mol}$$

b) Quantité d'acide extraite, à partir de 20,0 mL de S<sub>0</sub>, avec le solvant organique :

$$n_2' = n_0 - n_2 \text{ soit } n_2' = 4,6 \times 10^{-4} - 8,0 \times 10^{-6} \approx 4,5 \times 10^{-4} \text{ mol}$$

2. Le coefficient de partage d'un soluté entre deux solvants est une constante d'équilibre associée à la réaction : C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>COOH<sub>aq</sub> = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>COOH<sub>org</sub>

Cette constante ne dépend que de la température :

$$K_2 = [C_6H_5COOH]_{org} / [C_6H_5COOH]_{aq} = K_1 = 47$$

$$3. r_2 = n_2' / n_0 \text{ soit } r_2 = 4,5 \times 10^{4-} / 4,5 \times 10^{4-} \approx 9,8 \times 10^{-1} \text{ ou } 98\%.$$

4. L'extraction en deux étapes donne un meilleur résultat sans pour autant consommer plus de solvant.

N. BOFTA

**PARTIE II**

**SEPARATION**

**PAR**

**CROMATOGRAPHIE**

## 1. Notion de base

### 1.1. Définition

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants présents dans des mélanges variés. Elle sert en analyse pour identifier et quantifier des composés au sein d'échantillons divers. Le principe de base repose sur les équilibres de concentration qui apparaissent lorsqu'un composé est mis en présence de deux phases non miscibles.

### 1.2. Principe de la séparation

Le principe de la chromatographie consiste à entraîner l'échantillon à l'aide d'un fluide (gazeux ou liquide) appelé ici phase mobile (PM), qui se déplace au contact d'une seconde phase fixée sur un support (colonne ou surface plane). Celle-ci, dite stationnaire (PS), est insoluble dans la première.

Si les différents composés de l'échantillon (Solutés) présentent des affinités différentes pour le couple PM/PS; ils vont être plus au moins ralenti dans leur progression par la phase stationnaire. Sous l'effet antagoniste des forces de rétention soluté/PS et des forces d'entrainement soluté/PM. Ces composés vont pouvoir être recueillis séparément à l'issue de cette migration.

Chaque composé est caractérisé par un coefficient de distribution de Nernst K (appelé également coefficient de partition) défini comme suit:

$$K = \frac{C_s}{C_m} = \frac{\text{Concentration du soluté dans la phase stationnaire}}{\text{Concentration du soluté dans la phase mobile}}$$

K dépend de la température et de trois forces d'interaction: PS/soluté, PM/soluté et PM/PS.

### 1.3. Classification des méthodes chromatographiques

Les méthodes chromatographiques regroupent des techniques très variées qui peuvent être classées selon trois modalités différentes :

- ❖ Classification selon la nature physique des phases.
- ❖ Classification selon le phénomène mis en œuvre.
- ❖ Classification selon le procédé opératoire.

#### 1.3.1. Classification selon la nature physique des phases

La phase mobile est un fluide; soit un liquide, soit un gaz, ou un fluide supercritique et la phase stationnaire est soit un solide, soit un liquide. On distingue:

- ❖ chromatographie liquide—solide (CLS)
- ❖ chromatographie liquide—liquide (CLL)
- ❖ chromatographie gaz—solide (CGS)
- ❖ chromatographie gaz—liquide (CGL) chromatographie supercritique (SFC); les fluides supercritiques possédant des propriétés à la frontière entre celles des liquides et celles des gaz, par exemple le CO<sub>2</sub> à 50°C et 150 bar.

### 1.3.2. Classification selon le phénomène mis en œuvre

- ❖ La chromatographie d'adsorption (lorsque la phase stationnaire est un solide); par extension on pourrait y rattacher la chromatographie d'affinité, qui correspond à un cas où les propriétés d'adsorption de la phase stationnaire sont spécifiques vis-à-vis d'un (ou une famille) composé(s).
- ❖ La chromatographie d'échange d'ions, où la phase stationnaire porte des groupes fonctionnels acides ou basiques, destinée à séparer des composés ionisés.
- ❖ La chromatographie de partage, lorsque la phase stationnaire est un liquide non miscible avec la phase mobile (mise en jeu de coefficients de partage).
- ❖ La chromatographie d'exclusion où la phase stationnaire poreuse se comporte comme un tamis et sépare les composés en fonction de leur taille.

### 1.3.3. Classification selon le procédé opératoire

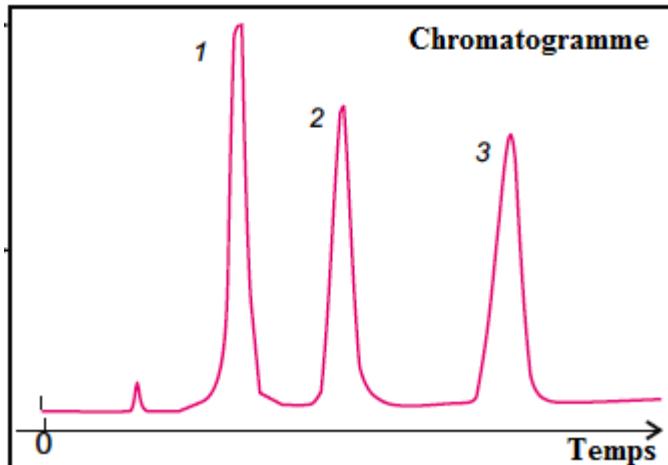
Selon le conditionnement de la phase stationnaire, on distingue :

- ❖ La chromatographie sur colonne
- ❖ La chromatographie sur papier
- ❖ La chromatographie sur couche mince.

## 1.4. Chromatogramme

Chaque séparation effectuée donne lieu à un enregistrement particulier appelé *chromatogramme*, qui correspond au tracé des variations de composition de la phase éluée au cours du temps (figure II.1).

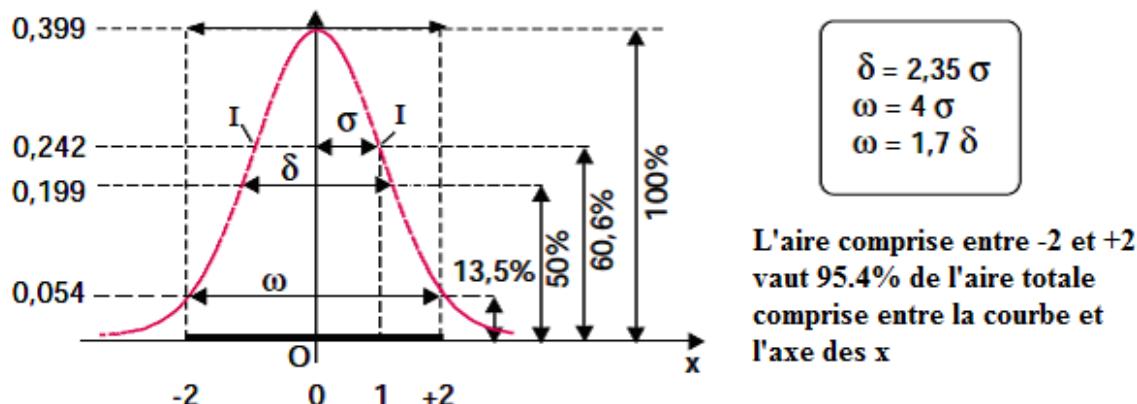
Le Chromatogramme : est une courbe, idéalement, Gaussien en fonction du temps de rétention t<sub>r</sub> ce dernier présente le temps mis par le soluté pour parcourir le trajet entre l'entrée et la sortie de la phase stationnaire.



**Figure II.1.** Le chromatogramme

### 1.5. Pic d'élution parfait

Un pic d'élution idéal a le même aspect que la représentation graphique de la courbe de Gauss. En chromatographie  $\delta$  désigne la largeur à mi-hauteur ( $\delta=2,35\sigma$ ) et  $\sigma^2$  la variance du pic. La largeur dite « à la base » du pic,  $\omega$  est mesurée à 13,5% de la hauteur, on a  $\omega=4\sigma$  (figure II.2).



**Figure II.2.** Le pic d'élution parfait.

### 1.6. Les principaux paramètres

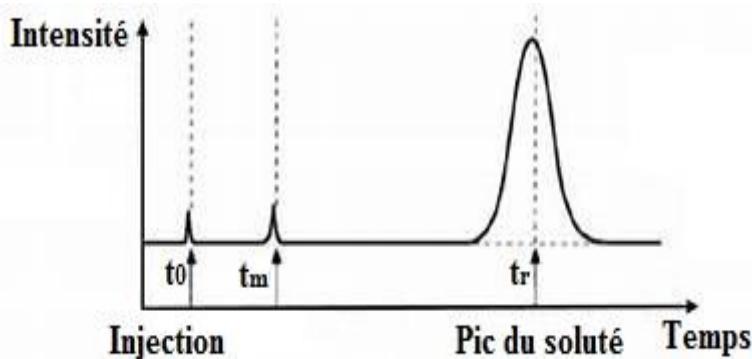
Pour définir chaque composé et comparer les performances des colonnes ou des séparations, on utilise divers paramètres en plus des temps de rétentions  $t_r$ .

#### 1.6.1. Notion de temps

##### a. Temps mort $t_m$

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

Le temps  $t_0$  est le temps du début de l'injection.



**Figure II.3.** Chromatogramme avec notion de temps.

### b. Temps de rétention $t_r$

Temps mis par les molécules d'un composé à analyser (soluté) pour parcourir le trajet entre l'entrée et la sortie de la colonne. C'est le temps total passé dans la colonne. Le temps de rétention  $t_r$  peut être aussi mesuré entre l'entrée et la sortie du système chromatographique.

Le temps de rétention est caractéristique du constituant, pour des conditions d'analyse données (figure II.3).

### c. Temps de rétention réduit

Temps mis par les molécules du soluté pour parcourir le trajet entre l'entrée et la sortie de la colonne représentant le temps passé (temps corrigé) dans la phase stationnaire.

$$t'_r = t_r - t_m$$

#### 1.6.2. Efficacité N

L'efficacité d'une colonne est exprimée par le nombre de plateaux théoriques  $N$  qu'elle possède. Plus  $N$  est élevée, plus la colonne est efficace et la séparation est meilleure.

$N$  est un paramètre relatif, puisqu'il dépend à la fois du soluté et des conditions opératoires suivies. On choisit généralement un constituant qui apparaît en fin ce chromatogramme pour avoir une valeur repère, à défaut de savoir si la colonne permet de réussir une séparation donnée.

$$N = 16 \frac{t_r^2}{\omega^2} = 5,54 \frac{t_r^2}{\delta^2}$$

Avec,  $t_r$  : temps de rétention

$\omega$  : largeur à la base

$\delta$  ou  $\omega_{1/2}$  : largeur à mi-hauteur.

### 1.6.3. La hauteur équivalente à un plateau théorique H (ou HEPT)

Pour une colonne de longueur L, elle vaut :  $H = L/N$

Plus la HEPT est faible, plus la colonne est efficace.

### 1.6.4. Volume d'élution (ou de rétention) $V_r$

Désigne le volume de phase mobile nécessaire pour faire migrer le soluté choisi d'une extrémité à l'autre de la colonne. Il 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. Si le débit  $D$  est stationnaire :

$$V_r = t_r \times D$$

### 1.6.5. Volume mort $V_m$

Correspond au volume de phase mobile dans la colonne. Autrement dit,  $V_m$  est le volume occupé par la phase mobile dans la colonne :  $V_m = t_m \times D$

### 1.6.6. Volume de phase stationnaire $V_s$

Volume occupé dans la colonne par la phase stationnaire. D'où :  $V_T = V_s + V_m$   
 $V_T$  : volume totale de la colonne.

### 1.6.7. Rapport de phase $\beta$

Rapport entre le volume mort de la colonne et le volume de phase stationnaire.

Caractéristique essentielle de toute colonne:  $\beta = V_m/V_s$

### 1.6.8. Facteur de rétention (ou de capacité) $k'$

Correspond au rapport de la quantité fixée sur la phase stationnaire ( $m_s$ ) et de celle restée dans la phase mobile ( $m_m$ ). Ce paramètre rend compte de la capacité plus ou moins grande de la colonne à retenir un soluté. Il correspond également au rapport des temps passés dans ces deux phases:

$$k' = m_s/m_m = \frac{t'_r}{t_m} = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

Ou encore :

$$t_r = t_m(1 + k')$$

### 1.6.9. Sélectivité $\alpha$

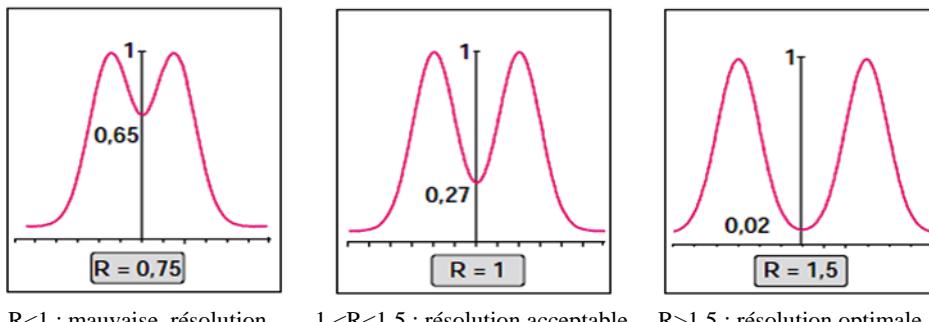
Correspond au rapport des facteurs de rétention  $k$ ; précise l'aptitude de la colonne à séparer deux composés.  $\alpha$  est toujours  $> 1$ .

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

### 1.6.10. Facteur de résolution

Traduit la plus ou moins bonne séparation entre deux composés. On peut y accéder à partir du chromatogramme (figure II.4).

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



**Figure II.4.** Facteur de résolution.

Il existe, pour exprimer la résolution, d'autres relations dérivées des précédentes, établies en vue de remplacer un paramètre par un autre, ou admettant des hypothèses simplificatrices. Ainsi les deux expressions suivantes sont-elles très souvent employées (Relation de Purnell).

$$R = \frac{1}{2} \sqrt{N} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha + 1} \right) \left( \frac{k}{1 + k} \right)$$

$$R = \frac{\sqrt{N}}{2} \left( \frac{k_2 - k_1}{k_1 + k_2 + 2} \right)$$

### 1.7. Effet de la vitesse d'élution sur l'efficacité de la colonne; Equation de Van Deemter

L'efficacité d'une colonne est directement liée aux nombres de plateaux théoriques; pour obtenir le nombre maximal de ce dernier **N** dans une colonne, il faut définir les conditions où la hauteur de plateau réduite **H** est minimale (**N = L / H**).

Donc, il faut étudier les différents mécanismes d'élargissement d'un pic de soluté au cours de sa progression au sein d'une colonne chromatographique (figure II.5)..

On peut considérer que l'étalement d'un pic de soluté a trois origines :

- ✓ La dispersion des molécules par diffusion longitudinale.
- ✓ L'existence de « chemins multiples » dus au remplissage.

- ✓ La résistance au transfert de masse dans chacune des deux phases.

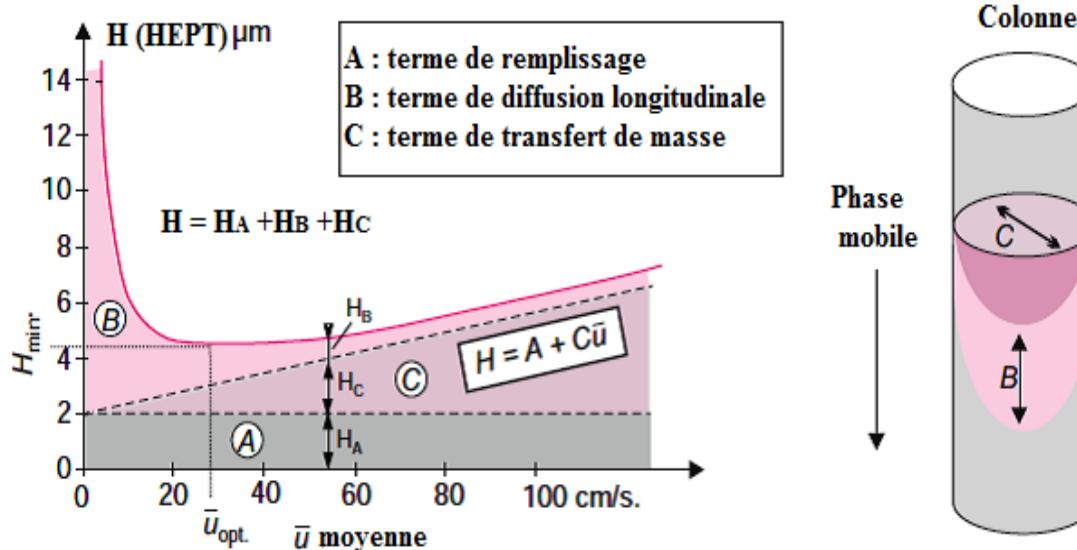
Le calcul de la variance correspondant à chacun de ces facteurs a été mis en évidence pour la première fois par **Van Deemter**:

$$H = A + \frac{B}{U} + C \times U$$

Avec, H : HEPT

U : vitesse d'élution

A, B, C : constantes de l'équation de Van Deemter.



**Figure II.5.** Courbe de Van Deemter en chromatographie gazeuse avec indication des domaines propres à A, B et C.

#### A : Coefficient de diffusion turbulente ou terme de remplissage

Chemins préférentiels par le soluté, dus à la granulométrie de la phase stationnaire (taille et répartition des particules) A est donc lié au diamètre des particules de la phase stationnaire et à la régularité du remplissage.

#### B : Coefficient de diffusion longitudinale

C'est la migration du soluté des régions les plus concentrées vers les régions plus diluées. Le coefficient de diffusion est plus important dans les gaz que dans les liquides

#### C : Coefficient de transfert de masse du soluté entre les deux phases.

U: est la vitesse moyenne de la phase mobile (cm/s)

Cette équation montre que pour une efficacité maximale nécessite un HEPT minimal qui correspond à une vitesse d'élution  $U_{\text{optimale}}$ .

## 1.8. Optimisation d'une analyse chromatographique

Selon l'expression mathématique de la résolution mentionnée précédemment cette dernière dépend des paramètres chromatographiques suivantes:

- La racine carrée du nombre de plateaux théoriques
- Le facteur de rétention (ou de capacité)  $k'_2$
- Le facteur de la sélectivité  $\alpha$

Par conséquence, afin d'optimiser une analyse chromatographique et avoir des pics bien séparés, il faut d'abord optimiser ces trois facteurs.

### 1.8.1. La racine carrée du nombre de plateaux théoriques $N$

Pour obtenir un nombre maximal des plateaux théoriques dans une colonne  $N$ , il faut définir les conditions où la hauteur de plateau réduite  $H$  est minimale ( $N = L / H$ ). Les paramètres permettant de minimiser  $H$  sont la diminution:

- ❖ du diamètre des particules de la phase stationnaire.
- ❖ du diamètre du support.
- ❖ de la température (CPG).

### 1.8.2. Le facteur de rétention (ou de capacité) $k'_2$

La séparation peut souvent être améliorée de manière significative en modifiant le facteur de capacité  $k'_2$ .

La résolution  $R$  augmente avec  $k'_2$  dans les deux cas suivants:

- ❖ Diminution de la température dans le cas de la chromatographie en phase gazeuse CPG.
- ❖ La modification de la composition de la phase mobile dans le cas de la chromatographie liquide.

### 1.8.3. le facteur de la sélectivité $\alpha$ :

Inutile d'optimiser  $N$  et  $k$  si le facteur de sélectivité  $\alpha$  égal 1, plusieurs options sont possibles afin d'augmenter  $\alpha$  tout en conservant  $1 < k < 10$  :

- ❖ modifier la composition de phase mobile
- ❖ modifier la température de la colonne
- ❖ modifier la phase stationnaire

## 2. La chromatographie planaire

### 2.1. Chromatographie sur couche mince

#### 2.1.1. Définition

La chromatographie sur couche mince est la plus simple des méthodes chromatographiques. Elle consiste à placer sur une feuille (papier, silice ou autre....) une tache et de la laisser éluer en la trempant dans un solvant ou un mélange de solvant (appelé **éluant**), l'éluant diffuse le long du support. La tache migre sur la feuille plus ou moins vite selon la nature des interactions qu'elle subit de la part du support et de l'éluant.

Suivant la nature des phases stationnaires et mobiles, la séparation est due :

- Soit un phénomène d'adsorption ;
- Soit un phénomène de partage ;
- Ou la superposition des deux phénomènes.

#### 2.1.2. Mise en œuvre de la chromatographie planaire

La séparation par chromatographie planaire des constituants de l'échantillon est réalisée sur une fine couche (100–200 µm) de phase stationnaire, généralement à base de gel de silice, déposée sur une plaque rectangulaire de verre, de plastique ou d'aluminium, de quelques centimètres de côté. Pour maintenir la phase stationnaire sur le support et assurer la cohésion des particules, un liant organique est incorporé au cours de la fabrication de la plaque.

**Tableau II.1.** Phases stationnaires utilisés en chromatographie CCM.

	Exemple	Phénomène mis en jeu
Phases stationnaires polaires	Silice	Adsorption et partage
	Alumine	Adsorption-partage
	Poudre de cellulose	Partage
	Terre siliceuse de diatomées	Adsorption-partage
	diéthylaminoéthylcellulose	Echange d'ions
	Polyamide	Partage
Phases stationnaires peu polaires	Alkyle (C <sub>2</sub> , C <sub>8</sub> , C <sub>18</sub> )	Partage
	Diphényle	Partage
	Celluloses acétylées	Partage

Phases stationnaire chirales	Silices greffées C18 imprégnées d'un sélecteur chiral	Partage
	Silices imprégnées de cyclodextrines .	Partage
	Cellulose modifiée	Partage

### a. Dépôt de l'échantillon

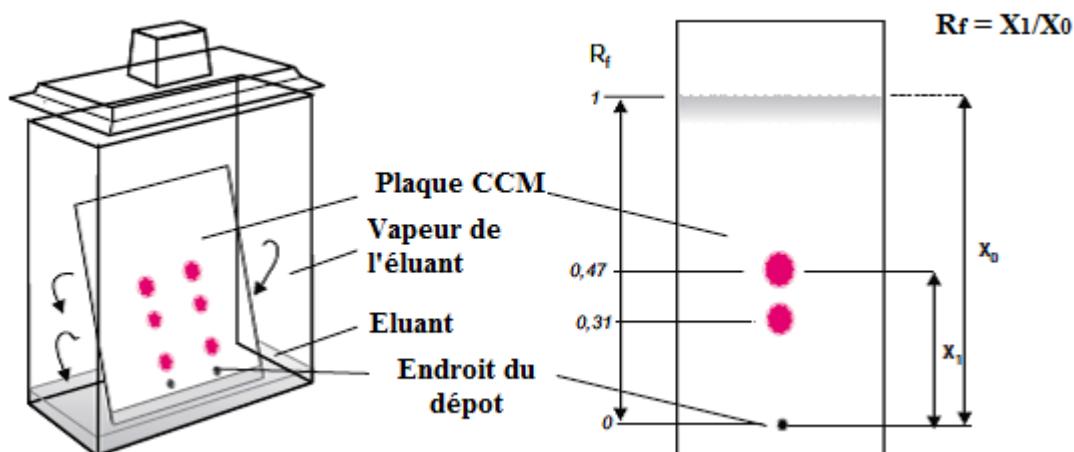
On commence par déposer un petit volume de l'échantillon en solution diluée, à proximité du bord inférieur de la plaque sous forme d'une tache de 1 à 3 mm de diamètre. Ce dépôt est réalisé soit manuellement, soit de manière automatique, avec un capillaire à extrémité plane.

La plaque ainsi préparée est introduite dans une cuve spéciale munie d'un couvercle, au fond de laquelle se trouve un peu de la phase mobile servant d'éluant. L'endroit où l'échantillon se trouve doit être situé au-dessus du niveau d'immersion.

### b. Développement de la plaque

La phase mobile migre par capillarité à travers la phase stationnaire sèche, entraînant à des vitesses différentes les constituants à séparer. Le temps de migration (plusieurs minutes) dépend de divers paramètres (figure II.6).

Quand le front de solvant a parcouru une distance considérée comme suffisante (quelques centimètres), on retire la plaque de la cuve, on repère la position limite atteinte par la phase mobile et on évapore cette dernière.

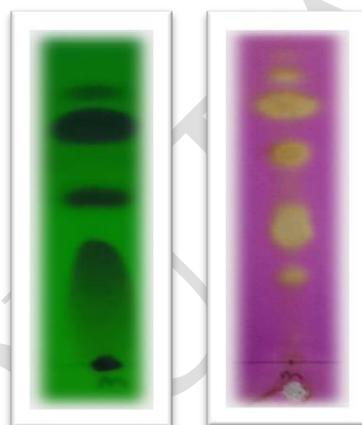


**Figure II.6.** Chambre de développement à cuve verticale et plaque CCM.

### c. Révélation de la plaque CCM

La localisation des composés après migration se fait sur la plaque par le biais de plusieurs révélateurs, spectroscopiques ou chimiques.

- **Soit à l'aide d'une lampe UV à vapeur de mercure ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ):** Tout composé qui absorbe à cette longueur d'onde (tel que les composés aromatiques) apparaît sous forme d'une tache sombre (ou colorée) sur un fond illuminé en vert (due à la présence des sels de zinc sur la phase stationnaire).
- **Soit à l'aide des révélateurs chimiques:** cette méthode consiste à carboniser les composés en chauffant la plaque après l'avoir soumise à une pulvérisation d'acide sulfurique; ou la révélation par immersion dans des réactifs généraux (acide phosphomolybdique, vanilline, Iode,  $\text{KMnO}_4$ ), ou spécifiques (ninhydrine en solution alcoolique pour les acides aminés, par exemple).



**Figure II.7.** Plaques révélées à l'aide d'une lampe UV.

#### 2.1.3. Paramètres de séparation et de rétention

- Chaque composé est défini par son  $R_f$ , (abréviation de « *rappart frontal* »), qui correspond à sa migration relative par rapport au solvant :

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par le soluté}}{\text{Distance parcourue par par le front de solvant}} = \frac{X}{X_0}$$

- On définit l'efficacité  $N$  et la hauteur d'un plateau théorique de la plaque **H** pour un composé dont la distance de migration est  $x$  et le diamètre du spot  $\omega$  par les relations suivantes:

$$N = \frac{16X^2}{\omega^2}$$

$$H = \frac{X}{N}$$

- Pour calculer le facteur de rétention  $k$  d'un composé ou la sélectivité ou la résolution  $R$  entre deux composés on fait généralement correspondre les distances de migration sur la plaque aux temps de migration lus sur un chromatogramme.

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

$$R = 2 \frac{X_2 - X_1}{\omega_2 + \omega_1}$$

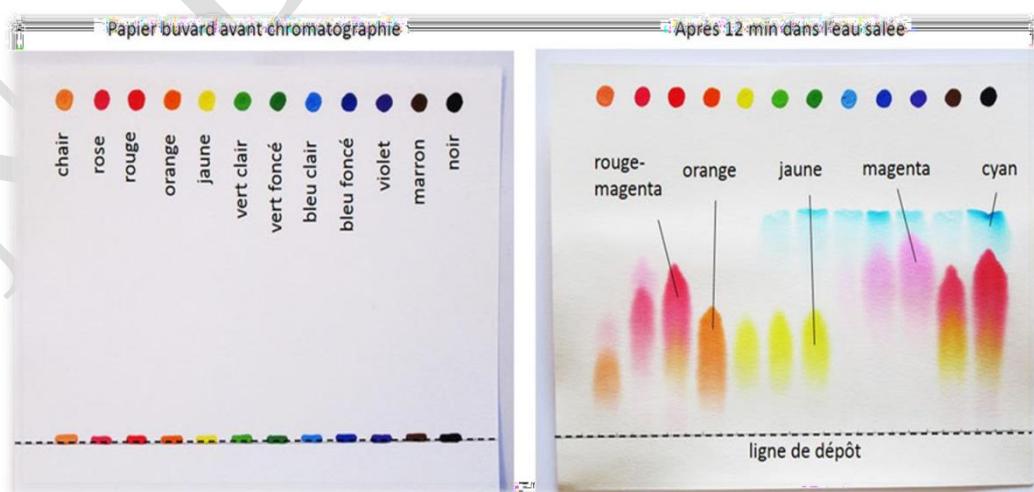
## 2.2. Chromatographie sur papier

### 2.2.1. Définition

La chromatographie sur papier est une technique de chromatographie planaire possède les mêmes étapes et principes de séparation de la chromatographie sur couche mince; la différence entre les deux techniques c'est la nature de la phase stationnaire.

### 2.2.2. Principe

Il s'agissait d'une chromatographie de partage liquide-liquide dans laquelle une feuille de papier servait de support à la phase liquide stationnaire, généralement aqueuse. En effet, l'eau se lie aux molécules de cellulose constituant le papier et il se forme un gel qui est la véritable phase stationnaire. La feuille est parcourue par la phase mobile et le partage des substances s'effectue entre celle-ci et le gel. On se borne à effectuer un développement et non une élution, les substances restant sur le papier où elles sont révélées par un procédé convenable. C'est une méthode qualitative. Chaque substance est identifiée par son  $R_f$  (figure II.8).



**Figure II.8.** Chromatographie sur papier.

### 2.2.3. Appareillage

- **Papier** : papier spéciaux de grain parfaitement homogène (Whatman®....)
- **Cuves** : enceinte close pour maintenir une atmosphère saturée en eau ou en solvant organique.

### 2.2.4. Techniques de développement

La phase mobile est constituée de deux manières :

- Eau saturée de solvant organique ;
- De solution organique saturée d'eau.

Exp : la formule la plus connue (n-butanol, acide acétique et eau distillés).

Après dépôt des échantillons, la feuille de papier est développée en mode vertical (ascendant ou descendant) ou circulaire. Il est également possible de réaliser des chromatographies bidimensionnelles comme dans la CCM.

## 2.3. Application

Il s'agit de techniques peu couteuses dont les applications sont nombreuses dans des domaines très variés : analyse agroalimentaires, pharmaceutiques, toxicologiques, biologiques....

Citons quelques exemples :

- L'identification des matières premières et des principes actifs dans les formes pharmaceutiques.
- La recherche d'impuretés dans les matières premières.
- Le contrôle de préparation radiopharmaceutiques.
- L'évaluation des interactions contenant-contenu.
- L'évaluation des résidus après nettoyage des réacteurs de fabrication.

## 3. Chromatographie sur colonne par gravité

### 3.1. Définition

Il s'agit en général d'un tube cylindrique vertical de longueurs et diamètres variables. La partie inférieure est obturée par une plaque de verre fritté ou un tampon de coton de verre pour les techniques manuelles, ou par des frittés métalliques de porosité égale ou inférieure à 2 µm.

### 3.2. Remplissage de la colonne

#### 3.2.1. Remplissage par voie sèche

La phase stationnaire est formée, ou supportée par de petites particules solides, de granulométrie bien définie et se présente sous forme pulvérulente. Elle est versée dans la colonne par fractions et légèrement tassée. Ce tassement est complété par l'introduction de petites quantités de phase mobile par écoulement, assurant la répartition homogène de l'ensemble. L'excès de la phase mobile s'élimine à l'extrémité de la colonne sans oublier de maintenir une petite quantité de liquide au-dessus de la phase stationnaire, afin d'éviter sa dessiccation.

#### 3.2.2. Remplissage par voie humide

La phase stationnaire est mis en suspension dans un très petit volume de phase mobile et laissée sous agitation jusqu'à obtention d'un mélange homogène. Le mélange obtenu est versé dans la colonne et l'excès de solvant est éliminé comme précédemment.

Ce procédé a l'avantage de permettre l'élimination des bulles d'air souvent présentes.

### 3.3. Mise en œuvre de la chromatographie sur colonne

Le mélange de substances à chromatographier est mis en solution dans la plus faible quantité possible de solvant, et déposer en une seule fois au sommet de la colonne.

La phase mobile est ensuite introduite, soit manuellement, soit par écoulement, à partir de réservoirs placés au-dessus des colonnes. Le débit de la colonne est réglé afin de rester constant pendant toute l'opération (figure II.9).

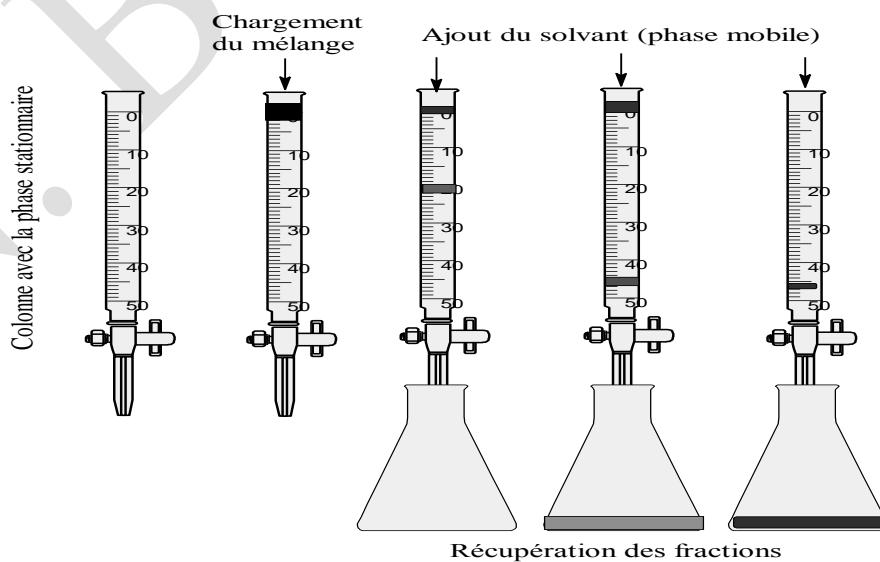


Figure II.9. Schéma simplifié d'une chromatographie liquide.

## 4. Chromatographie Liquide à haute performance

### 4.1. Définition

La chromatographie liquide haute performance, souvent désignée par son abréviation CLHP – HPLC en anglais –, constitue une technique analytique très générale d'emploi. Elle dérive de la forme la plus ancienne de la chromatographie liquide sur colonne dont les performances, en termes de sélectivité et de résolution, se sont trouvées grandement améliorées par la miniaturisation et l'utilisation de phases stationnaires très élaborées.

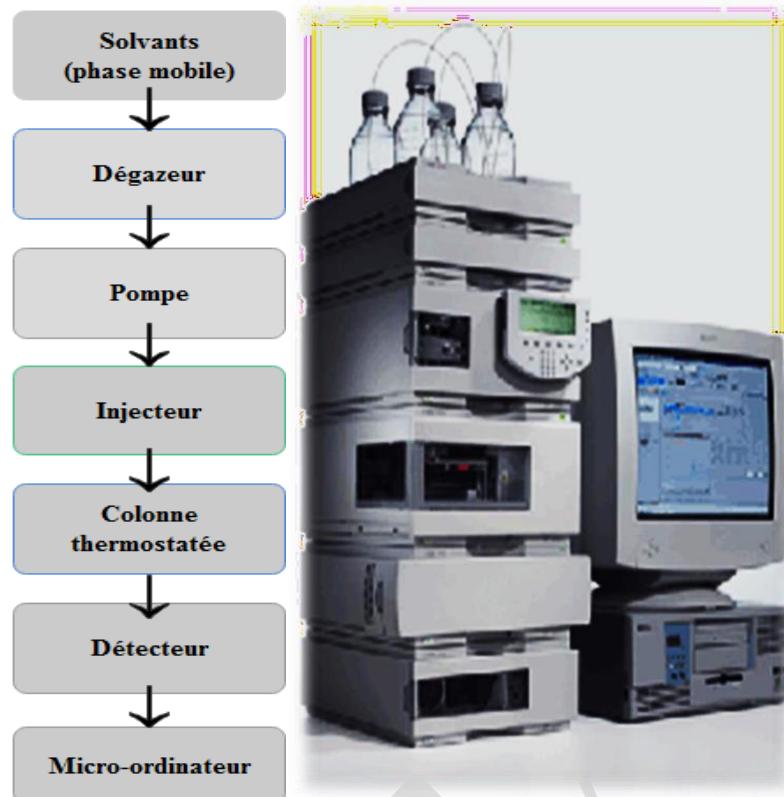
Ces phases, constituées de micro-particules sphériques dont le diamètre est compris entre 2-10 µm conduisent à une perte de charge importante dans la colonne. Ce qui a conduit à exercer sur la phase mobile une forte pression pour obtenir un débit convenable. Pour marquer cette particularité de la technique, la lettre P du sigle CLHP a pendant longtemps correspondu au mot pression. Aujourd'hui le P a été attribué à Performance afin de marquer l'innovation de cette technique de séparation.

### 4.2. Appareillage

Dans tout appareil de chromatographie liquide haute performance on retrouvera toujours les éléments de base suivants :

- un ou plusieurs réservoirs de phase mobile contenant soit des solvants purs soit des mélanges de solvants dans des concentrations connues.
- un système d'injection comportant une boucle d'échantillonnage calibrée (généralement une vanne RHEODYNE).
- une colonne remplie, en acier inox, de quelques centimètres de long.
- Un détecteur permettant à la fois, de mettre en évidence la sortie des solutés de la colonne et de donner un signal proportionnel à la quantité de chacun de ces solutés dans un mélange.

La phase mobile est pompée à partir d'un réservoir et parcourt en permanence le chromatographe : l'injecteur, la colonne dans le four et le détecteur. La température du four est maintenue constante. Le signal du détecteur est amplifié et enregistré (figure II.10).



**Figure II.10.** Schéma d'une installation de CLHP.

### 4.3. Etude détaillée des éléments d'un appareil HPLC

#### 4.3.1. Réservoir de solvant (éluant)

Il contient la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluant bien fermé (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'élution (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe doseuse.

L'éluant utilisé doit être de pureté analytique et filtré à l'aide d'un filtre en acier inoxydable, qui est placé à l'intérieur du réservoir.

La phase mobile doit être exempte des gaz dissous ( $N_2$ ,  $O_2$ ,  $CO_2$ ...). Pour cela elle doit être préalablement dégazée.

#### 4.3.2. Pompe

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

- ***En mode isocratique***, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.

- ***En mode gradient***, c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluants.

Les pompes actuelles ont des pressions maximales de refoulement voisines de 400 bar et un débit variable de quelques  $\mu\text{l}$  à plusieurs  $\text{ml}/\text{min}$ .

Les pompes sont appelées binaires, ternaires, quaternaires suivant le nombre de solvants qu'elles peuvent mélanger (la figure ci-dessous présente une pompe binaire).

Cependant, ces pompes assurent des débits stables (pompes débit-métriques).

#### 4.3.3. Vanne d'injection

C'est un injecteur à boucles d'échantillonnage. Il existe des boucles de différents volumes. Le choix du volume de la boucle se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser. Le système de la boucle d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, ce qui est important pour l'analyse quantitative (figure II.11).

L'injecteur fonctionne en deux positions :

- Position chargement (LOAD) : communication entre la pompe et la colonne seulement.
- Position injection (INJECT) : en tournant la vanne en position inject, le contenu de la boucle est dirigé vers la colonne.

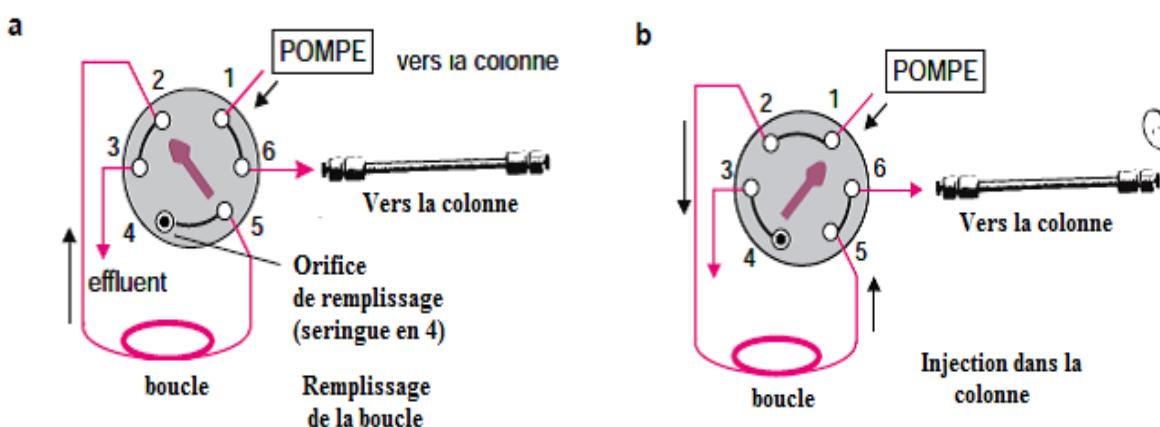


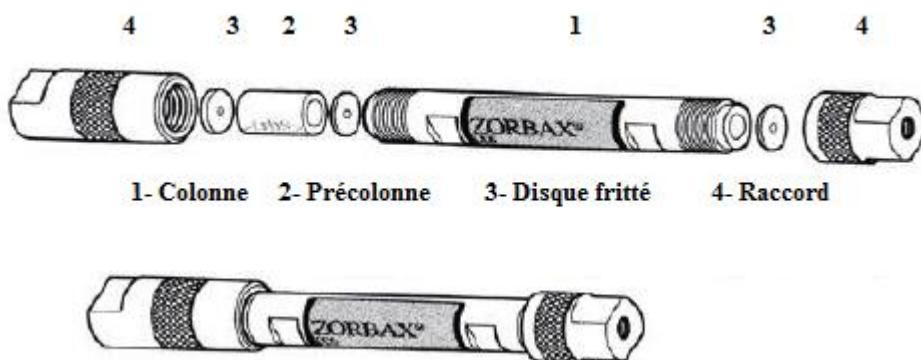
Figure II.11. Injection avec une boucle.

a : Remplissage de la boucle. Dans cette étape, la seringue est introduite à la position n° 4 ;

b : injection dans la colonne (noter la nouvelle position de la manette).

#### 4.3.4. Colonne

Une colonne est un tube construit dans un matériau le plus possible inerte aux produits chimiques, souvent en acier inoxydable. Sa section est constante, de diamètre compris entre 4 et 20 mm pour des longueurs généralement de 5 à 30 cm. Au-delà, les importantes pertes de charges exigeraient des pressions de liquide beaucoup trop élevées. La colonne est souvent précédée d'une précolonне, dite *colonne de garde*, courte (0,4 à 1 cm), remplie de la même phase stationnaire, ce qui sert à retenir certaines impuretés (figure II.12).



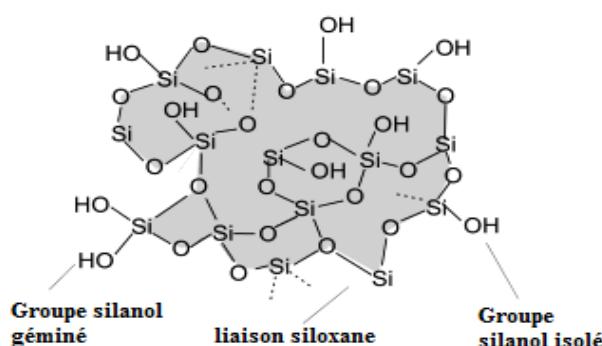
**Figure II.12.** Colonne standard et précolonne de CLHP.

#### 4.3.5. Phase stationnaire

En CLHP, la phase stationnaire peut être une phase normale ou une phase inverse.

##### a. Phase normale

La phase normale est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire ou peu polaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête. L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations. Le mécanisme de rétention repose dans ce cas essentiellement sur le phénomène d'adsorption.

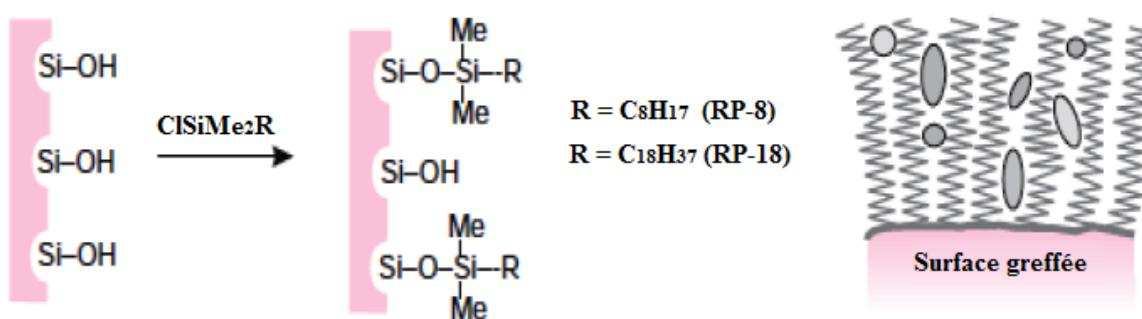


**Figure II.13.** Le gel de silice pour chromatographie.

### b. Phase inverse

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (ACN, MeOH, H<sub>2</sub>O). La surface du gel de silice greffée est assimilé à un liquide immobilisé, ce qui met en jeu un phénomène de partage (figure II.14).

Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante.



#### 4.3.6. Phase mobile

L'interaction plus ou moins forte entre la phase mobile et la phase stationnaire normale ou à polarité inversée se répercute sur les temps de rétention des solutés. La polarité de la phase stationnaire permet de distinguer deux situations de principe :

- ✓ si la phase stationnaire est polaire, on utilisera une phase mobile peu polaire la chromatographie est dite en *phase normale* ;
- ✓ si la phase stationnaire est très peu polaire, on choisira une phase mobile polaire (le plus souvent des mélanges de méthanol ou d'acétonitrile avec de l'eau), c'est la chromatographie en *phase inverse*.

En modifiant la polarité de la phase mobile, on agit sur les facteurs de rétention k des composés. Les silices greffées conduisent en général à une perte importante de polarité. Avec une phase greffée, l'ordre d'élution est opposé à celui auquel on est habitué avec les phases normales. Ainsi avec un éluant polaire, un composé polaire migre plus vite qu'un composé apolaire. Dans ces conditions les hydrocarbures sont fortement retenus. On réalise des gradients d'élution en diminuant au cours de la séparation la polarité de l'éluant (ex : mélange

eau /acétonitrile dont la concentration en acétonitrile va en croissant au cours de l'élution). On peut, en mélangeant plusieurs solvants, ajuster le pouvoir d'élution de la phase mobile.

En plus du pouvoir d'élution le choix de la phase mobile dépend aussi d'un certain nombre de facteurs dont les plus importants sont la solubilité de l'échantillon, la compatibilité de la phase mobile avec le détecteur et la viscosité de la phase mobile.

Aucun de ces paramètres n'est une variable indépendante et le meilleur solvant est donc celui qui donne une réponse optimale à toutes ces conditions.

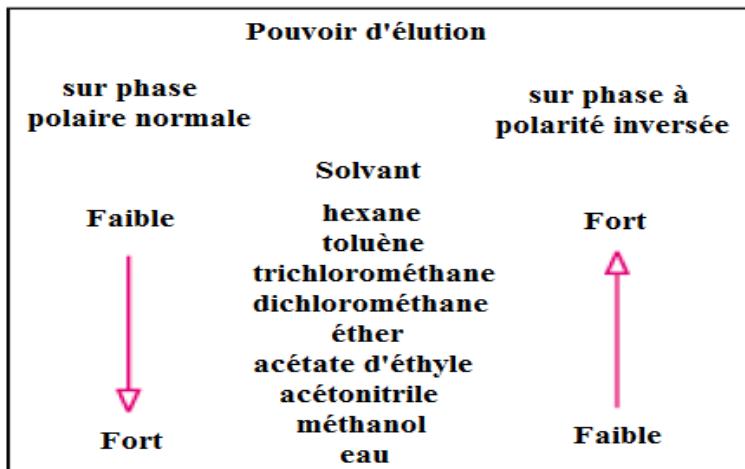


Figure II.15. « Force d'élution » des solvants utilisés comme phases mobiles.

#### 4.4. DéTECTEURS

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

Le détecteur le plus utilisé en HPLC est un spectrophotomètre d'absorption UV-visible (190-600 nm) relié à la sortie de colonne.

Il existe d'autres détecteurs :

- Réfractomètre différentiel
- UV à barrette de diodes
- Electrochimique
- Fluorimétrique...

Ainsi que différents types de couplage :

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

#### 4.5. Quelques applications

Etant donné le champ d'application immense de cette technique, on utilise dans tous les secteurs :

- **Agroalimentaire :**

- La détermination de la teneur en acides carboxyliques (acide lactique, acétique, tartarique, malique.....)

- **Pharmacie :**

- La recherche d'impuretés dans les matières premières ;
- L'analyse quantitative et identification du principe actif dans les préparations pharmaceutiques.
- Les études pharmacocinétiques et métaboliques de médicaments ;
- Les études de suivi thérapeutique : analyse de médicaments à marge thérapeutique étroite dans les milieux biologiques (plasma) pour ajuster leur posologie.

- **Biopharmaceutique**

- Analyse de masses molaires de polypeptides, protéines, nucléotides....

### 5. Chromatographie en phase gazeuse GC

#### 5.1. Définition

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique très répandue, dans le domaine industrielle ou la recherche scientifique, son développement est dû, principalement, à plusieurs avantages:

- A son extrême sensibilité
- A sa polyvalence
- Aux possibilités d'automatisation
- A la rapidité de mise au point des nouvelles analyses

Cependant, l'utilisation de la CPG se fait sur des composés qui doivent être à l'état gazeux, l'analyse des liquides ou solides impose de pouvoir les transformer à l'état de vapeur par chauffage. Ce qui présente l'inconvénient majeur de cette techniques puisqu'elle limite son emploi à l'étude des composés moléculaires thermostables et suffisamment volatils. On distingue deux types de CPG selon la phase stationnaire:

- ✓ **La chromatographie gaz-liquide :** la phase stationnaire est un liquide immobilisé sur un support solide par imprégnation ou par greffage.

- ✓ **La chromatographie gaz-solide** : la phase stationnaire est un solide poreux, réservé à l'analyse de mélanges de gaz ou de liquides à bas points d'ébullition.

## 5.2. Description de l'appareil CPG

Un appareil de CPG réunit les compartiments suivants: injecteur, colonne, détecteur et un four thermostaté qui permet de porter la colonne à une température bien déterminé. La phase mobile qui entraîne l'échantillon dans la colonne est un gaz, appelé *gaz vecteur*. Les débits, contrôlés avec précision, permettent une grande reproductibilité des temps de rétention (figure II.16).

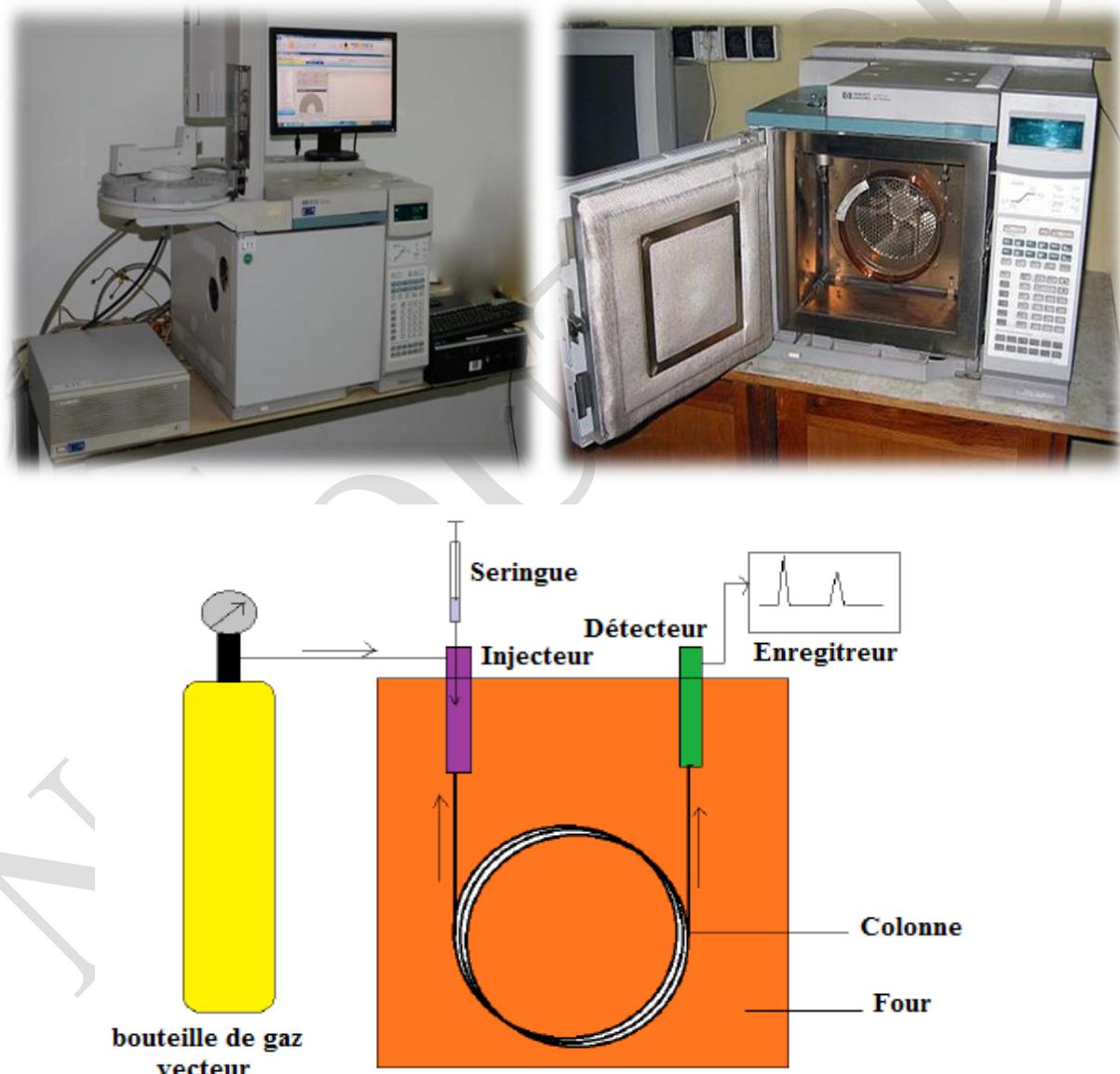


Figure II.16. Une installation de CPG.

L'analyse débute à l'instant où on introduit une très petite quantité de l'échantillon, sous forme liquide ou gazeuse, dans l'injecteur, qui a la double fonction de le porter à l'état de vapeur et de l'amener dans le flux gazeux en tête de la colonne. La colonne est placée dans une enceinte à température régulée. La phase gazeuse qui a traversé la colonne passe dans un détecteur avant de sortir à l'air libre.

### 5.3. Gaz vecteur

Les gaz vecteurs (gaz porteur) doivent être inerte chimiquement vis-à-vis des solutés, comme c'est le cas pour : l'hélium, l'azote, l'argon, le dioxyde de carbone et l'hydrogène. Ils proviennent soit d'un cylindre sous pression soit d'un générateur (électrolyse de l'eau pour H<sub>2</sub> et séparation de l'air pour N<sub>2</sub>). Le choix du gaz vecteur est souvent dicté par le type de détecteur utilisé. Le débit est généralement contrôlé par le régulateur de pression.

Le rôle du gaz vecteur est de pousser les solutés à traverser la colonne sous une faible pression en l'absence d'interaction entre gaz et solutés. En effet en CPG le facteur principal qui modifie les propriétés de la séparation est la température. Cependant, 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.

### 5.4. Injecteur

Une très petite quantité d'échantillon en solution (0,5 µl), est introduite dans l'appareil avec une micro seringue dont il existe de nombreux modèles adaptés aux divers injecteurs et colonnes (figure II.17).

Pour mieux maîtriser la reproductibilité des résultats on adapte un injecteur automatique grâce auquel les mouvements de la seringue sont automatisés. Associé à porte-échantillons, il devient possible de programmer la séquence cyclique de prélèvement de l'échantillon, de son introduction très rapide dans l'injecteur et du rinçage de la seringue.



**Figure II.17.** Seringue de 10 µL d'un type courant, utilisé en CPG.

## 5.5. Types des injecteurs

L'injecteur est la porte d'entrée de l'échantillon dans le chromatographe. Il a deux autres fonctions : vaporiser et entraîner en tête de colonne l'échantillon mélangé au gaz vecteur. Les caractéristiques des injecteurs, ainsi que les modes d'injection, diffèrent suivant les types de colonnes auxquels ils sont réunis.

On distingue trois types d'injecteurs:

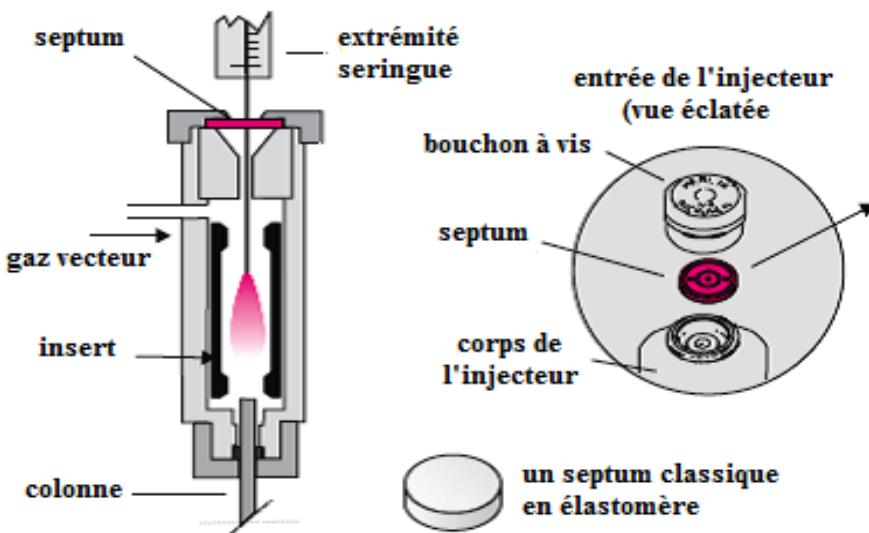
- Injecteur à vaporisation directe.
- Injecteur avec ou sans division.
- Injecteur à température programmable.

### 5.5.1. Injecteur à vaporisation directe

Il consiste en un tube métallique doublé d'un chemisage de verre (appelé insert), balayé par le gaz vecteur et chauffé à la température moyenne d'ébullition des composés à chromatographier.

L'aiguille de la micro seringue contenant l'échantillon traverse l'une des extrémités de l'injecteur obturée par une pastille d'élastomère siliconé (le septum). L'autre extrémité est raccordée à la colonne également chauffée. La totalité de l'échantillon introduit, immédiatement vaporisé, part dans la colonne en quelques secondes (figure II.18).

Cette méthode convient pour les colonnes remplies et les grosses colonnes capillaires, quand le débit de gaz vecteur atteint au moins 8 ml/min.



**Figure II.18.** Injecteur à vaporisation directe utilisé pour colonnes remplies.

### 5.5.2. Injecteur avec ou sans division (encore appelés split ou splitless)

Pour les colonnes capillaires, à faible capacité d'échantillon, les plus petits volumes qu'il est possible de prélever avec une micro seringue (0,1 ml) peuvent saturer la colonne. On utilise alors des injecteurs pouvant fonctionner suivant deux modes, avec ou sans division.

Un courant de gaz vecteur arrive avec un grand débit dans la chambre de vaporisation où il se mélange à l'échantillon injecté. Généralement on parle de rapport de division (split ratio) qui peut être varié de 20 à 500.

$$\text{Rapport de division} = \frac{\text{débit sortie split} + \text{débit sortie colonne}}{\text{débit sortie colonne}}$$

Ce type d'injecteur peut également fonctionner en mode splitless. Dans ce mode d'introduction réservé aux échantillons en solution très diluée, on injecte lentement le contenu de la micro seringue en laissant la vanne 2 en position fermée durant 0,5 à 1 minute afin que les composés vaporisés avec le solvant se concentrent dans les tout premiers décimètres de la colonne. L'ouverture de la vanne 2 élimine de l'injecteur l'excès d'échantillon (figure 42 à gauche).

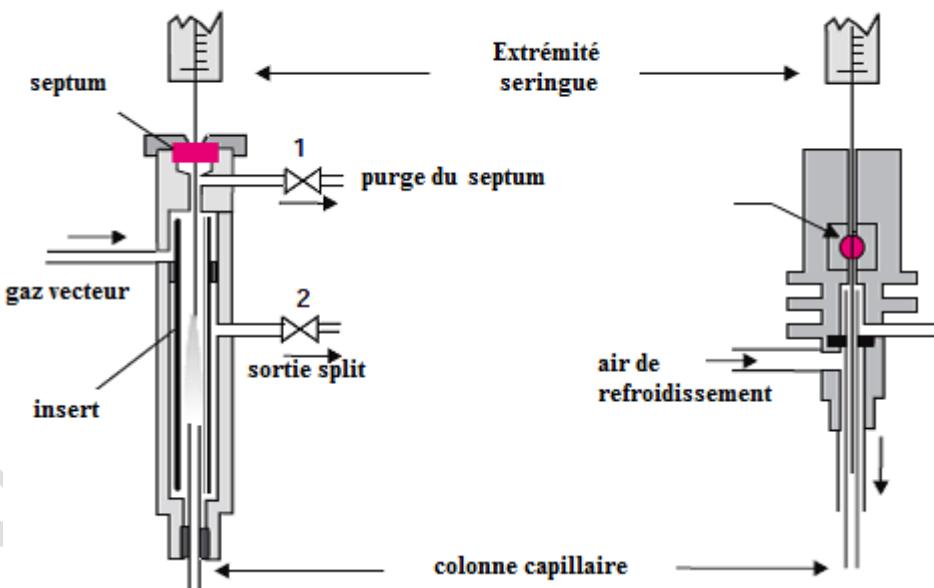


Figure II.19. Injecteurs.

### 5.5.3. Injecteur à température programmable

Cet injecteur encore appelé PTV, (*Programmed Temperature Vaporizer*), est de conception analogue à celle de l'injecteur split/splitless. Cependant la température de la chambre d'injection peut être programmée, de 20 à plus de 300°C (figure 42 à droite).

Ses trois principaux modes de fonctionnement sont l'injection à froid en mode split, l'injection à froid en mode splitless et l'injection avec élimination du solvant.

Dans l'injection avec division, à froid, l'échantillon est introduit dans la chambre de vaporisation froide. Comme l'échantillon n'est pas instantanément vaporisé, le solvant et les différents composés pénètrent dans la colonne dans l'ordre de leur point d'ébullition.

L'injection sans division, à froid, est utilisée pour l'analyse de traces.

Dans le mode injection avec élimination de solvant, l'échantillon est introduit dans l'injecteur froid. Après injection, la vanne de fuite est ouverte pour éliminer tout le solvant pour un temps programmé (généralement 2 min). Puis l'injecteur est ensuite chauffé pour permettre le transfert des composés lourds dans la colonne.

### 5.6. Enceinte thermostatée

Le chromatographe comporte une enceinte qui permet de chauffer la colonne jusqu'à plus de 400°C. Elle doit avoir une faible inertie thermique pour permettre une montée contrôlée et rapide en température (rampe pouvant aller jusqu'à 100°C/min) et une excellente stabilisation.

En adjoignant une vanne cryogénique alimentée par N<sub>2</sub> ou CO<sub>2</sub> liquides, l'enceinte peut être régulée à basse température.

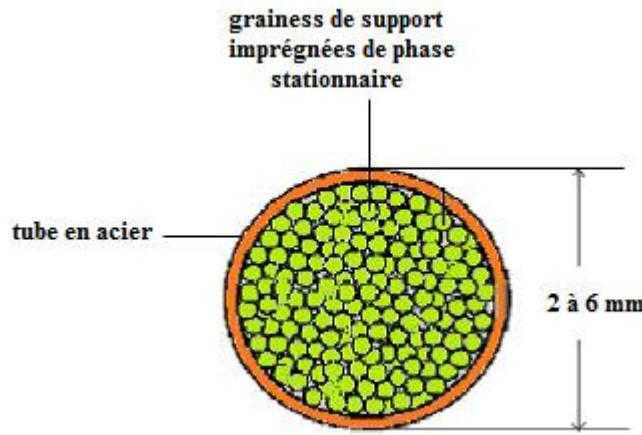
### 5.7. Colonnes et types des colonnes

Il existe deux types de colonnes, les colonnes *remplies* (ou colonnes à *garnissage*) et les colonnes *capillaires*. Pour les colonnes remplies, la phase stationnaire est immobilisée par imprégnation ou par réaction chimique avec le support poreux. Pour les colonnes capillaires, une faible épaisseur de phase stationnaire est soit déposée, soit greffée sur la surface interne de la colonne.

#### 5.7.1. Colonnes remplies:

Ces colonnes, d'un diamètre de 2 ou 6 mm et de 1 à 3 m de long, sont fabriquées à partir d'un tube d'acier ou de verre dont la paroi interne est traitée pour éviter d'éventuels effets catalytiques sur l'échantillon. Elles supportent un débit de gaz vecteur allant de 10 à 40 ml/min. Elles contiennent un support poreux et inerte (figure II.20).

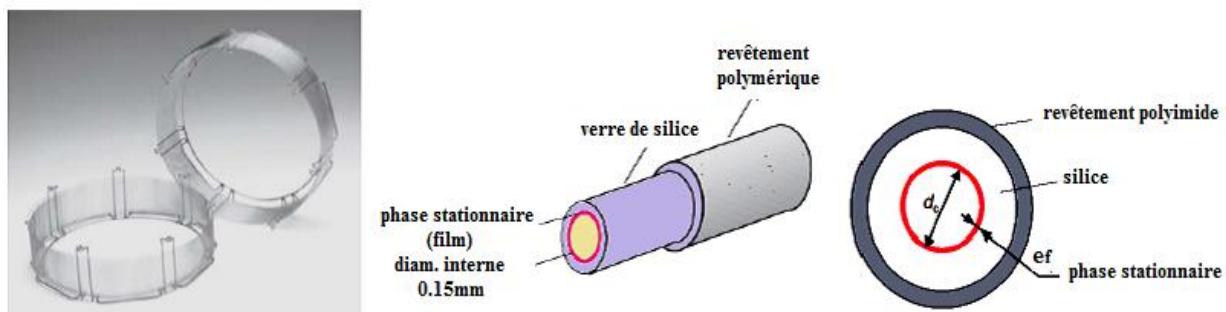
Ce type de colonne n'est pas adapté aux analyses de traces.



**Figure II.20.** Colonne remplie

### 5.7.2. Colonnes capillaires:

Elles sont généralement en *silice fondu* de grande pureté, le diamètre interne de ces colonnes varie de 100 à 530 µm avec une longueur peut aller jusqu'à 100 m pour. Elles comportent un revêtement extérieur brun de polyimide, polymère thermiquement stable ( $T_{max} = 370^{\circ}\text{C}$ ), pour les rendre moins fragiles et pouvoir les enruler sur elles-mêmes grâce à un support métallique adapté (figure II.21)..



**Figure II.21.** Colonne capillaires.

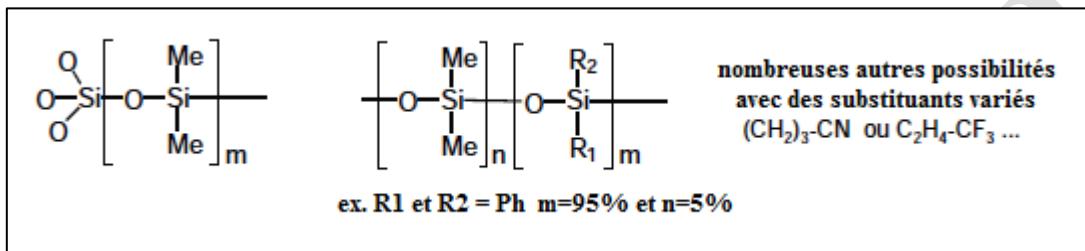
### 5.8. Phases stationnaires

On distingue quatre types de phase stationnaires:

#### 5.8.1. Phase stationnaire de type polysiloxanes

Les polysiloxanes (également connus sous le nom de gomme silicone) correspondent à la répétition d'un motif de base comportant deux chaînes carbonées par atome de silicium.

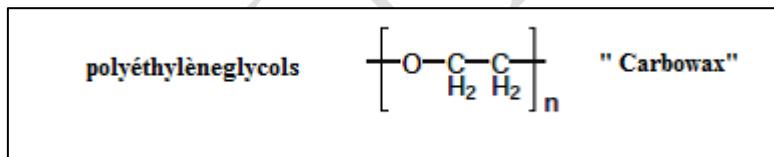
Les grandes firmes mondiales en commercialisent une vingtaine de diverses compositions avec des chaînes alkyles ou aryle pouvant comporter en plus des fonctions (ex. cyanopropyle, trifluoropropyle). Les monomères, combinés en diverses proportions, permettent de moduler les propriétés des phases stationnaires telles que la polarité et le domaine de stabilité. Grâce à leur gamme de température très étendue, ce sont, pour les colonnes capillaires, les phases les plus utilisées.



**Figure II.22.** Structure des polysiloxanes (silicones)

### 5.8.2. Phase stationnaire de type Polyéthylène glycols (PEG)

Les représentants les plus connus de cette famille sont les **Carbowax**, polymères polaires (1 500 < M < 20 000) qui peuvent être utilisés en mode déposé, imprégné ou greffé.



**Figure II.23.** Structure des polyéthylèneglycols.

### 5.8.3. Phase stationnaire chirale

Ce sont généralement des phases polysiloxanes contenant entre 10 et 20 % en masse de molécules de β- cyclodextrine (polysaccharide chiral) incluses dans le polymère de base.

On utilise ce type de colonne lorsqu'on s'intéresse à la pureté optique des analytes. Si un composé organique, par exemple, comporte un carbone asymétrique, les énantiomères *R* et *S* n'auront pas tout à fait la même affinité pour la phase stationnaire chargée en cyclodextrine ce qui se traduira par des temps de rétention différents. Donc un composé chimiquement pur à l'état de racémate donnera naissance à deux pics égaux, chacun correspondant à un seul énantiomère.

#### 5.8.4. Phase stationnaire solide

Ces phases sont constituées par des matériaux adsorbants divers : silice ou alumine désactivées par des sels minéraux, tamis moléculaires 5 Å, verres ou polymères poreux, carbone graphité. On les utilise pour séparer les composés gazeux ou très volatils. Les colonnes à phase graphite, par exemple, ont été développées pour la séparation de N<sub>2</sub>, CO, CO<sub>2</sub> et des hydrocarbures très légers.

#### 5.9. Principaux détecteurs

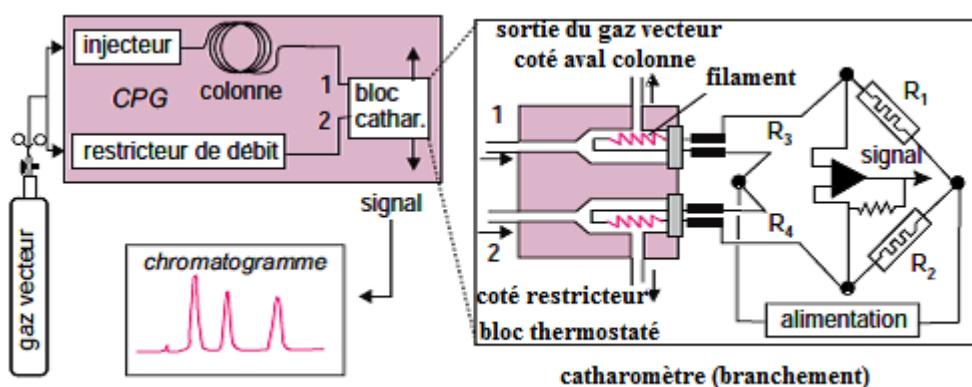
Certains détecteurs sont universels, c'est-à-dire qu'ils sont sensibles à pratiquement tous les composés élués, d'autres sont beaucoup plus sensibles à un type particulier de molécules. Tous les détecteurs donnent une réponse qui dépend de la concentration molaire ou massique du soluté dans le gaz vecteur. On distingue cinq types de détecteurs:

##### 5.9.1. Détecteur à conductibilité thermique (TCD) –catharomètre-

Détecteur à conductibilité thermique comprenant un montage différentiel opposé à une autre résistance ou ne circule que le gaz vecteur. Le déséquilibre de ce pont génère un signal qui indique la présence d'un soluté (figure II.24).

Caractéristiques :

- Volume de 20 µl à 140 µl
- Répond en concentration
- Contrôle de température est très important.



**Figure II.24.** Détecteur à conductibilité thermique.

### 5.9.2. DéTECTEUR à ionisation de flamme (FID)

Considéré comme pratiquement universel pour les composés organiques. 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 ( $10^{-12} \text{ A}$ ) entre deux électrodes. L'extrémité du brûleur sert d'électrode de polarisation. La seconde électrode, de forme annulaire, entoure la flamme.

Caractéristiques :

- Répond en masse.
- Bonne sensibilité.
- Le courant produit est quasi proportionnel au nombre d'atomes de carbone.

### 5.9.3. DéTECTEUR thermoionique (NPD)

Ce détecteur est très sensible aux composés azotés (N) ou phosphorés (P). Il comporte un petit cylindre en céramique dopée avec un sel alcalin (ex. sulfate de rubidium) auquel on applique une tension électrique pour entretenir un petit plasma ( $800^\circ\text{C}$ ) alimenté par combustion d'un mélange air/hydrogène. À la différence du FID la flamme est plus petite.

Les composés contenant N ou P donnent des fragments de décomposition transformés en ions négatifs. Ces ions sont recueillis sur une électrode collectrice (figure II.25).

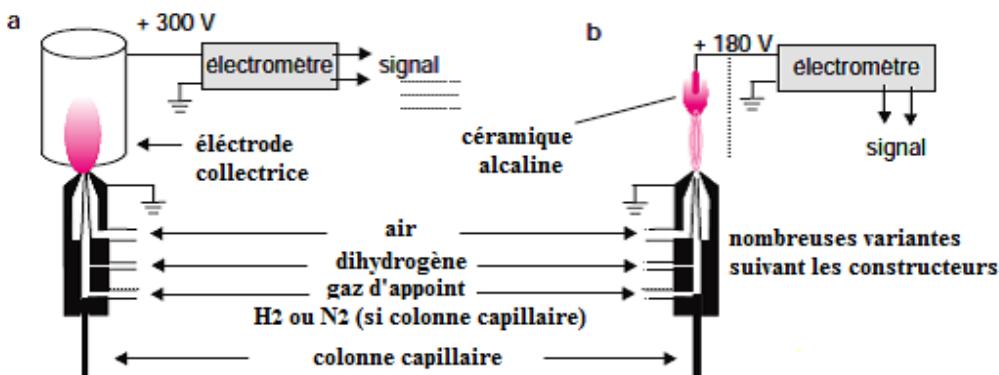


Figure II.25. Détecteurs FID (a) et NPD (b).

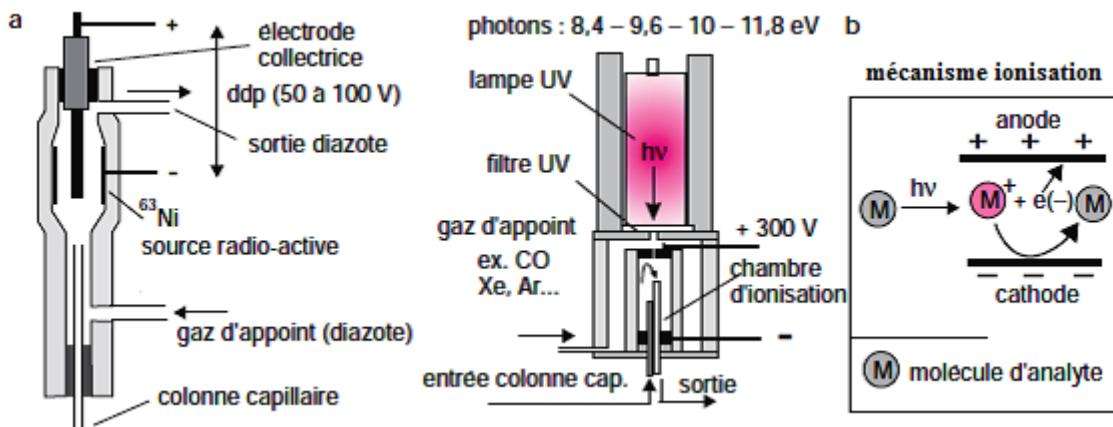
### 5.9.4. DéTECTEUR à capture d'électrons (ECD)

Ce détecteur considéré comme sélectif car il est beaucoup plus sensible aux dérivés halogénés. Un courant d'azote, ionisé par un flux d'électrons généré au moyen d'une source radioactive de faible énergie circule entre deux électrodes.

Si des molécules de soluté, contenant un halogène (F, Cl ou Br), traversent la zone entre les deux électrodes, elles captent une partie des électrons pour former des ions négatifs lourds, donc moins mobiles (figure II.26).

L'intensité recueillie suit une loi exponentielle décroissante du type :  $I = I_0 e^{-kc}$ .

- Très spécifique des composés halogénés.
- Répond en masse.



**Figure II.26.** DéTECTEURS à CAPTURE D'ÉLECTRONS (a) ET DÉTECTEUR À PHOTO-IONISATION (b).

### 5.9.5. DÉTECTEUR À PHOTO-IONISATION (PID)

Ce détecteur assez sélectif, convient aux hydrocarbures ainsi qu'aux dérivés contenant S ou P. Le principe consiste à irradier le composé élué avec une lampe UV émettant des photons très énergétiques (de 8,4 à 11,8 eV). La photo-ionisation se produit quand l'énergie du photon est supérieure à l'énergie de 1re ionisation du composé.

La collecte des électrons libérés par une électrode reliée à la borne d'un électromètre permet des mesures de concentrations. Il s'agit d'un détecteur qui peut fonctionner à plus de 400°C et qui n'est pas destructif, l'ionisation étant réversible et ne touchant qu'une faible fraction des molécules de chaque composé.

### 5.10. INDICE DE KOVATS

Kovats a élaboré une méthode pour caractériser sur une échelle absolue les temps de rétention. On caractérise chaque composé par son indice de rétention. Lorsqu'on injecte un mélange constitué de composés appartenant à une série homologues de n-alcane sur une colonne maintenue à régime isotherme, les logarithmes des temps de rétentions réduits  $t_r'$  croissent linéairement avec le nombre d'atomes de carbone des n-alcanes correspondants:

$$\ln t'_{r(n)} = an + b$$

$t'_{r(n)}$ : temps réduit de l'alcane ayant n atomes de carbone.

On injecte ensuite un composé X et on obtient un nouveau chromatogramme

$I_X$ : indice de rétention de X (indice de Kovats) est égal au produit par 100 du nombre apparent d'atomes de carbone de l'alcane théorique ayant le même temps de rétention. La méthode est basée sur les temps de rétention réduits  $t'_r$  des deux alcanes à  $n$  et  $n+1$  atomes de carbone qui encadrent X sur le chromatogramme.

L'objectif est de caractériser la rétention de différents solutés sur une phase stationnaire,

Pour un alcane linéaire :  $I = 100n$ , avec  $n$ : le nombre d'atomes de carbones.

**Ex:** I (pentane)= 500, I (hexane) = 600...

La droite de Kovats est établie sur une série d'homologues et dans les conditions opératoires fixées en régime isotherme et isobare.

Les indices  $I(X)$  se calculent de deux manières différentes suivant le fonctionnement en température du chromatographe.

- On injecte sur la colonne à température et pression donnés, les alcanes linéaires de formule  $C_nH_{2n+2}$  avec  $n \geq 5$ .
- On repère les temps de rétention réduits de ces alcanes  $t'_{r(n)}$  et  $t'_{r(n+1)}$  et celui du produit considéré  $t'_{r(X)}$ .

Si un soluté est élué entre les deux alcanes ( $n$ ) et ( $n+1$ ), son indice de rétention  $I_X$  est donné par la formule suivante:

$$I_X = 100n + 100 \frac{\log t'_{r(X)} - \log t'_{r(n)}}{\log t'_{r(n+1)} - \log t'_{r(n)}}$$

### 5.11. Constante de McReynolds des phases stationnaires

Pour définir la polarité d'une phase stationnaire, on compare les indices de kovats de 05 composés témoins, passés sur cette phase, possédant des structures différents (polarité etc....) et sur une phase témoin (squalane). On définit la constante de McReynolds comme étant la différence de l'indice de Kovats d'un composé passé sur la phase testée et son indice sur le squalane:

$$\text{Constante de McReynolds} = \Delta I = I_{\text{phase}} - I_{\text{squalane}}$$

La somme des 05 valeurs (05 composés) permet de définir la polarité de la phase stationnaire testée.

## 6. Chromatographie ionique

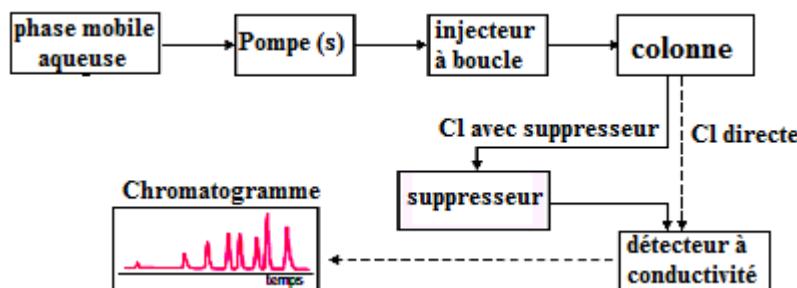
### 6.1. Définition

La chromatographie à échange d'ions (ou chromatographie à ions ou chromatographie échangeuse d'ions) est un type de chromatographie en phase liquide permettant d'isoler une substance chargée électriquement d'un mélange de molécules chargées (liquide). Pour cela, on fait passer le mélange sur une phase stationnaire (solide) chargée, déjà associée à des ions connus et on remplace ces ions par les ions/molécules chargées du mélange à séparer. C'est une technique chromatographique couramment utilisée en chimie analytique, notamment pour le contrôle de la qualité de l'eau. La chromatographie ionique est devenue depuis quelques années une des méthodes analytiques de références en analyse des eaux.

Ce processus d'échange est lent, comparé à ceux qui régissent les autres types de chromatographie.

### 6.2. Schéma de principe d'une installation de chromatographie ionique

On retrouve l'architecture modulaire classique de la chromatographie liquide, avec pour différence de pouvoir utiliser un mode de détection original basé sur la conductance des solutions. Cependant la nature et la concentration ionique de certaines phases mobiles sont à l'origine de difficultés avec ce mode de détection. On fait alors appel à un montage particulier comportant un « suppresseur », dispositif intercalé entre la colonne et le détecteur, qui a pour rôle d'éliminer les ions de l'éluant par réaction de type acido basique (Figure II.27).



**Figure II.27.** Schéma de principe d'une installation de chromatographie ionique.

### 6.3. Phases mobiles

Les éluants servant de phases mobiles sont des solutions aqueuses chargées d'ions salins ou organiques et, si nécessaire, d'un peu de méthanol ou d'acétone pour faciliter la dissolution de certains échantillons. Suivant le type, cationique ou anionique de la colonne, les ions de l'éluant sont apportés soit par des acides minéraux ou organiques (perchlorique, benzoïque,

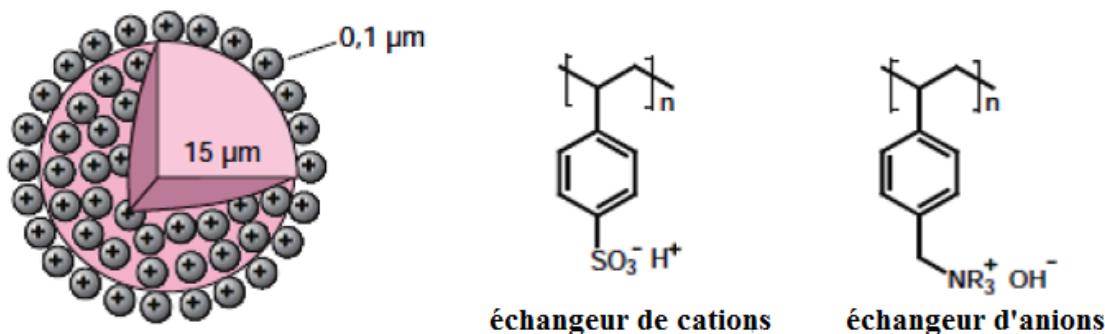
phtalique, méthanesulfonique...), soit par des bases (hydroxyde de potassium ou de sodium, carbonates ou bicarbonates...).

#### 6.4. Phases stationnaires

Les supports peuvent être de nature :

- ❖ Minérale : Silice
- ❖ Organique : synthétique ou naturelle
  - Synthétique : Résine polystyrénique
  - Naturelle : Cellulose ; Dextrans

Les phases stationnaires les plus connues sont obtenues par copolymérisation styrène/divinylbenzène afin d'obtenir des phases réticulées, résistantes à l'écrasement (figure II.28). Elles se présentent sous forme de particules sphériques d'un diamètre de quelques micromètres. Ces particules sont ensuite greffées pour en faire des polyanions ou polycations.



**Figure II.28.** Résine échangeuse d'ions en polystyrène réticulé.

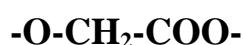
#### 6.5. Principe de séparation

Dans un premier temps, la résine est équilibrée dans un tampon dont le pH est tel que le groupement porté par l'échangeur d'ion soit ionisé :

- ❖ Dans le cas d'une base faible le pH doit être inférieur au pKa du groupement ionisable (ex : pKa du diéthylaminoethylammonium est de 9,5)

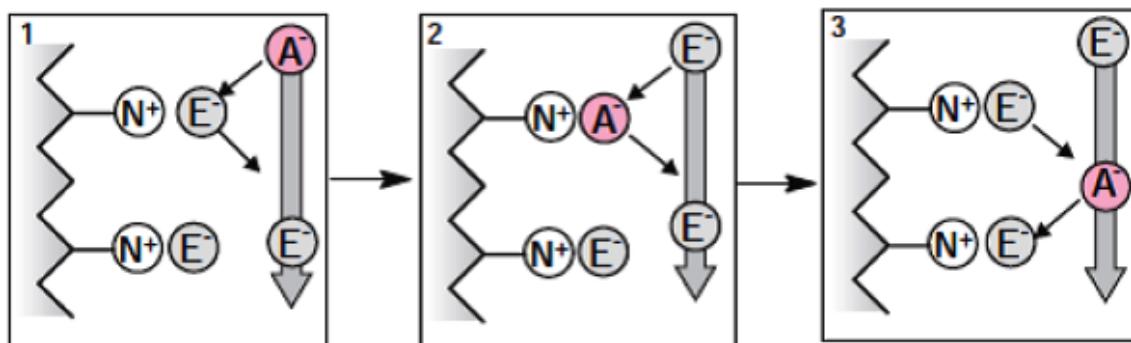


- ❖ Dans le cas d'un acide faible le pH doit être supérieur au pKa du groupement ionisable (ex : pKa du carboxymethyl est de 4)



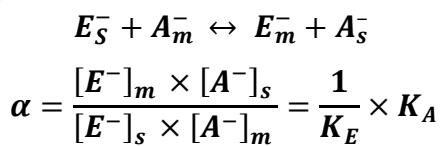
- Dans le cas d'une base ou un acide fort le groupement fonctionnel porte une charge net quelque soit le pH du milieu.

Pour comprendre le mécanisme d'une séparation, prenons pour exemple une colonne anionique comportant des groupements ammonium quaternaire, en équilibre avec une phase mobile riche en anions hydrogénocarbonates (contre-anions). Ainsi, tous les sites cationiques de la phase stationnaire se trouvent appariés avec les ions de la phase mobile. Lorsqu'un anion  $A^-$ , apporté par l'échantillon, est entraîné par l'éluant, une suite d'équilibres réversibles se produit, régis par une équation d'échange qui détermine sa répartition entre les deux phases, mobile (PM) et stationnaire (PS) (figure II.29).



**Figure II.29.** Principe de la chromatographie échangeuse d'ions.

Si  $s$  désigne une espèce  $A^-$  ou  $E^-$  fixée sur la phase stationnaire et  $m$ , une espèce dans la phase mobile, il s'établit un équilibre caractérisé par une constante d'échange  $\alpha$ , qui n'est autre que la sélectivité entre les deux ions  $E^-$  et  $A^-$  ( $\alpha = K_A / K_B$ ).



$K_A$  et  $K_E$  sont les coefficients de distribution (ici de partage ionique) des deux espèces.

Le phénomène d'échange, qui permet de retenir sur la résine les espèces polaires, est connu sous le nom d'extraction en phase solide.

Si l'échantillon contient deux ions X et Y et si  $K_Y > K_X$ , Y sera plus retenu par la colonne que X.

### 6.6. DéTECTEURS à conductivité

On trouve un mode de détection particulier basé sur la propriété des électrolytes de conduire le courant électrique : on mesure, en sortie de colonne, la conductance de la phase mobile entre deux microélectrodes. Pour pouvoir faire une mesure directe, il faut utiliser un éluant peu chargé en ions, possédant une faible conductance et disposer d'une cellule de mesure thermostatée, étant donné l'effet prononcé de la température sur la conductance. La cellule de mesure, disposée en aval de la colonne, est d'un volume très réduit (environ 2 µL). Pour améliorer la sensibilité de la méthode par détection conductimétrique, on intercale entre la colonne et le détecteur un système de neutralisation des ions de l'électrolyte, appelé **suppresseur**.

### 6.7. Le suppresseur d'ions de l'électrolyte

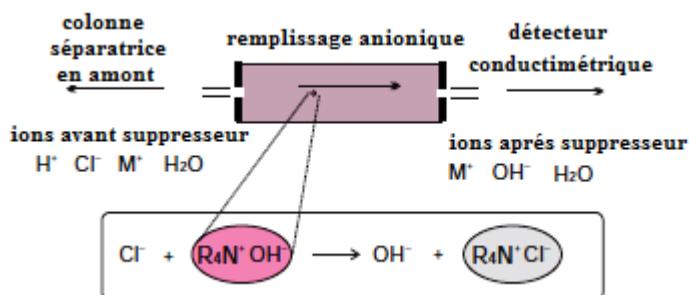
Pour améliorer la sensibilité de ce type de détection on intercale, entre la colonne et le détecteur, un dispositif destiné à échanger par capture les ions apportés par l'électrolyte, appelé **suppresseur**. Le but est de remplacer les ions initiaux de l'éluant par d'autres de plus faible conductivité.

Supposons que l'on ait séparé un mélange contenant les cations  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  avec une colonne cationique dont la phase mobile est de l'acide chlorhydrique dilué. En sortie de colonne, les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  sont accompagnés des ions  $\text{H}^+$  apportés par l'acide chlorhydrique.

Les ions chlorures assurent l'électroneutralité à l'ensemble du milieu. Après la colonne séparatrice, la phase mobile traverse une seconde colonne qui contient une résine anionique dont l'ion mobile est  $\text{OH}^-$ . Les ions  $\text{Cl}^-$  se fixent sur cette colonne en déplaçant les ions  $\text{OH}^-$  qui réagissent sur les ions  $\text{H}^+$  pour donner de l'eau. En aval du suppresseur, ne subsisteront dans l'eau que les espèces  $(\text{Na}^+\text{OH}^-)$  et  $(\text{K}^+\text{OH}^-)$  plus conductrices que  $(\text{Na}^+\text{Cl}^-)$  et  $(\text{K}^+\text{Cl}^-)$ .

Les ions  $\text{H}^+$  et  $\text{Cl}^-$  auront disparu. La détection des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  s'en trouvera exaltée (figure II.30).

Ce type de suppresseur a un inconvénient, son important volume mort qui diminue l'efficacité de la séparation par un nouveau mélange des ions avant leur détection. Il doit être régénéré périodiquement et n'est utilisable qu'en mode isocratique.



**Figure II.30.** Suppresseur chimique à colonne de neutralisation.

### 6.8. Séparation des acides aminés

La séparation et le dosage des mélanges d'acides aminés correspondent à une application classique de la chromatographie ionique couplée à une méthode colorimétrique. Les acides aminés ne pouvant être identifiés directement par absorption UV, on les fait réagir en sortie de colonne sur la ninhydrine pour faire apparaître, quel que soit l'acide aminé, le même dérivé coloré, aisément détectable par spectrophotométrie.

Pour séparer les acides aminés les uns des autres on utilise un appareillage spécialisé qui comporte une colonne cationique (polystyrène sulfoné) équilibrée avec une solution d'hydroxyde de lithium de façon à ce que les groupements acides sulfonyques soient sous forme de sels de lithium (Figure II.31). L'échantillon à doser étant porté à pH 2, les aminoacides, sous forme cationique, déplacent les ions  $\text{Li}^+$  de la phase stationnaire et s'y fixent plus ou moins solidement en fonction de leur degré d'ionisation. L'élution se fait en augmentant progressivement le pH et les concentrations salines de la phase mobile. En sortie de colonne, ils sont mélangés à un réactif contenant de la ninhydrine puis chauffés. Mis à part les acides aminés secondaires (type  $\text{R}-\text{NH}-\text{R}'$ ), qui donnent une coloration jaune (détectée à 440 nm), les acides aminés primaires (type  $\text{R}-\text{NH}_2$ ) conduisent à la même coloration violette (détectée à 570 nm). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'acide aminé présente dans le milieu réactionnel. Dans des conditions déterminées, le rapport d'absorption optique 570 nm/440 nm est caractéristique pour chaque acide aminé. La limite de détectabilité est d'environ 30 picomoles.

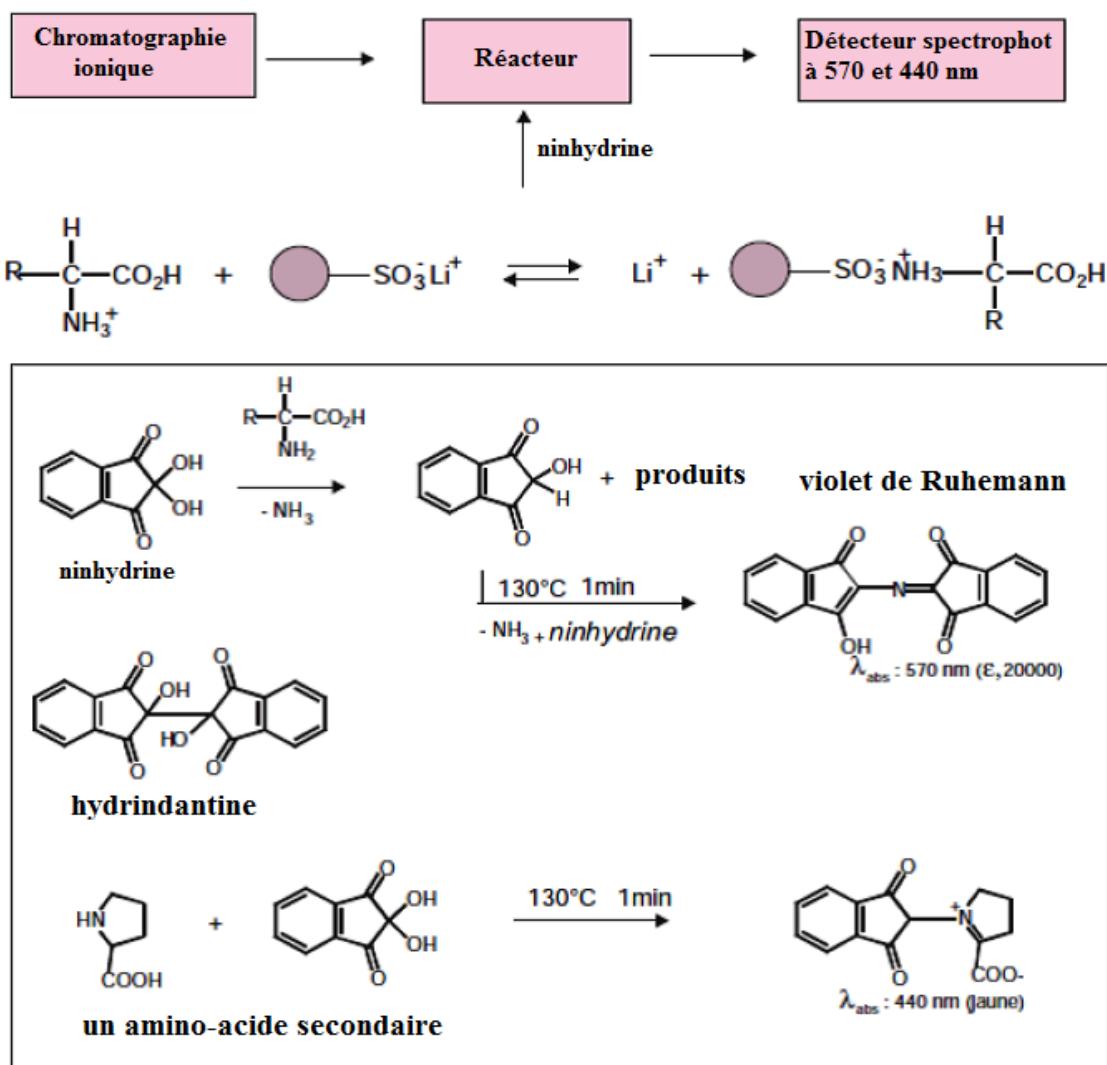


Figure II.31. Analyse des acides aminés

Les molécules à séparer sont dans le même tampon (donc au même pH) et en fonction de leur point isoélectrique ( $\text{pHi}$  ou  $\text{pI}$ ), elle porte une charge nette.

- ❖ Négative : Le  $\text{pI}$  de l'albumine du sérum bovin est de 4,9, cette protéine est chargée négativement au pH 7.
- ❖ Nulle : lorsque le  $\text{pI}$  de la molécule = pH du milieu.
- ❖ Positive : Le  $\text{pI}$  de la cytochrome c'est de 10,7, cette protéine est chargée positivement à pH 7.

Il y a deux manière d'éluer les molécules fixées sur le résine :

- ✓ En modifiant le pH : de la phase mobile de telle sorte que les molécules qui sont chargées ne le soient plus ou qu'elles portent une charge du même signe que l'échangeur d'ion.

- ✓ En ajoutant un sel à concentration croissante : qui apportent forcément un ion de même charge que les molécules fixées à la résine ; cet ion s'appelle un contre ion.

## 7. Chromatographie d'exclusion stérique

### 7.1. Définition

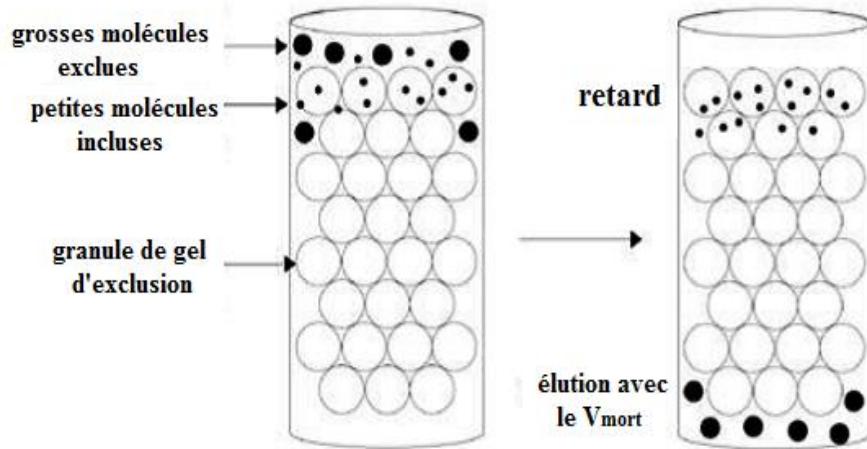
Ce type de chromatographie est encore appelé : tamisage moléculaire, gel-filtration ou perméation de gel. Elle permet de séparer les molécules suivant leur taille. L'efficacité des séparations n'atteint cependant pas celle de la CLHP : la différentiation des composés par leur taille n'est pas le procédé le mieux adapté aux molécules petites ou moyennes.

### 7.2. Principe

Cette technique permet la séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme. On utilise pour cela des granules de gel poreux (figure II.32)..

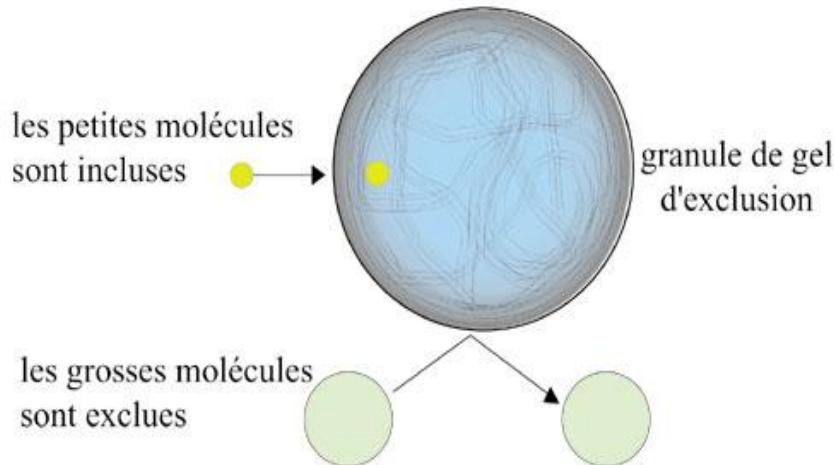
Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et sont donc éluées les premières, au niveau du volume mort ( $V_m$  ou  $V_0$ ). Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses dans le gel, leur migration est freinée.

Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires. Il existe une relation linéaire entre le volume d'élution et le logarithme de la masse moléculaire (figure II.33).



**Figure II.32.** Migration au travers du gel de phase stationnaire.

Ces pores doivent avoir un diamètre moyen du même ordre de grandeur que celui des espèces à séparer lorsqu'elles sont en solution dans la phase mobile.



**Figure II.33.** Représentation d'un gel d'exclusion.

### 7.3. La théorie de la CES :

Le volume total  $V_t$  ou  $V_M$  de phase mobile dans la colonne peut être décomposé en deux parties : le volume interstitiel  $V_I$  (extérieur aux pores) et le volume  $V_p$  qui est celui des pores.  $V_I$  représente le volume de phase mobile nécessaire pour transporter, d'une extrémité à l'autre de la colonne, une grosse molécule supposée exclue des pores et  $V_M = V_I + V_p$ , le volume correspondant pour une petite molécule pouvant rentrer dans tous les pores. Les volumes d'élution  $V_e$  sont donc compris entre  $V_I$  et  $V_M$ . On a :

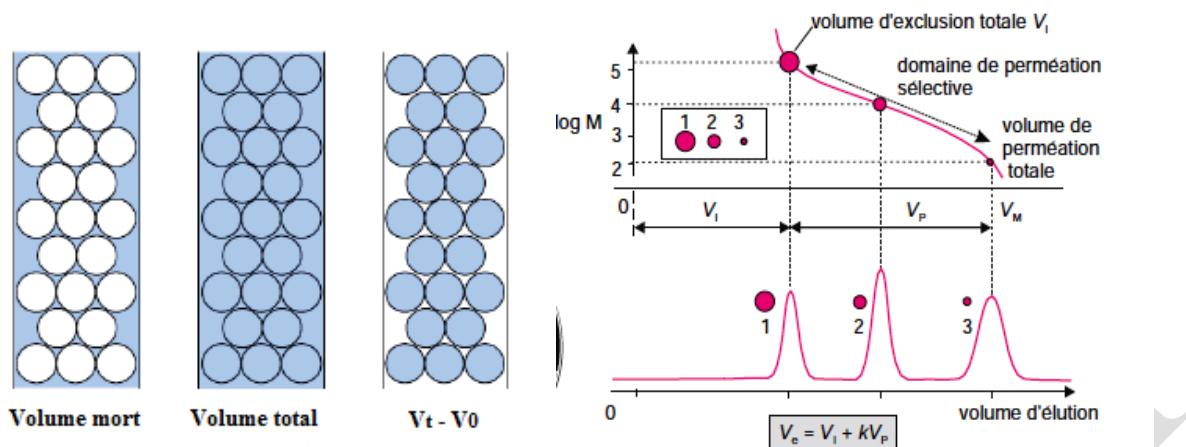
$$V_e = V_I - KV_p$$

$$K = \frac{V_e - V_I}{V_M - V_I}$$

$K$ , coefficient de diffusion, représente le degré de pénétration d'une espèce dissoute dans le volume  $V_p$  ( $0 < K < 1$ ).

Lorsque  $K > 1$ , le comportement du composé dans la colonne ne suit plus seulement le mécanisme d'exclusion stérique, mais il s'y ajoute des interactions physicochimiques avec le support comme en CLHP.

Le raisonnement ci-dessus est vérifié dans la pratique : les molécules dont le diamètre est plus grand que celui des plus larges pores ( $K = 0$ ) sont exclues de la phase stationnaire (d'où vient l'expression d'exclusion *stérique*). Elles traversent la colonne sans être retenues et forment un seul pic sur le chromatogramme à la position  $V_0$ .



**Figure II.34.** Principe de la migration dans la CES.

#### 7.4. Phases stationnaire

Les phases stationnaires de la CES sont constituées généralement par des polymères réticulés organiques (copolymères, styrène-divinylbenzène) ou minéraux (silice greffée de substituants hydroxylés), qui se présentent sous forme de billes de 5 à 10 µm de diamètre avec des pores compris entre 4 nm et 200 nm. Ces matériaux, communément appelés *gels*, doivent résister à l'effet d'écrasement dû à la pression en tête de colonne et à une température de plus de 100°C afin de permettre leur utilisation dans des conditions variées.

Les colonnes standard ont une longueur de 30 cm (1 cm de diamètre environ).

Les phases stationnaires se répartissent en phases hydrophiles, utilisées avec une phase mobile aqueuse et en phase lipophile, utilisées avec un solvant organique.

#### 7.5. Exemples de gels de filtrations

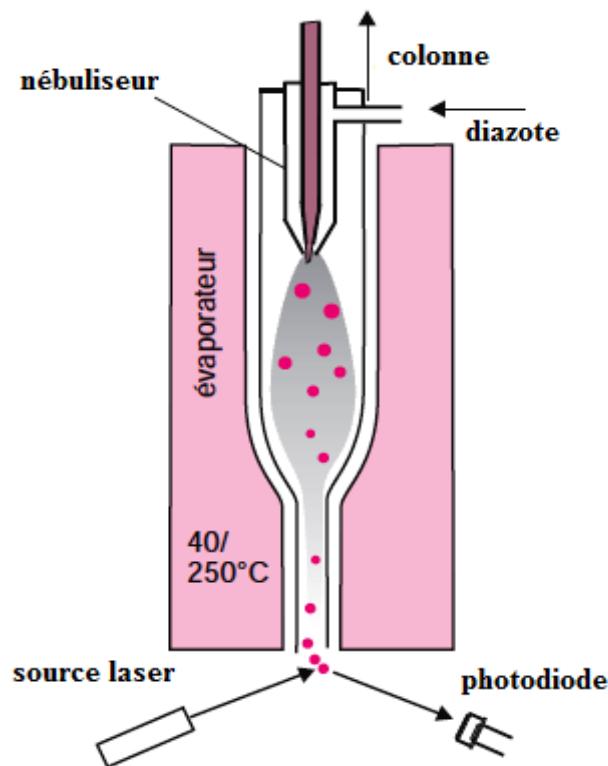
- **Le Sephadex™ G**, de la compagnie Pharmacia, est probablement la plus connue des résines de filtration sur gel. Il est constitué de dextran (un polymère linéaire de glucose) dont les fibres sont réticulées à l'épichlorohydrine pour former les microbilles poreuses. Les différentes variantes (G-25, G-100, G-200, etc.) sont obtenues en contrôlant la réaction de réticulation. Les variantes ont différentes capacités de rétention d'eau, porosités, domaines de fractionnement, limites d'exclusion, etc.
- **Le Sephadex LH**, toujours de Pharmacia, est un dérivé hydroxypropylé du Sephadex G. Il est stable en présence de solvant organiques purs ou mélangés avec de l'eau.
- **Le Bio-Gel P** est produit par Bio-Rad. C'est un polymère d'acrylamide réticulé avec du bisacrylamide.

- Le **Sephacryl**, de Pharmacia, est plus ou moins l'équivalent du Bio-Gel P, sauf qu'il c'est un mélange composite de dextran et d'acrylamide.
- Le **Sepharose**, de Pharmacia, est une préparation d'agarose gélifiée en microbilles et débarrassée de la grande majorité de ses contaminants chargés. La stabilité de cette matrice est due aux liens hydrogène qui lient les polymères d'agarose entre eux. On peut contrôler le domaine de fractionnement en modulant la quantité d'agarose qu'on fait gélifier. Les limites d'exclusion sont extrêmement élevées, souvent de l'ordre du million de Da.

### 7.6. Instrumentation

Le matériel est comparable à celui qui est employé en CLHP si ce n'est que les colonnes ont des volumes plus importants. Pour améliorer la résolution il est assez courant de mettre en série deux ou trois colonnes aux porosités complémentaires. Le détecteur le plus employé est le réfractomètre différentiel. Pour les polymères, la variation d'indice de réfraction étant généralement indépendante de la masse moléculaire, ce détecteur est considéré comme universel.

D'autres détecteurs sont parfois ajoutés au réfractomètre. Ils sont basés sur l'absorption lumineuse (détecteur UV) la diffusion de la lumière (figure II.35) et la viscosimétrie. Ils donnent des indications complémentaires sur les composés séparés.



**Figure II.35.** Détecteur à diffusion de la lumière.

### 7.7. Applications de la CES

Il existe deux grands types d'application des filtrations sur gel couramment utilisé en biochimie: les séparations de groupe, pour obtenir une séparation grossière, et le fractionnement moléculaire pour une séparation fine.

La séparation de groupe consiste à séparer les petites molécules des grosses, en deux groupes distincts: les grosses molécules qui sortent dans le volume mort et les autres qui sortent plus tard. Ainsi, la filtration sur gel peut servir au "dessalage" de solutions: séparation brute des protéines d'une solution des molécules de petit poids moléculaire comme les sels (d'où le terme "dessalage"), sucres, acides aminés, etc. Dans ce cas on utilise une résine ayant un petit domaine de fractionnement où toutes les protéines iront dans le volume mort tandis que les sels et autres petites molécules pourront entrer dans les pores du gel. Il est alors facile de recueillir le volume mort contenant les protéines débarrassées des petites molécules.

Dans le fractionnement moléculaire, on sépare un mélange complexe (généralement de protéines) en plusieurs fractions de poids moléculaire spécifique. Le principal usage de ce type de procédure est la détermination de la masse moléculaire des protéines, ce qui est une application "analytique". C'est une technique assez précise qui permet de travailler sur des molécules non dénaturées et possédant encore leur structure quaternaire.

On peut aussi se servir du fractionnement moléculaire pour purifier une protéine donnée, ce qui est donc une application "préparative".

## 8. Chromatographie en phase supercritique

### 8.1. Définition

La chromatographie en phase supercritique (SFC) a pour originalité d'utiliser comme phase mobile un fluide à l'état supercritique, ce qui améliore les séparations de composés thermolabiles ou de masses moléculaires élevées. Le matériel est de conception hybride entre CPG et CLHP. On peut utiliser soit les colonnes capillaires de la CPG soit les colonnes classiques de la CLHP, mais la tendance actuelle est d'opter plutôt vers l'utilisation de ces dernières.

### 8.2. Rappel sur les fluides supercritiques

Un fluide supercritique se forme lorsqu'une substance est chauffée au-dessus de sa température critique. A partir de sa température critique, une substance ne peut plus être condensée à l'état liquide par augmentation de pression.

L'utilisation d'un fluide supercritique est justifiée par les lacunes des autres méthodes : la chromatographie gazeuse est limitée par la volatilité et la stabilité thermique des solutés et la chromatographie liquide se heurte à d'autres écueils, en particulier, la viscosité des liquides.

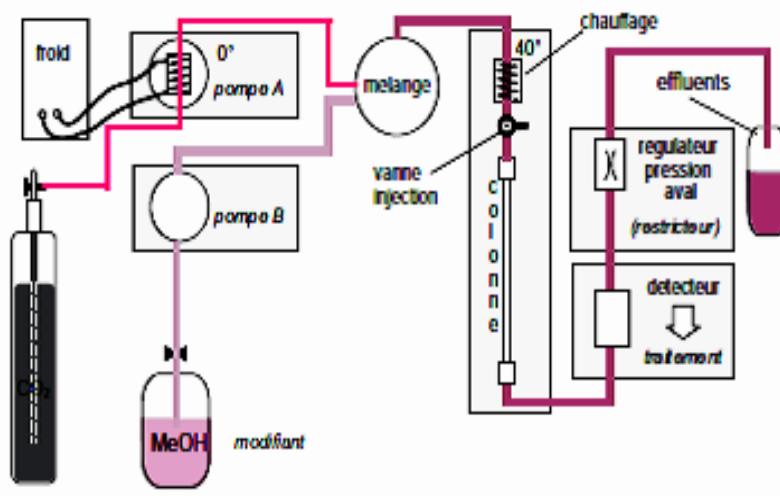
Pour une substance donnée et au-delà de certaines conditions de température et de pression, il n'existe plus de séparation entre les phases liquide et gazeuse ; ces deux phases sont confondues en un seul fluide dit supercritique. Ce fluide présente les avantages des solvants liquides et des solvants gazeux :

- Masse volumique proche de celle des liquides ;
- Diffusion intermédiaire entre celle des liquides et des gaz ;
- Viscosité proche de celle des gaz.

Le pouvoir solvant d'un fluide supercritique vis-à-vis des solutés dépend largement de sa masse volumique qui diffère en fonction de température et de pression.

### 8.3. Appareillage

Selon le type de colonne choisi, l'appareillage mis en œuvre est différent (figure II.36). Il est analogue à celui de la chromatographie gazeuse si l'on utilise des colonnes capillaires, à celui de la chromatographie liquide si l'on utilise des colonnes remplies. Dans les deux cas, la pression et la température du fluide supercritique doivent être rigoureusement maîtrisées.



**Figure II.36.** Chromatographie supercritique : schéma d'appareillage.

## 8.4. Phases stationnaires

### 8.4.1. Colonne capillaires

Les mêmes colonnes et les mêmes phases stationnaires que celles employées en chromatographie gazeuse peuvent être utilisées. Les colonnes capillaires sont adaptées à la chromatographie supercritique et l'efficacité est accrue, non seulement par les caractéristiques propres à ces colonnes mais aussi en raison des caractères particuliers du fluide supercritique, dont la faible viscosité entraîne une diffusion très rapide des solutés. Ces colonnes comme en CG sont couplées avec un détecteur à ionisation de flamme (FID).

### 8.4.2. Colonne remplies

Les mêmes colonnes et les mêmes phases stationnaires que celles utilisées en chromatographie liquide peuvent être employées.

L'injecteur maintenu à température ambiante est le même que celui utilisé en chromatographie liquide. Les mélanges à séparer sont dissous dans les solvants organiques habituels (hexane, dichlorométhane, méthanol, etc...)

## 8.5. Phases mobiles

La phase la plus utilisée est le dioxyde de carbone. Sa température critique  $T_c$  est de 31°C, et sa pression critique  $P_c$  est de 7400 kPa (74 bars).

Son inconvénient majeur est sa très faible polarité due à sa structure symétrique, c'est la raison pour laquelle un modificateur polaire lui est souvent ajouté : les plus fréquents sont le méthanol ou l'acétonitrile, l'eau ou l'acide formique.

La phase mobile est introduite à l'état liquide, ce qui implique son maintien à basse température et à une pression inférieure à la pression critique ; un préchauffage à une température, de l'ordre de 40°C supérieure à température critique, amène ensuite le fluide à l'état supercritique. Cette température doit être maintenue rigoureusement constante.

## 8.6. DéTECTEURS

La détection en chromatographie supercritique peut utiliser les mêmes systèmes qu'en chromatographie liquide, par exemple, spectrophotométrie dans l'ultraviolet ou infrarouge à transformer de Fourier. Ceux de la chromatographie gazeuse et notamment les détecteurs par ionisation de flamme peuvent également être mis en œuvre à la sortie des colonnes capillaires.

### 8.7. Application

La chromatographie supercritique donne d'excellents résultats pour l'analyse des polymères et en particulier l'évaluation des oligomères pouvant provenir d'une dégradation du polymère ou d'un accident de polymérisation.

L'analyse de composés biologiques, de masse moléculaire élevée et de solutés thermolabiles, peptides, polypeptides ainsi que celle de solutés contenus dans des mélanges complexes et de détection difficile peut être effectuée par cette méthode.

## EXERCICE D'APPLICATION

### Exercice 1 :

Pour un soluté donné, montrer que le temps d'analyse qu'on peut assimiler au temps de rétention du composé le plus retenu dépend, entre autre, de la longueur de la colonne  $L$ , de la vitesse linéaire moyenne  $\bar{u}$  de la phase mobile et des volumes  $V_s$  et  $V_m$  qui désignent respectivement le volume de la phase stationnaire et celui de la phase mobile.

### Exercice 2 :

- a. Montrer que si l'efficacité  $N$  est la même pour deux composés 1 et 2 voisins, l'expression classique de la résolution devient :

$$R = \frac{\sqrt{N}}{2} \left( \frac{k_2 - k_1}{k_1 + k_2 + 2} \right)$$

- b. Montrer qu'en posant  $k = \frac{k_1+k_2}{2}$  les expressions (1) et (2) sont équivalentes :

$$R = \frac{1}{2} \sqrt{N} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha + 1} \right) \left( \frac{k}{1 + k} \right)$$

### Exercice 3 :

Les temps de rétention de deux produits naturels A et B d'un mélange à séparer sont respectivement égaux à 16,40 et 17,63 min sur une colonne de 30 cm. Une espèce non retenue passe sur la colonne en 1,30 min. Les largeurs (à la base) des pics de A et B sont respectivement égales à 1,11 et 1,21 min.

Calculez :

- a. La résolution de la colonne
- b. Le nombre moyen de plateaux théoriques dans la colonne
- c. La hauteur équivalente à un plateau théorique
- d. La longueur de la colonne nécessaire pour obtenir une résolution de 1,5
- e. Le temps requis pour éluer la substance B sur cette colonne.

### Exercice 4 :

On mélange dans un erlenmeyer 6 ml de gel de silice et 40 ml d'un solvant contenant en solution 100mg d'un composé considéré comme non volatil. Après avoir bien agité ce mélange, on laisse décanter et on recueille 10 ml du solvant que l'on évapore. Le résidu pèse 12 mg.

Calculer le coefficient d'adsorption  $K = C_s / C_m$  de ce composé dans cette expérience.

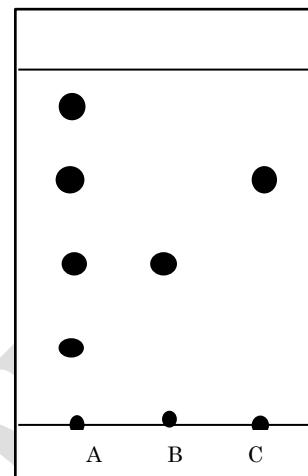
**Exercice 5 :**

On analyse par chromatographie sur couche mince l'huile essentielle de la lavande. On a obtenu le chromatogramme ci-contre avec les produits suivants :

- A : huile essentielle de la lavande
- B : linalol
- C : acétate de linalyle

1- A partir du chromatogramme, dire en justifiant la réponse quels sont le(s) produit(s) pur(s) et le(s) produit(s) composé(s).

2- Quelles molécules peuvent être identifiées dans l'huile essentielle de la lavande ? Justifier la réponse.

**Exercice 6 :**

On définit l'efficacité N d'une plaque CCM par la relation :  $N = 16 x^2 / w^2$ . Un mélange de deux composés A et B conduit après migration à deux taches aux caractéristiques suivantes :

$$x_A = 27 \text{ mm} ; x_B = 33 \text{ mm} ; w_A = 2 \text{ mm} ; w_B = 2,5 \text{ mm.}$$

Où:  $x_A$  et  $x_B$  sont les distances parcourues par A et B respectivement.

$w_A$  et  $w_B$  sont les diamètres respectifs de A et B. le front du solvant est de 50 mm.

1. Calculer Rf et N pour chacun des composés.
2. Calculer le facteur de résolution (R) entre les deux composés A et B.

**Exercice 7 :**

On procède à une séparation de deux amphétamines sur une colonne HPLC (phase stationnaire : C18), 15cm×4,6mm, remplie de particules de 5µm, avec l'acétonitrile ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) comme phase mobile et à une température de 30°C. On mesure un temps mort de 1,07 min.

Dans ces conditions, on obtient la séparation ci-contre entre les deux amphétamines :

Amphétamine A : temps de rétention = 2,40 min, largeur du pic à mi-hauteur  $\omega_{(A)} = 5 \text{ s}$ .

Amphétamine B : temps de rétention = 2,85 min, largeur du pic à mi-hauteur  $\omega_{(B)} = 6 \text{ s}$ .

1. Calculez le facteur de séparation
2. Calculez le facteur de résolution
3. Evaluez le nombre de plateaux théoriques de la colonne
4. Calculez la différence d'énergie libre de dissolution d  $\Delta G^\circ$  entre ces deux amphétamine dans la phase stationnaire ( $R=8,31 \text{ J K mol}^{-1}$ )

**Exercice 8 :**

Le chromatogramme suivant a été obtenu en chromatographie liquide à polarité de phase inverse.

Les conditions opératoires sont les suivants :

Longueur de colonne : 10 cm	Température : 20°C
Débit : 1 ml/min	Teneur en méthanol : 35%
Pression en tête de colonne : $69 \times 10^5$ Pa	Temps mort : 41 s

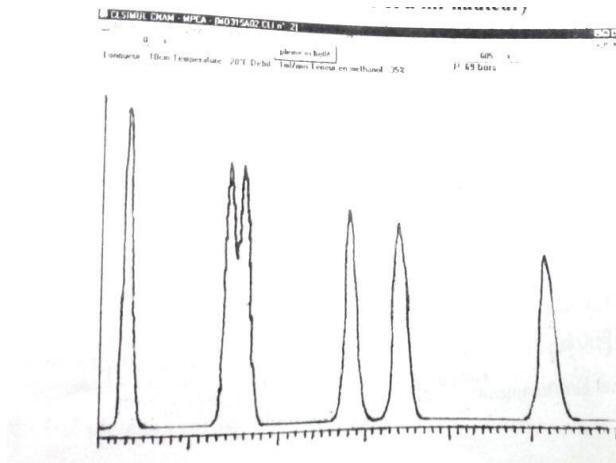
Le tableau des est le suivant :

Nom du soluté	Temps de rétention réduit $t'r$ (s)	Largeur à mi-hauteur $\omega_{1/2}$ (s)
uracil	28	10,9
phénol	141	13,1
Alcool benzylique	158	13,4
2-phényléthanol	158	13,4
Benzoate de benzyle	341	16,9
Diméthylphthalate	519	20,4

- Indiquez les composés qui ne sont pas correctement séparés.
- Toutes choses égales par ailleurs, quelle serait la résolution entre le phénol et l'alcool benzylique si vous utilisez une colonne de 25 cm ?

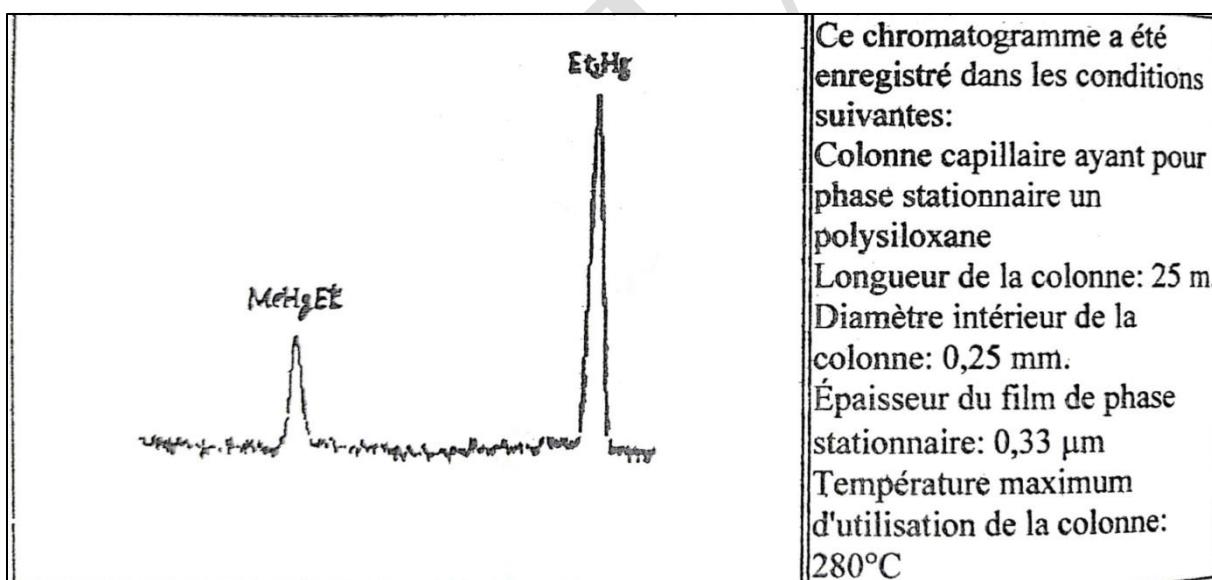
Comme calculs intermédiaires, vous déterminerez pour les deux composés le nombre de plateaux théoriques, leurs temps de rétention ( $t_r$ ) de chaque pic pour les deux longueurs de la colonne.

- Donnez l'allure des deux pics les moins bien séparés avec la colonne de 25 cm.
- Calculez le temps de rétention du dernier composé (diméthylphthalate) et la pression en tête, avec la colonne de 25 cm.

**Exercice 9 :**

Dosage de composés mercuriques en CPG.

Pour doser le mercure dans la chair de poisson, les cations  $\text{Hg}^{2+}$  et  $\text{MeHg}^+$  sont transformés respectivement en 2 dérivés volatils,  $\text{Et}_2\text{Hg}$  et  $\text{MeHgEt}$  par traitement avec du tétraéthylborate de sodium. Ces composés sont ensuite dosés par CPG. Cette méthode permet de doser jusqu'à 5 µg de composés mercurique par kilogramme de chair de poisson.



Phase mobile : Hélium avec une vitesse de passage dans la colonne de 60 cm/sec.

Les caractéristiques des pics du chromatogramme sont réunies dans le tableau suivant :

	$t_r$ (mn) à 120°C	Largeur à mi-hauteur (sec) à 150°C	$t_r$ (mn) à 140°C
MeHgEt	3,08	1,32	2,02
Et <sub>2</sub> Hg	3,56	1,47	?

- 1- Evaluez le nombre de plateaux théoriques de cette colonne pour Et<sub>2</sub>Hg à 120°C ?

- 2- Calculez le rapport de phases de la colonne. En déduire la constante d'équilibre (de partition) pour le diéthylmercure à 120°C.
- 3- Sachant que le facteur de séparation des deux pics est de 1,13 à 140°C, calculez le temps de rétention du diéthylmercure à 140°C.
- 4- Evaluez le temps de rétention du diéthylmercure à 100°C (on suppose que le temps mort ne varie pas dans la gamme des températures utilisées)
- 5- Les paramètres thermodynamiques des produits suivants ont été mesurés sur cette colonne.

Les variations de  $\Delta H^\circ$  et  $\Delta S^\circ$  correspondent au changement induit par le passage des produits de la phase gazeuse dans la phase stationnaire.

Quel sera l'ordre d'élution de ces produits à 120°C ? Justifiez votre réponse par un calcul simple.

	décane	Acétate de butyle	Heptanol	bromobutane	Acétate d'hexyle
$\Delta H^\circ \text{ KJmol}^{-1}$	-47,2	-34	-36,9	-31	-42
$\Delta S^\circ \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$	-75,4	-58	-58	-51	-66

### Exercice 10 :

Dans une expérience de CPG, on injecte un mélange de n-alcane ( à n atome de carbone, n étant variable) et de 1-butanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ) sur une colonne en régime isotherme comportant une phase stationnaire de type diméthylpolysiloxane.

L'équation de droite de Kovats déterminée à partir du chromatogramme est :

$$\text{Log } t'_r = 0,39 \times n - 0,29 \quad (t'_r \text{ exprimé en seconde})$$

Le butanol a un temps de rétention corrigé de 168 s. sachant que son indice de rétention (de Kovats) sur colonne squalane est de 590, en déduire la constante de McReynolds du butanol sur cette colonne.

### Exercice 11 :

On veut séparer 3 acides aminés : l'acide L-glutamique, la L-leucine et L-lysine par lysine par chromatographie sur une résine polystyrénique substituée par des groupements sulfonate ( $-\text{SO}_3^-$ ). Les pH isoélectriques de l'acide L-glutamique, de L-leucine et de L-lysine sont respectivement : 3,22 ; 5,98 ; 9,74 à 25 °C.

On dépose ces 3 acides aminés sur la colonne, à pH 2, puis on élue en amenant progressivement le pH à 7.

- Quels acides aminés sont élués et dans quel ordre ? (on considérera que les interactions acides aminé-résine sont uniquement d'ordre électrostatique).

### Exercice 12 :

La carboxyméthylcellulose (CM-cellulose) est un support échangeur de cations. Elle est obtenue en substituant la cellulose par des groupements carboxyméthyles ( $-\text{CH}_2\text{-COOH}$ ).

- Quelle est la proportion des groupements carboxyméthyles chargés négativement aux pH suivants : 1 ; 4,76 ; 7 et 9 (on considérera que le pKa du groupement carboxyle des radicaux carboxyméthyles est 4,76).
- Parmi les protéines suivantes : Ovalbumine ( $\text{pHi} = 4,6$ ), Cytochrome c ( $\text{pHi} = 10,65$ ) et Lysozyme ( $\text{pHi} = 11$ ), quelles sont celles qui sont retenues par la CM-cellulose à pH 7 ? (on considérera que les interactions protéines-CM-cellulose sont uniquement d'ordre électrostatique).

### Exercice 13 :

Un mélange d'immunoglobulines G (MM = 160000 Da) et d'albumine sérique bovine (MM = 67000 Da) est déposé sur colonne de séphadex G-100 (limite d'exclusion = 100000 Da).

Rappel : MM = masse moléculaire.

- Tracer un diagramme d'élution vraisemblable (DO en fonction de Ve) en indiquant le volume mort.

### Exercice 14 :

On détermine les temps de rétention ( $\text{tr}$ ) au cours d'une chromatographie sur Sephadex, des protéines suivantes dont on connaît la masse moléculaire (MM) (Le débit de la colonne est de 5 ml / min) :

	MM	tr (min)
Aldolase	145000	10,4
Lactate déshydrogénase	135000	11,4
Phosphatase alcaline	80000	18,4
Ovalbumine	45000	26,2
Lactoglobuline	37100	28,6

1. Calculer les volumes d'élution ( $V_e$ ) correspondants. Porter le log de MM en fonction de  $V_e$  - Que remarquez-vous ?
2. Pour la glucokinase,  $t_r = 21$  min. Déterminer sa masse moléculaire à l'aide du graphique précédent. Existe t'il une autre méthode pour déterminer la MM ?

N. BOUFTA OUI

**CORRIGE****Exercice 1 :**

On a  $t_r = t_m (1+k)$  ou  $t_m = L / \bar{u}$  et  $k = K \times V_s / V_m$

D'où  $t_r = (L / \bar{u}) (1 + K \times V_s / V_m)$

**Exercice 2 :**

a. A partir de la relation de base :

$$R = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{\omega_1 + \omega_2}$$

On peut remplacer  $\omega$  par sa valeur en fonction de  $N$  :

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

Et comme :

$$t_r = t_m (1+k)$$

On obtient l'expression (1).

b. On multiplie le second membre de (1), numérateur et dénominateur par  $(k_1+k_2)$  et on apparaît  $\alpha$  ( $\alpha = k_2/k_1$ ).

**Exercice 3 :**

a.  $R = 1.07$

b.  $N_{moy} = N_A + N_B / 2 = 3444.6$  p.t

c.  $H = L / N_{moy} = 8.7 \times 10^{-7} \text{ cm}$

d.  $L_2 = H \times N_2$  et  $N$  proportionnel à  $R^2$  donc  $N_2 \propto R_2^2$  et  $N_1 \propto R_1^2$

$L_2 = 59,71 \text{ cm}$

e. En supposant que la largeur de pic à la base reste constante

$$N_2(B) = \frac{16 t_{r(B)}^2}{\omega_{(B)}^2} \Rightarrow t_{r(B)} = 25,06 \text{ min}$$

**Exercice 4 :**

Calcul de coefficient d'adsorption K :

$$K = \frac{C_s}{C_m} = \frac{\frac{m_s}{V_s}}{\frac{m_m}{V_m}} ; \quad \text{Il faut trouver } m_s \text{ et } m_m$$

On a:  $V_s = 6 \text{ ml}$ ;  $V_m = 40 \text{ ml}$ ;  $m_{\text{solution}} = 100 \text{ g}$  ( $m_s + m_m$ )

On a aussi l'évaporation de 10 ml du solvant nous donne 12 mg de résidu.

Donc : 10 ml (solvant)  $\longrightarrow$  12 mg résidu

40 ml (solvant)  $\longrightarrow$   $m_m$

$m_m = 40 \times 12 / 10$

**$m_m = 48 \text{ mg}$**

$$m_s = 100 - 48 \Rightarrow m_s = 52 \text{ mg}$$

$$K = \frac{C_s}{C_m} = \frac{\frac{m_s}{V_s}}{\frac{m_m}{V_m}} = 7,22$$

**Exercice 5 :**

1- Les produits purs sont B et C  $\Rightarrow$  Ils donnent une seule tache après élution.

A : est un produit composé car il est séparé en plusieurs taches.

2- L'huile essentielle de la lavande est constituée de linalol et de l'acétate de linalyle car il donne naissance à des taches situées au même niveau que celle du B et C.

**Exercice 6:**

$$N = 16 x^2 / w^2$$

$$x_A = 27 \text{ mm} ; x_B = 33 \text{ mm} ; w_A = 2 \text{ mm} ; w_B = 2,5 \text{ mm}.$$

$$H = y = 50 \text{ mm}$$

1- Calcul de  $R_f$  et N:

$$N_A = 2916$$

$$N_B = 2788$$

$$R_f(A) = 0,54$$

$$R_f(B) = 0,66$$

2- Calcul du facteur de résolution:

$$R = 2 \frac{x_B - x_A}{w_B + w_A} = 2 \frac{33 - 27}{2,5 + 2} \Rightarrow R_s = 2,67$$

**Exercice 7 :**

1.  $k'(A) = 1,243$  et  $k'(M) = 1,664$  d'où  $\alpha = 1,338$ .

2.  $R = 2,49$

3.  $N = 4624$  Plateaux théoriques
4.  $d \Delta^{\circ}G = -RT\ln(\alpha) = -718.4 \text{ J/mol}$

### Exercice 8 :

- a. Le chromatogramme montre que deux composés ne sont pas séparés. Ce sont le phénol et l'alcool benzylique. Le signal ne retourne pas à la ligne de base.

$N_{\text{phénol}} = 1069$  plateaux sur la colonne de 10 cm

$N_{\text{phénol}} = 1830$  plateaux sur la colonne de 25 cm

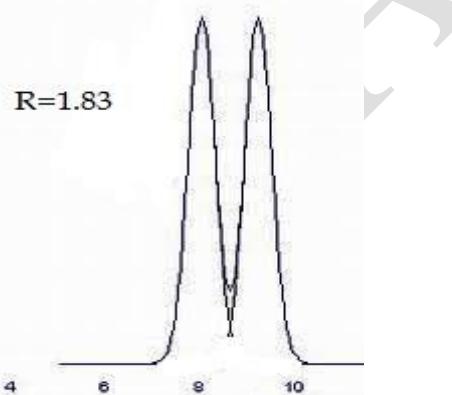
$N_{\text{alcool benzylique}} = 1221$  plateaux sur la colonne de 10 cm

$N_{\text{alcool benzylique}} = 2090$  plateaux sur la colonne de 25 cm

$$R(10\text{cm}) = 0.73$$

b.  $R(25 \text{ cm}) = 1.25$  ( $R_{25}/R_{10} = N_{25}/N_{10}$ )

- c. Allure des deux pics les moins séparés avec la colonne de 25 cm



- d. Nous écrivons DMP : diméthylphthalate

Pour 10 cm :

$$k'_{\text{DMP}} = 519 / 41 = 12,66$$

$$t_{m10} = 41 \text{ s},$$

Pour 25 cm

$$t_{m25} = 102,5 \text{ s}; t_r(\text{DMP}) = 1394 \text{ s}$$

### Exercice 9 :

1.  $N = 116970$  plateaux théoriques.
2.  $K(\text{Et}_2\text{Hg}) = k'\beta = 786$ .
3. A  $140^\circ\text{C}$ ,  $t_r(\text{Et}_2\text{Hg}) = 2,19 \text{ mn}$

4. Considérer l'équation  $\ln t_r' = A/T + B$ ,  $\theta = 100^\circ\text{C}$ ,  $t_r(\text{Et}_2\text{Hg}) = 6,56 \text{ mn}$ .

5. On a  $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$

Plus  $\Delta G^\circ$  est petit (grand en valeur absolue) plus le produit est retenu sur la colonne.

### Exercice 10 :

L'indice de Kovalts du butanol est donc de 645.

Sa constante de McReynolds est de :  $645 - 590 = 55$ .

### Exercice 11 :

Cet exercice met en jeu une chromatographie échangeuse d'ions. Une résine polystyrénique substituée par des groupements sulfonate ( $-\text{SO}_3^-$ ) est chargée négativement et est donc une résine échangeuse de cations.

Lorsque le pH est supérieur au pHi ( $\text{pH} > \text{pHi}$ ), l'acide aminé est chargé négativement (forme anionique).

Lorsque le pH est inférieur au pHi ( $\text{pH} < \text{pHi}$ ), l'acide aminé est chargé positivement (forme cationique).

Le tableau ci-dessous donne les charges des 3 acides aminés, à  $\text{pH} = 2$  et  $\text{pH} = 7$ .

Acide aminé :	pHi	Charge à $\text{pH} = 2$ :	Charge à $\text{pH} = 7$ :
Acide L-Glutamique (Glu)	3,22	+	-
L-Leucine (Leu)	5,98	+	-
L-Lysine (Lys)	9,74	+	+

Ainsi, à  $\text{pH}=2$ , les trois acides aminés sont chargés positivement, et seront retenus lors du passage sur la colonne.

A  $\text{pH} = 7$ , seuls Glu et Leu, chargés négativement, seront élués. Lys reste fixé à la colonne.

Glu est élué en premier ( $\text{pH} = 3,22$ ) puis Leu l'est ensuite ( $\text{pH} = 5,98$ ).

### Exercice 12 :

1. Proportions des groupements carboxyméthyles ( $\text{pK}_a = 4,76$ ) chargés négativement aux  $\text{pH} 1 ; 4,76 ; 7$  et  $9$ .

Le pH est donné par la relation suivante :

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{(-\text{CH}_2 - \text{COO}^-)}{(-\text{CH}_2 - \text{COOH})}$$

A pH = 1 :  $\log \text{base/acide} = \text{pH} - \text{pK}_a = 1 - 4,76 = -3,76$  donc  $\text{base/acide} = 1,74 \times 10^{-4}$

Sachant que  $(A) + (B) = 100\%$  et que  $(B) = 1,74 \times 10^{-4}$

Le pourcentage des formes (A) et (B) : (A) = 99,98% et (B) = 0,02.

A pH 4,76 :  $\log \text{base/acide} = \text{pH} - \text{pKa} = 4,76 - 4,76 = 0$  donc base/acide = 1

Donc (A) = 50% et (B) = 50%

A pH = 7 :  $\log \text{base/acide} = \text{pH} - \text{pKa} = 7 - 4,76 = 2,24$  donc base/acide = 173,78

Donc (A) = 0,575% et (B) = 99,425%.

A pH = 9 :  $\log \text{base/acide} = \text{pH} - \text{pKa} = 9 - 4,76 = 4,24$  donc base/acide = 13378

Donc (A) =  $5 \times 10^{-3}$  % et (B) = 99,994%.

Globalement, on peut donc constater qu'à un pH inférieur au pKa (pH acide), les groupements carboxyméthyles se présenteront majoritairement sous forme acide ( $-\text{CH}_2\text{-COOH}$ ).

A l'inverse, à un pH supérieur au pKa (pH basique), les groupements carboxyméthyles se présenteront majoritairement sous forme basique ( $-\text{CH}_2\text{-COO}^-$ ).

2. A pH=7, on a pu calculer que la résine était à 99,425% sous forme basique, chargée négativement ( $-\text{CH}_2\text{-COO}^-$ ).

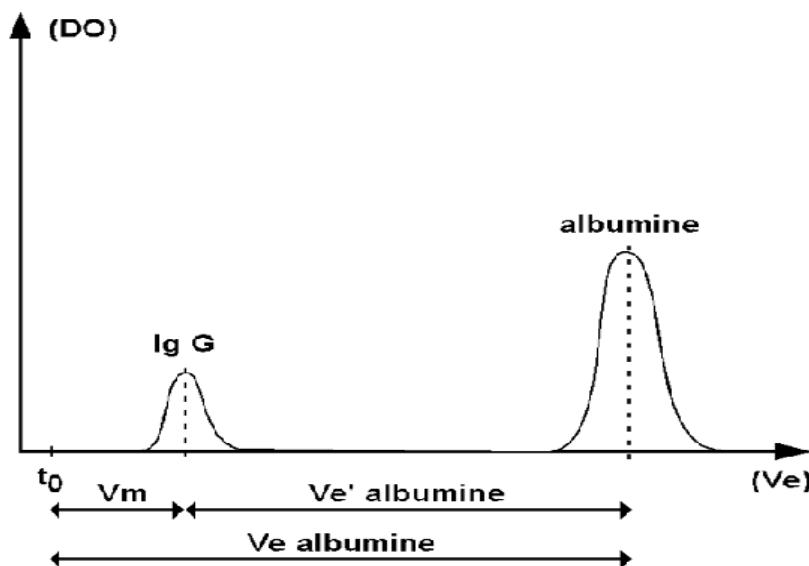
Protéines	pHi	Charge à pH = 7
Ovalbumine	<b>4,6</b>	négative
Cytochrome c	<b>10,65</b>	Positive
lysozyme	<b>11</b>	positive

Ainsi, seule l'ovalbumine, qui à pH=7 est chargée négativement, ne sera pas retenue sur la colonne. Le cytochrome c et le lysosyme seront retenus.

### Exercice 13 :

Voici un diagramme d'élution vraisemblable pour une chromatographie d'exclusion séphadex G-100 (limite d'exclusion = 100000 Da), sur laquelle on aurait déposé un mélange d'immunoglobulines G (MM = 160000 Da) et d'albumine sérique bovine (MM = 67000 Da).

Ici on a représenté la mesure de la densité optique (DO) de l'éluat en fonction du volume d'élution ( $V_e$ ):



Les Ig G présentent une masse moléculaire supérieure à la valeur de la limite d'exclusion de la colonne (100000 Da). Elles seront donc éluées en premier, et donneront la valeur du volume mort de la colonne ( $V_m = V_e$  Ig G)

L'albumine de masse moléculaire 67000 g/mol, sera incluse dans le gel et éluée plus tard, avec un  $V_e$  albumine qui est égal à  $V_m + V_e'$  albumine

#### Exercice 14 :

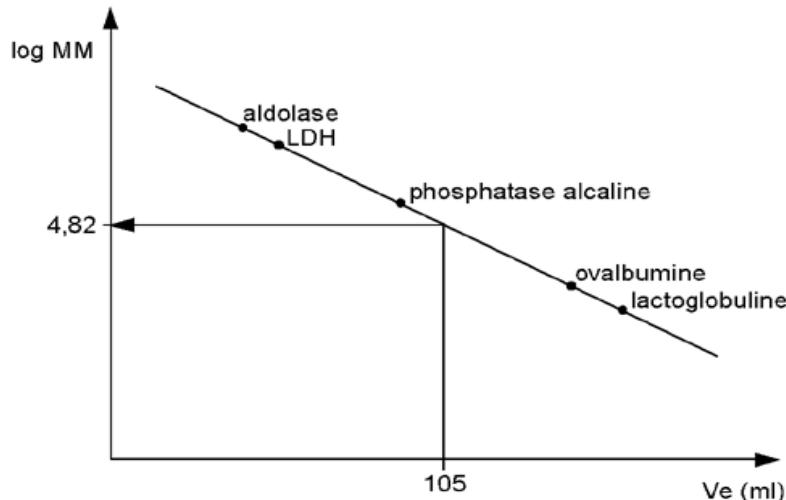
1. Cet exercice met en jeu une chromatographie d'exclusion (encore appelée : tamisage moléculaire, gel filtration, perméation de gel). La connaissance du débit de la colonne (5 ml / min) et des différents temps de rétention nous permet de calculer le volume d'élution pour chaque composé (voir tableau), selon la relation :

$$V_e \text{ (volume d'élution)} = d \text{ (débit)} \times t_r \text{ (temps de rétention)}$$

La représentation graphique du log de la masse moléculaire (log MM) qu'il faut calculer préalablement (voir tableau) en fonction du volume d'élution (V<sub>e</sub>) nous donne une droite :

	MM	Log MM	$t_r$ (min)	<u><math>V_e</math> (ml)</u>
Aldolase	145000	5,16	10,4	52
Lactate déshydrogénase	135000	5,13	11,4	57
Phosphatase alcaline	80000	4,9	18,4	92

Oovalbumine	45000	4,65	26,2	131
Lactoglobuline	37100	4,57	28,6	143



Le fait de visualiser une droite signifie qu'aucune protéine n'est exclue du gel.

2. La glucokinase, avec un temps de rétention de 21 min, est élue à un volume d'élution de  $5 \times 21 = 105$  ml. Il suffit de se reporter au graphe pour déterminer un  $\log MM = 4,82$  environ, soit une masse moléculaire de 66070 Da (ou 66070 g/mol ou 66,07 kDa), environ.

Ici, on a tracé le logarithme de la masse moléculaire en fonction du volume d'élution :

$$\log MM = f(V_e).$$

L'autre représentation serait de porter le logarithme de la masse moléculaire en fonction du KAV, le coefficient de partage entre la phase liquide et la phase gel :  $\log MM = f(KAV)$ .

$$KAV = (V_e - V_m) / (V_t - V_m)$$

Mais pour cela, il faudrait connaître le volume mort ( $V_m$ ) et le volume total de la colonne ( $V_t$ ).

N. BOUAFIA OUI

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Burgot, G., Burgot, J-L; 2006. Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications: Méthodes chromatographiques, électrophorèses et méthodes spectrales. Partie I: Méthodes de séparation chromatographiques et électrophorétiques. *Editions Médicales internationales. 2ème édition, TEC & DOC.*
2. Cardot, C ; 2002. Techniques membranaires: Les traitements de l'eau: procédés physico-chimiques et biologiques. Cours et problèmes résolus. *Paris, Ellipse Edition.*
3. Burgot, G., Burgot, J.-L.; 2011. Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications: Méthodes chromatographiques, électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques. *Lavoisier.*
4. Mendham, J., Denney, R., Barnes, J., Thomas, M.; 2005. Analyse chimique quantitative de Vogel. *1ère Edition edn. De Boeck.*
5. Rouessac, F., Rouessac, A., Cruché, D. ; 2004. Analyse chimique- -Méthodes et techniques instrumentales modernes: Méthodes et techniques instrumentales modernes. *6ème édition, Dunod.*
6. Rouessac, F., Rouessac, A., Cruché, D. ; 1997. Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes: Méthodes et techniques instrumentales modernes. *3ème édition Masson.*
7. Mahuzier, G., Hamon, M., Ferrier, D., Prognon, P.; 1999. Chimie analytique. *3ème édition. Masson.*
8. Skoog, D., West D., Holler J., Crouch; 1997. Chimie analytique. *1ére edition, de boeck.*
9. Skoog, West, Holler, Crouch; 2012. Chimie analytique. *2éme edition, de boeck.*
10. Mahuzier, G., Hamon, M. ; 1978. abrégé de chimie analytique, méthodes de séparation-tome 2, *ed. masson.*
11. Skoog, D-A., Holler, F-J., Nieman, T-A.; 2003. Principes d'analyse instrumentale. *De Boeck Supérieur.*
12. Satinder, A ; 2003. Chromatography and separation science. *Vol 4;Academic press.*
13. Luc H ; 2010. Extraction en phase solide (SPE) : théorie et applications. *Ann Toxicol Anal.*
14. Atkins P-W ; 2008. Pincipe de chimie. *De boeck and Larcier.*
15. Small, H., Riviello, J., Pohl, C.A., 1997. Ion chromatography using frequent regeneration of batch-type suppressor. Google Patents.
16. Small, H., Stevens, T.S., Bauman, W.C., 1975. Novel ion exchange chromatographic method using conductimetric detection. *Analytical Chemistry 47, 1801-1809.*