

UNIVERSITE DE M'SILA

Techniques d'analyse physicochimique (1)

Réalisé par Dr. Yazid Bouznit

2020

Tables des matières

Tables des matières



Méthodes de séparation	2
Introduction.....	3
Glossaire.....	3
1. Séparation d'un mélange hétérogène.....	6
1.1. Cas d'un mélange solide-liquide.....	7
1.1.1. Filtration.....	7
1.1.2. Sédimentation	9
1.1.3. Centrifugation.....	11
1.2. Cas d'un mélange liquide-liquide (liquides non miscibles)	13
1.2.1. Décantation	13
2. Séparation d'un mélange homogène (solution)	14
2.1. Cas d'un mélange liquide-liquide (miscibilité totale)	15
2.1.1. Distillation simple (séparation par changement d'état)	15
2.1.2. Distillation fractionnée.....	15
2.2. Cas d'un mélange solide-liquide (solide totalement dissous dans un liquide)	16
2.2.1. Cristallisation	16
2.2.2. Evaporation	17
2.3. Cas d'un mélange solide-solide.....	17
2.3.1. Sublimation (séparation par changement d'état)	17
3. Extraction (séparation par transfert de phase).....	19
3.1. Extraction liquide-liquide (extraction par un solvant).....	19
3.1.1. Coefficient de partage (coefficient de distribution)	19
3.1.2. Extraction multiple	22
3.1.3. Rendement d'extraction	23
3.1.4. Quelques solvants d'extraction usuels	23
3.2. Extraction solide - liquide	24
3.2. 1. Immersion	25
a)Macération.....	25
b) Infusion	25
c)Décoction	25
3.2. 2. Percolation	25
Extraction au Soxhlet.....	25
4. Osmose, osmose inverse et dialyse	27

4.1. Osmose	27
4.2. Osmose inverse	28
4.3. Dialyse.....	30
4.3.1. Effet Donnan.....	31
Chromatographie	34
Introduction.....	35
1. Définition	35
2. Principe.....	35
3. Terminologie (glossaire)	36
4. Interactions intermoléculaires.....	38
4.1. Forces de dispersion de London.....	38
4.2. Forces de Debye	38
4.3. Forces de Keesom.....	39
4.4. Liaison hydrogène	39
5. Types de chromatographie (classification).....	39
5.1. Chromatographie sur couche mince (CCM ou TLC).....	41
5.1.1. Principe	42
5.1.2. Appareillage.....	43
5.2. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)	43
5.2.1. Principe	44
5.3. Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	45
6. Détection	46
6.1. Spectrophotométrie d'absorption UV-visible	46
6.2. Détecteurs à ionisation de flamme (FID)	47
6.3. Fluorimétrie	47
6.4. Spectromètre de masse.....	47
7. Paramètres décrivant la colonne et le chromatogramme.....	48
7.1. Chromatogramme typique	48
7.2. Nombre de plateaux théoriques (efficacité d'une colonne).....	50
7.3. Hauteur d'un plateau théorique	50
7.4. Coefficient de distribution (ou de partage)	50
7.5. Facteur de capacité (ou de rétention).....	51
7.6. Facteur de sélectivité.....	51

7.7. Résolution	51
7.8. Volume de rétention	52
7.9. Equation de van Deemter	52
Electrophorèse	54

Avant propos

Ce polycopié présente aux étudiants Licence les connaissances nécessaires à la compréhension des méthodes d'analyse pour le module technique d'analyse physicochimique 1. Très pédagogique, il s'appuie sur un texte clair et concis, illustrée d'un bon nombre de schémas didactiques. Il constitue une véritable référence indispensable aux étudiants.



L'importance de ce qui a été écrit à travers ces pages ne se révèle pas par un simple coup d'œil ou par un scan rapide (lecture précipitée), mais plutôt par une lecture ponctuelle, minutieuse et prudente...

Méthodes de séparation

Introduction

La matière est tout ce qui occupe un volume et possède une masse. Ses états physiques les plus communs sont : solide, liquide et gazeux. Elle se présente dans la nature sous forme de mélanges ou de corps pur (Fig. 1).

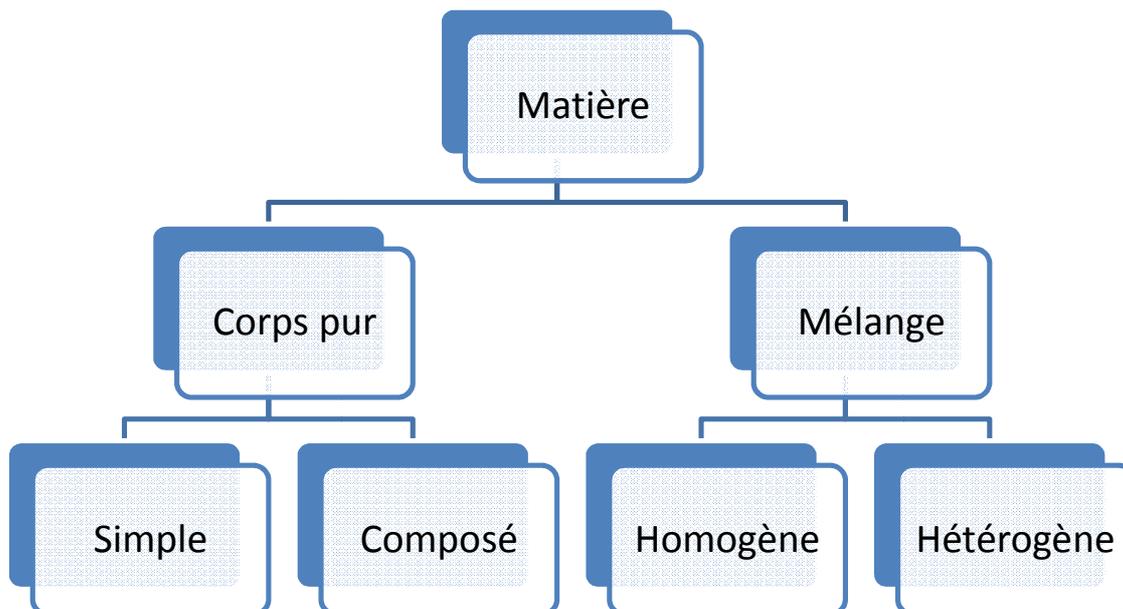


Fig.1. Les différents types de la matière

Glossaire

- ✓ **Corps pur** : formé par une seule substance.
- ✓ Un corps pure possède des propriétés physicochimiques qui lui sont propres.
- ✓ Température de Changement d'état
- ✓ Indice de réfraction
- ✓ Densité
- ✓ Conductivités électrique et thermique



Fig.2. Corps pure di- iode (I₂)

- ✓ **Corps pur simple** : substance formée d'1 seul type d'atome. substance élémentaire : ne peut pas être séparé en substances plus simples par des méthodes physiques.
- ✓ **Corps pur composé** : substance composée de 2 ou plusieurs éléments dans des proportions fixes.
- ✓ **Mélange** : combinaison physique de deux ou plusieurs substances qui peuvent être physiquement séparés.
- ✓ **Mélange homogène** : mélange ayant une composition et des propriétés uniforme partout ; les substances sont mélangés de façon homogène.
- ✓ **Mélange hétérogène** : un type de mélange dont la composition et les propriétés ne sont pas les mêmes partout ; les substances ne sont pas mélangés uniformément.



Fig.3. Mélange hétérogène

- ✓ **Phase** : partie distincte et visible (homogène) dans un mélange



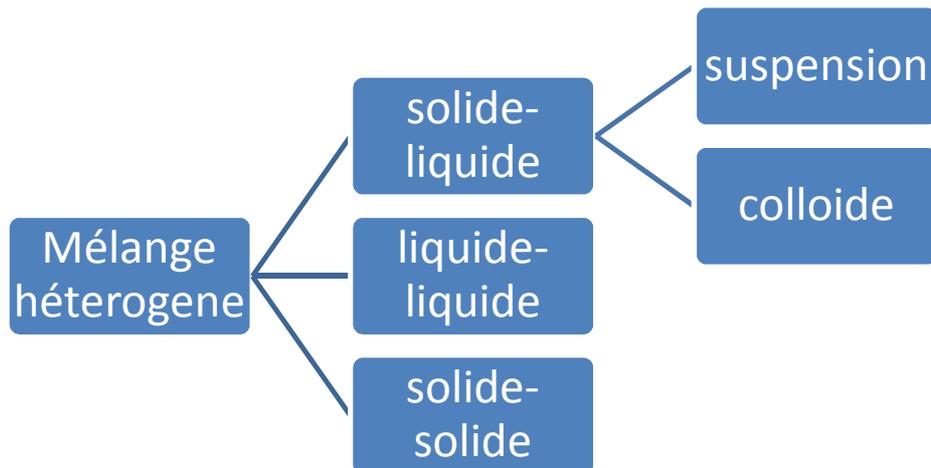
Fig.4. Phase

Remarque

Un corps pur peut être obtenu à partir d'un mélange homogène ou hétérogène en utilisant des méthodes physiques ou chimiques de séparation.

1. Séparation d'un mélange hétérogène

Un mélange hétérogène peut être constitué de :



1.1. Cas d'un mélange solide-liquide

1.1.1. Filtration

Technique permettant de séparer certaines particules (solides) dispersées dans un fluide, appelé milieu dispersant (liquide ou gaz) par le moyen d'un média poreux.

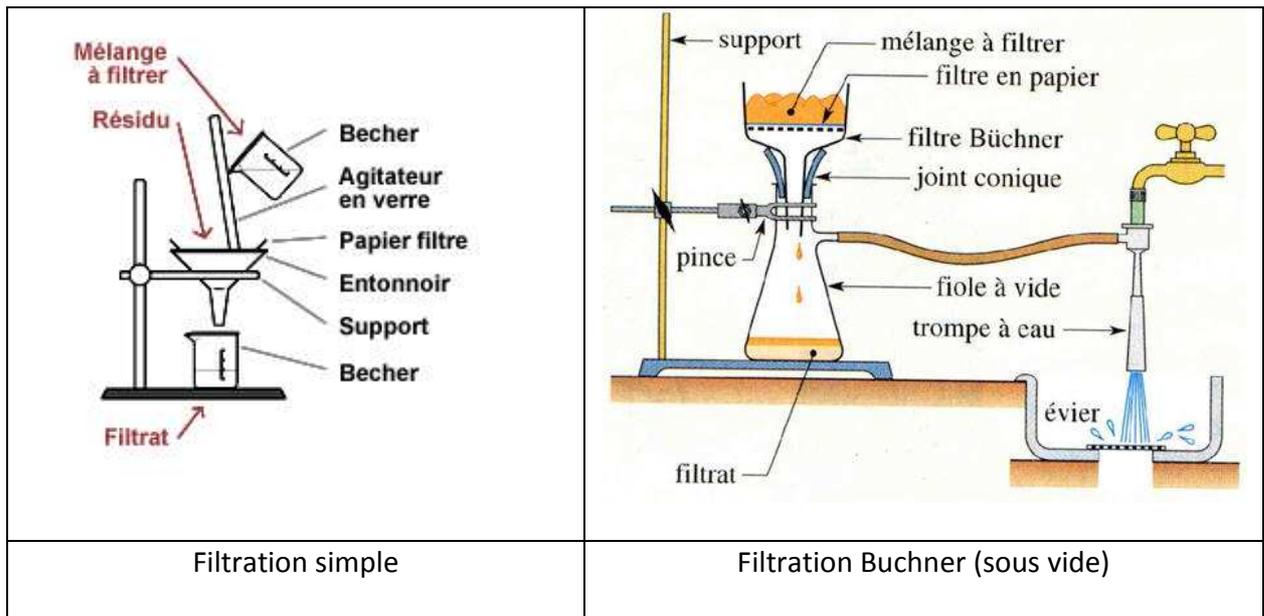
Lors d'une filtration, le filtre retient les constituants solides (résidus). Le filtrat est le liquide homogène obtenu par filtration.

Le but de la filtration est :

- Récupération du solide (le liquide est rejeté) ;
- Récupération du liquide (le solide est rejeté) ;
- Récupération du liquide et du solide.

Appareillage





La filtration des particules ayant une taille de l'ordre du mm peut se faire par un simple filtre, mais les particules dont leur taille est de l'ordre du micro ou nanomètre ne peuvent pas être retenues qu'à l'aide des membranes aux pores les plus fins (filtration membranaire).

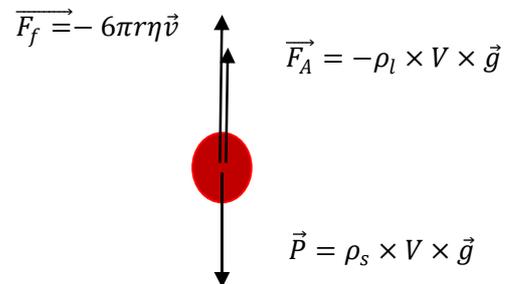
1.1.2. Sédimentation

La sédimentation est le dépôt des particules solides en suspension dans un liquide sous l'action de la pesanteur. Cette technique est utilisée pour séparer les particules solides dont les dimensions sont comprises entre 10 et 100 micromètre environ de la phase liquide.

Lors de la sédimentation de particules solides de masse m , de diamètre d et de masse volumique ρ_s dans un milieu liquide de masse volumique ρ_l et de viscosité η , les particules sont soumises à l'action de trois forces :

- Le poids (mg) dirigé vers le bas;
- La poussée d'Archimède; fonction de la différence de masse volumique entre la particule et le milieu liquide (dirigée vers le haut);

- La force de frottement exercée sur la particule par le liquide, du fait de sa viscosité.



Lorsque les forces de frottement visqueux équilibrent la résultante du poids et de la poussée d'Archimède :

$$-6\pi r \eta v - \rho_l \times V \times g + \rho_s \times V \times g = 0$$

La particule (supposée sphérique) se déplace alors à une vitesse constante appelée vitesse de sédimentation, qui est donnée par la loi de Stokes (pour un régime laminaire) :

$$v_s = \frac{(\rho_p - \rho_l) \times d^2 \times g}{18\eta}$$

v_s : Vitesse de sédimentation verticale de la particule (m/s)

g : accélération de la pesanteur terrestre $g = 9.81 \text{ m/s}^2$

d : diamètre des particules à sédimenter (m)

ρ_l : masse volumique du liquide en kg/m^3

ρ_s : masse volumique de la particule solide en kg/m^3

η : viscosité dynamique du liquide en Pa.s

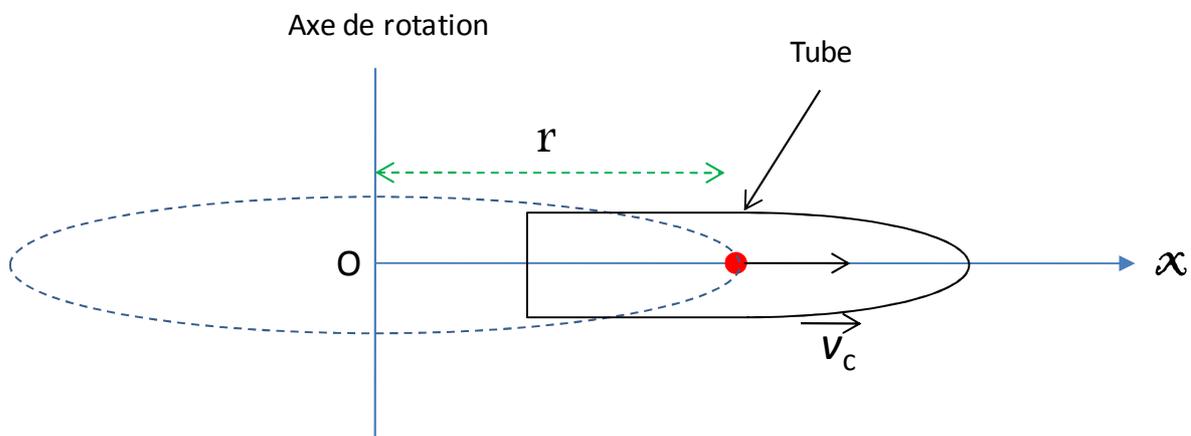
Les facteurs clefs de la sédimentation sont la différence de masse volumique entre le solide et le liquide, la taille des particules et la viscosité du liquide. Pour des particules de quelques microns, la vitesse de sédimentation devient trop faible. On utilise alors des adjuvants de floculation pour agglomérer les particules entre elles et augmenter ainsi leur vitesse limite de chute.

Appareillage

Le seul matériel nécessaire est un récipient (on peut utiliser un bécher).

1.1.3. Centrifugation

La séparation des composés d'un mélange est réalisée par sédimentation sous l'action de la force de gravité, mais elle nécessite parfois une longue durée pour acquérir de bons résultats et est donc souvent inefficace. Il est donc plus commode d'utiliser la centrifugation. Les composés sont soumis aux différentes forces centrifuges tout dépend de leur densité. Le mélange à séparer peut être constitué de particules solides en suspension dans un liquide, voire même les macromolécules à partir de solutions en fonction de leur taille. La vitesse de sédimentation peut être multipliée par un facteur de 100 à 10000, rendant l'opération réalisable avec des temps de séjours beaucoup plus courts.



$$V_c = \frac{(\rho_p - \rho_l) \times d^2 \times \gamma}{18\eta}$$

$$\gamma = r\omega^2$$

Appareillage

On réalise une centrifugation à l'aide d'une centrifugeuse. Il s'agit d'un appareil doté de tubes destinés à contenir des mélanges et pouvant tourner autour d'un axe.



Fig.5. Centrifugeuse



Fig.6. Tube pour centrifugeuse

1.2. Cas d'un mélange liquide-liquide (liquides non miscibles)

1.2.1. Décantation

Technique de séparation basé sur la différence de gravité (du à la différence de densité) de phases non-miscibles (liquide/liquide).

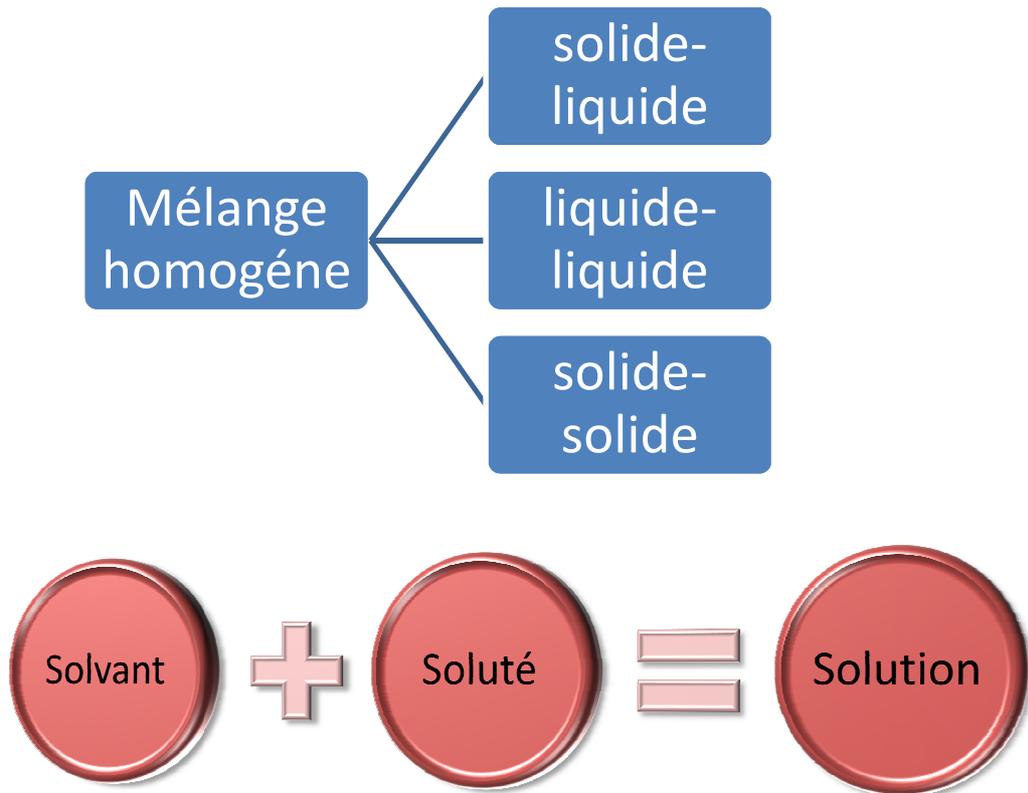
Appareillage

A l'échelle de laboratoire, on réalise une décantation à l'aide d'une ampoule à décanter (Fig. 4).



Fig.7. Ampoule à décanter

2. Séparation d'un mélange homogène (solution)

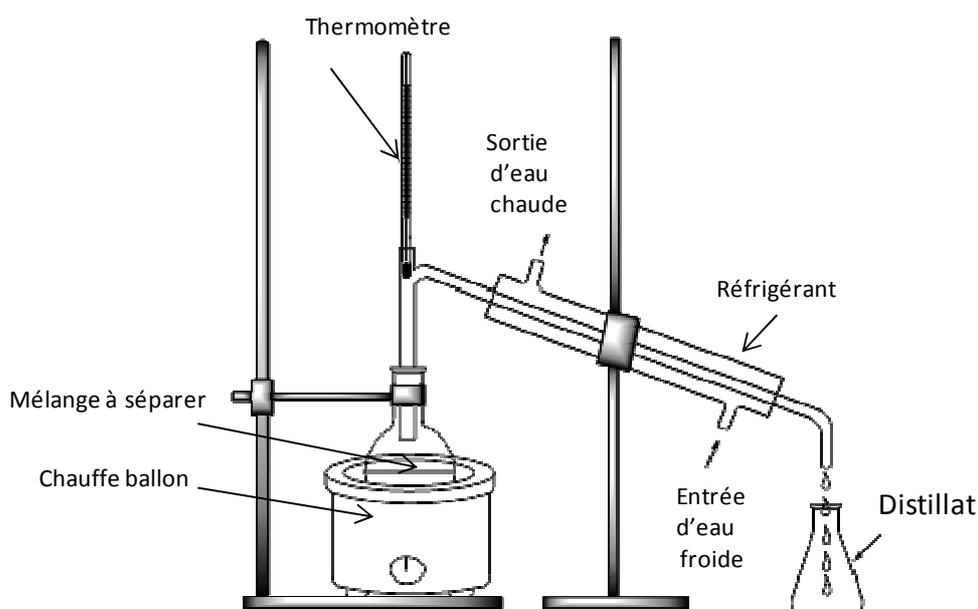


2.1. Cas d'un mélange liquide-liquide (miscibilité totale)

2.1.1. Distillation simple (séparation par changement d'état)

Technique utilisée pour séparer 2 constituants volatils d'un mélange ayant des températures d'ébullition assez différentes. Elle consiste à chauffer le mélange jusqu'à ébullition (vaporisation). Les vapeurs produits s'élèvent dans la colonne de distillation et arrivent dans le réfrigérant où ils se liquéfient. Le liquide recueilli par condensation est appelé distillat.

Appareillage



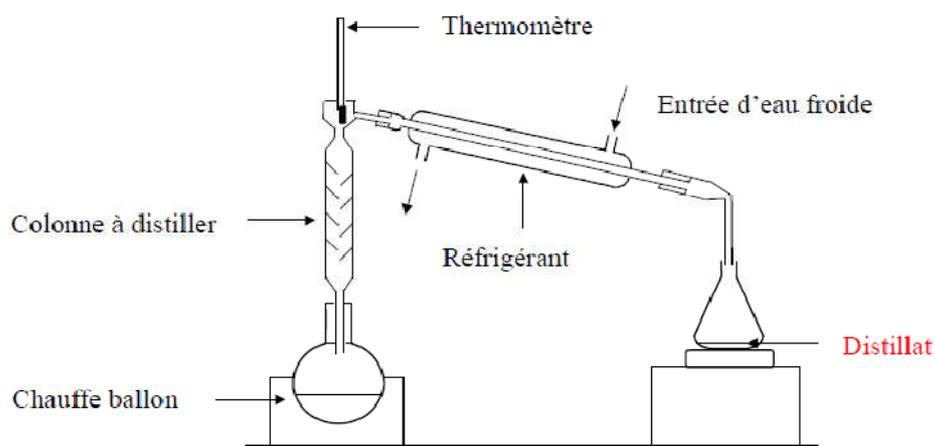
2.1.2. Distillation fractionnée

Permet de séparer les constituants volatils d'un mélange dont les points d'ébullition sont proches. La séparation s'effectue en plusieurs étapes d'où son nom « fractionnée ». Cette

séparation s'établit par une série de vaporisations et de condensations caractérisées par un échange de matière entre une phase vapeur ascendante et une phase liquide descendante.

Appareillage

A l'échelle de laboratoire, on se sert d'un ballon de distillation équipé d'une colonne de fractionnement, dont le rôle est d'effectuer simultanément toute une série de distillations successives du fait des nombreux équilibres qui s'y établissent entre la vapeur qui monte et le liquide condensé qui descend. On y parvient en augmentant au maximum la surface interne de la colonne, en remplissant celle-ci de nombreux petits anneaux de verre. Un thermomètre placé en tête de colonne indique la température de passage des vapeurs, ce qui permet de contrôler la bonne marche de la distillation.



2.2. Cas d'un mélange solide-liquide (solide totalement dissous dans un liquide)

2.2.1. Cristallisation

Consiste à isoler un produit sous forme de cristaux solides à partir d'une solution uniforme (homogène).

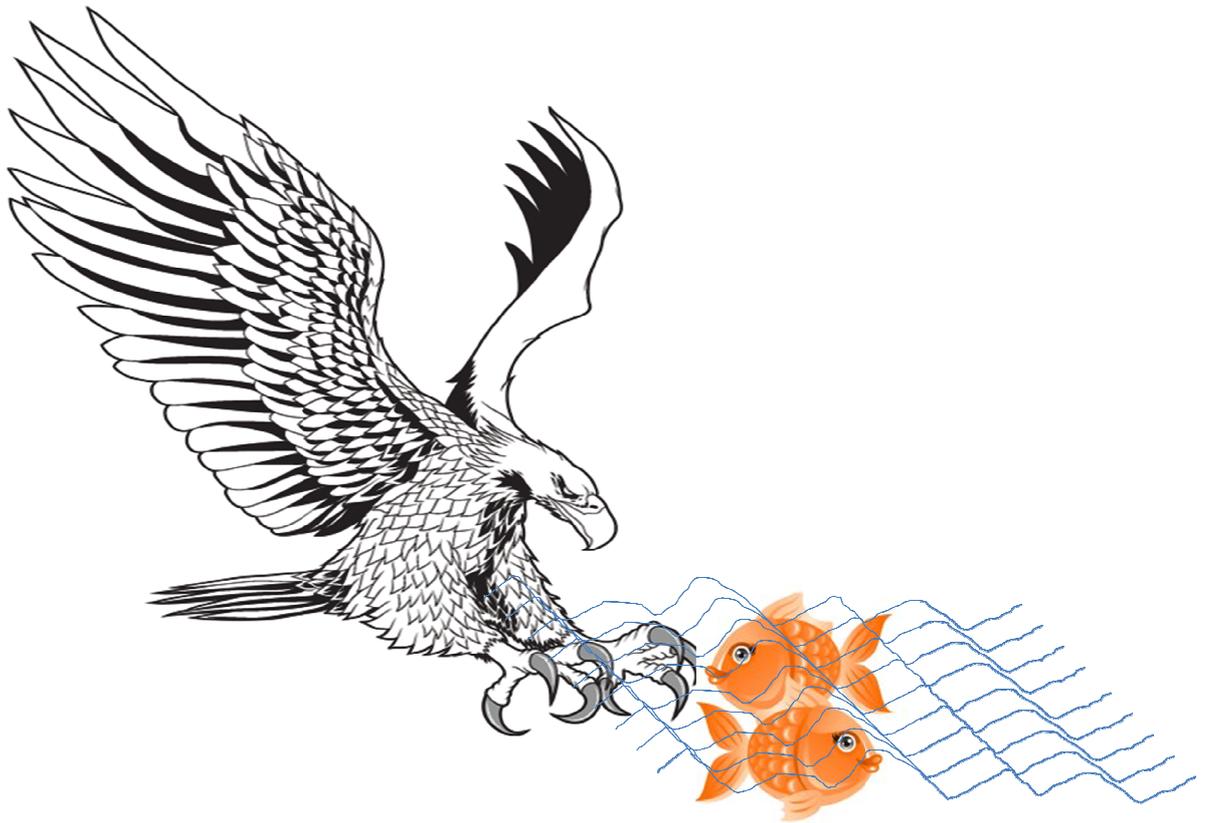
2.2.2. Evaporation

L'évaporation est utilisée lorsque la solution est composée d'un solide dissout dans un liquide. Si le liquide de la solution est volatil, on élimine le liquide en chauffant la solution. On peut ainsi recueillir le corps solide.

2.3. Cas d'un mélange solide-solide

2.3.1. Sublimation (séparation par changement d'état)

Son principe consiste à chauffer le mélange pour engendrer la sublimation et à refroidir les vapeurs du composé sublimé par contact avec une surface froide. Cette méthode est possible si l'un des solides est nettement plus volatil que l'autre. Pour les mélanges ne contenant pas de solide sublimant à température ambiante, le principe consiste à abaisser la température et la pression de manière que seul un des constituants passe directement de l'état solide à l'état gazeux.



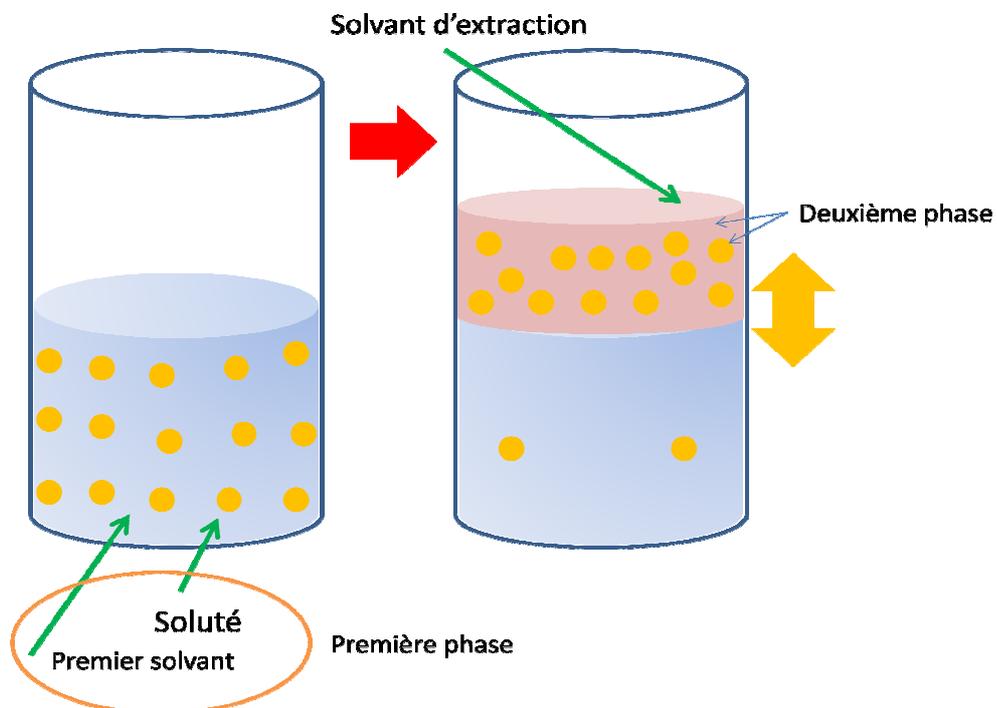
3. Extraction (séparation par transfert de phase)

L'extraction consiste à retirer une ou plusieurs espèces chimiques d'un milieu solide ou liquide. Si l'espèce à extraire est présente dans un liquide, il s'agit d'une **extraction liquide-liquide**. Si l'espèce à extraire est présente dans un solide, il s'agit d'une **extraction solide-liquide**.

3.1. Extraction liquide-liquide (extraction par un solvant)

Consiste à transférer un soluté d'un solvant (généralement polaire) à un autre (généralement non polaire). Le solvant d'extraction doit répondre à deux critères :

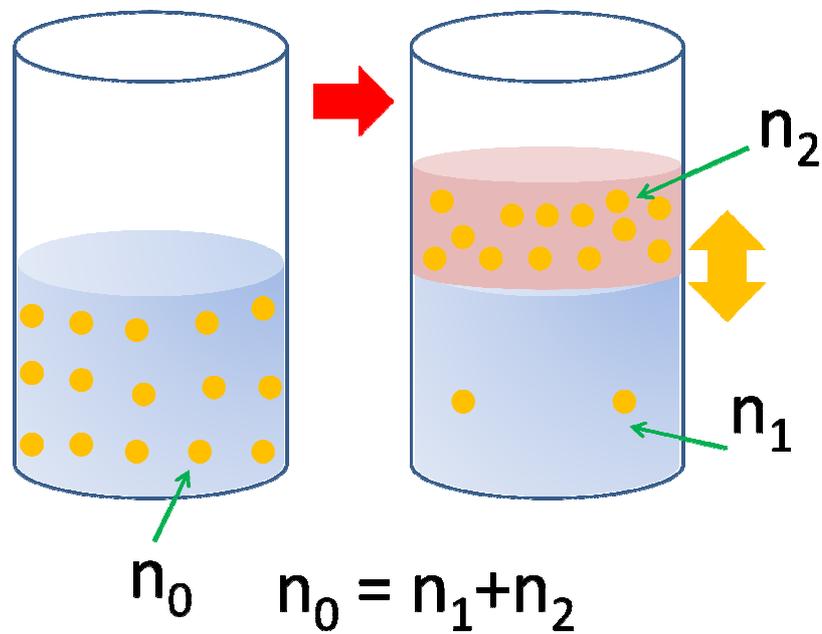
- Il ne doit pas être miscible avec le premier solvant.
- L'espèce à extraire doit y être plus soluble que dans le premier solvant .



3.1.1. Coefficient de partage (coefficient de distribution)

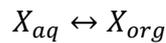


- Considérons un soluté X dans la phase 1 à extraire par un solvant organique (phase 2).



- Lorsque les deux phases liquides sont en contact, X commence à se déplacer de la 1^{ère} phase vers la 2^{ème} phase.

- Ce déplacement est finalisé par un état d'équilibre caractérisé par une constante thermodynamique K appelée coefficient de partage (coefficient de distribution).
- **A l'équilibre:**



$$K_p = \frac{[X_{org}]}{[X_{aq}]}$$

Remarques:

K_p est le rapport des concentrations de la substance X dans les deux phases à l'équilibre. C'est le facteur de distribution d'un soluté entre deux solvants. Il ne dépend que de la température et de la nature des solvants.

L'extraction sera d'autant plus efficace que le coefficient de partage est grand, on choisit, lorsque cela est possible, un solvant d'extraction dans lequel le soluté est très soluble.

La plupart des extractions consistent à extraire un soluté d'un solvant aqueux/hydrophile par un solvant organique/hydrophobe.

Calcul de m_1 et m_2 (n_1 et n_2)

m_0 : masse de X initiale dans la phase 1

m_1 : masse de X à l'équilibre dans la phase 1

m_2 : masse de X à l'équilibre dans la phase 2

$$m_0 = m_1 + m_2$$

$$n_0 = n_1 + n_2$$

$$K = \frac{\left[X_{org} \right]}{\left[X_{aq} \right]} = \frac{\frac{m_2}{V_2}}{\frac{m_1}{V_1}} = \frac{\frac{m_2}{V_2}}{\frac{m_0 - m_2}{V_1}}$$

$$K = \frac{\left[X_{org} \right]}{\left[X_{aq} \right]} = \frac{\frac{n_2}{V_2}}{\frac{n_1}{V_1}} = \frac{\frac{n_2}{V_2}}{\frac{n_0 - n_2}{V_1}}$$

Calcul de p et q

p: fraction de X dans la phase 1

q: fraction de X dans la phase 2

$$p = \frac{m_1}{m_2 + m_1}$$

$$q = \frac{m_2}{m_2 + m_1}$$

$$p + q = 1$$

3.1.2. Extraction multiple

Extraire une quantité de soluté X d'une phase 1 avec un volume V d'un solvant d'extraction une

fois peut être remplacé par n fois d'extractions de V_i tel que:

$$\sum_{i=1}^{i=n} V_i = V$$

$$p_n = \frac{1}{\left(1 + K \times \frac{V_2}{V_1}\right)^n}$$

$$q_n = 1 - \frac{1}{\left(1 + K \times \frac{V_2}{V_1}\right)^n}$$

Remarque

« Les extractions multiples sont plus efficaces que l'extraction simple pour un même volume de solvant ».

3.1.3. Rendement d'extraction

$$r = \frac{n_{\text{solvant d'extraction}}}{n_0}$$

3.1.4. Quelques solvants d'extraction usuels

Solvant	Densité (g/ml)
Hexane	0.695
Ether	0.708
Toluène	0.867
Eau	1.000
Dichlorométhane	1.325
Chloroforme	1.492

Appareillage

A l'échelle de laboratoire, on travaille sur des volumes de solution à extraire de l'ordre de la centaine de ml. On utilise pour cela des ampoules à décanter. On choisit une ampoule de volume tel que les phases liquides occupent au maximum la moitié de l'ampoule.

Pour réaliser l'extraction, on suit le protocole suivant :

- On utilise une ampoule à décanter, dans laquelle on mélange la solution initiale et le solvant.
- On mélange la solution, pour faciliter le passage de l'espèce à extraire vers le solvant.
- On laisse reposer quelques instants, puis on élimine la phase inférieure en ouvrant le robinet inférieur de l'ampoule à décanter. La phase inférieure est récupérée dans un bécher.

3.2. Extraction solide - liquide

L'extraction solide-liquide consiste à dissoudre sélectivement un ou plusieurs composés contenus dans une phase solide initiale par un solvant adéquat (soit par immersion soit par percolation). C'est une opération de transfert ou d'échange de matière entre une phase solide, qui contient la matière à extraire et une phase liquide (solvant d'extraction).

On peut utiliser successivement des solvants dont le pouvoir solvant vis-à-vis des constituants de la phase solide est différent (dissolution fractionnée).

En pratique, on ne peut pas dissoudre un seul composé, on entraîne nécessairement avec lui d'autres constituants de la phase solide, quelque soit le solvant utilisé.

3.2. 1. Immersion

a) Macération

Procédé qui consiste à laisser séjourner un solide dans un liquide froid pour en extraire les composés solubles. Il s'agit d'un processus d'extraction à température ambiante

b) Infusion

Méthode d'extraction par dissolution dans un solvant (eau) initialement bouillant que l'on laisse refroidir (méthode d'extraction des principes actifs et/ou des arômes d'un végétal).

Cette opération s'oppose à la décoction, dans laquelle le liquide est maintenu bouillant, et à la macération dans laquelle le liquide est froid. Le solvant n'est pas nécessairement de l'eau, cela peut être également une huile ou un alcool.

c) Décoction

Méthode d'extraction par dissolution dans un solvant (eau) bouillant (méthode d'extraction des principes actifs et/ou des arômes d'une préparation généralement végétale par dissolution dans l'eau bouillante). Elle s'applique généralement aux parties les plus dures des plantes : racines, graines, écorce, bois. Elle est utilisée en herboristerie, en teinture, en brasserie et en cuisine. Le terme désigne également les préparations obtenues par cette méthode.

3.2. 2. Percolation

Extraction au Soxhlet

L'extracteur soxhlet est un ingénieux dispositif en verre permettant l'extraction des substances à partir d'une matrice solide en utilisant un solvant approprié. Le solide est placé dans une cartouche poreuse. Le solvant, contenu dans le ballon, est porté à l'ébullition, ce qui le transfère dans la partie supérieure. Là, il est condensé grâce à un réfrigérant situé en haut de

l'installation et s'accumule autour et à l'intérieur de la cartouche. Lorsque le solvant atteint le niveau supérieur du siphon (voire figure), le mélange est renvoyé dans le ballon par différence de pression, où il est à nouveau évaporé. Plusieurs cycles d'extraction sont ainsi effectués et la durée de l'opération est laissée libre à l'utilisateur. On considère avoir alors atteint l'épuisement total en soluté du substrat solide et avoir concentré l'extrait.

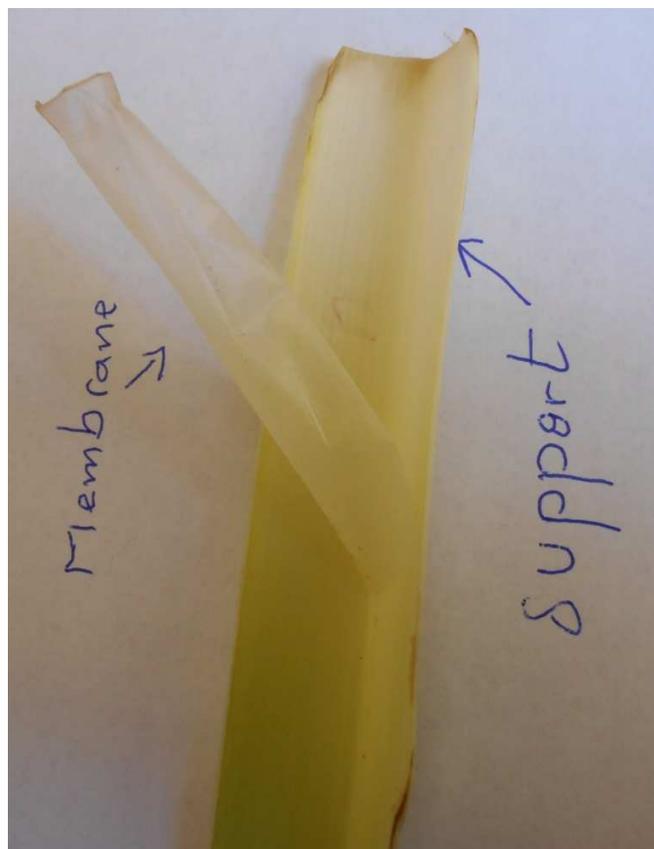


Fig.8. Extracteur Soxhlet

4. Osmose, osmose inverse et dialyse

4.1. Osmose

Si on considère un système à deux compartiments séparés par une membrane semi-perméable contenant deux solutions aqueuses de même volume mais de concentrations différentes, on constate un transfert de l'eau à travers la membrane dirigé de la solution diluée vers la solution concentrée (phénomène d'osmose).





Plus généralement, l'osmose est le transfert de solvant à travers une membrane sous l'effet d'un gradient de concentration.

L'osmose est le passage de molécules de solvant, en général de l'eau, à travers une membrane semi-perméable, depuis le milieu le moins concentré (hypotonique) en solutés vers celui le plus concentré (hypertonique).

Ce phénomène s'arrête lorsque les deux liquides séparés par la membrane ont atteint la même concentration. On parle alors de milieux isotoniques. La pression hydrostatique due à la différence de hauteur d'eau entre les deux milieux et compense la pression osmotique

4.2. Osmose inverse

Si on applique une pression sur la solution concentrée, la quantité d'eau transférée par osmose va diminuer. Avec une pression suffisamment forte, le flux d'eau va même s'annuler :

cette pression est appelée la pression osmotique P_0 (en faisant l'hypothèse que la solution diluée est de l'eau pure). Si on dépasse la valeur de la pression osmotique, on observe un flux d'eau dirigé en sens inverse du flux osmotique : c'est le phénomène d'osmose inverse.

L'osmose inverse est utilisée pour :

- ❖ Le dessalement des eaux de mer ;
- ❖ Le dessalement des eaux saumâtres ;
- ❖ La production d'eau ultra pure.

Osmolarité (ω)

L'osmolarité d'une solution est le nombre de moles des entités en solution dans 1 litre de solution.

$$\omega = \beta \times C \quad [\text{osmol/l}]$$

C : concentration molaire [mol/l]

β : nombre des entités formées par dissociation du soluté (sans unité)

$$\beta = 1 + \alpha(\gamma - 1)$$

Tel que :

α : Taux de dissociation.

γ : Nombre d'ions libérés par une molécule totalement dissociée.

Si $\alpha = 1$ (dissociation complète)

$$\beta = \gamma$$

Pression osmotique

La pression osmotique d'une solution peut être calculée en utilisant la loi de Van't Hoff, qui prévoit que la pression osmotique exercée par le soluté est égale à la pression que le corps aurait exercé à l'état gazeux parfait dans le même volume et la même température.

$$\pi = \omega \times RT$$

C : concentration molaire

R : constantes des gaz parfaits

T : température absolue

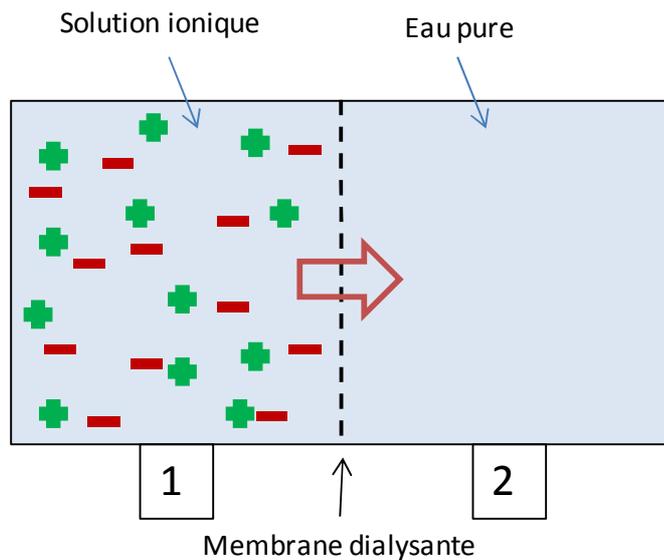
Cette relation est valable pour des solutions diluées et donc les pressions osmotiques faibles.

4.3. Dialyse

« Diffusion d'un soluté à travers une membrane qui lui est perméable ».

Soient deux compartiments séparés par une membrane dialysante : l'un contient une solution ionique seulement et l'autre contient de l'eau pure.

On assiste à un phénomène classique de diffusion, les ions peuvent traverser la membrane car celle-ci est dialysante. Le déplacement s'effectue du compartiment (1) vers (2).



Les ions diffusent et se retrouvent de part et d'autre de la membrane.

A l'état d'équilibre, les ions se sont repartis de part et d'autre de la membrane de façon homogène : $C_1 = C_2$. Il en résulte une égalité des potentiels électrochimiques.

$$V_1 - V_2 = \frac{-RT}{ZF} \ln \left(\frac{C_1}{C_2} \right) = 0$$

4.3.1. Effet Donnan

Si dans l'un des compartiments il y a une protéine chargée, celle-ci a alors tendance à retenir les ions de signes opposés créant ainsi des inégalités de concentration ionique entre les compartiments. Il en résulte un équilibre caractérisé par une différence de potentiel (DDP) membranaire non nulle : c'est l'effet Donnan (potentiel de Donnan). Cette différence de potentiels électrochimiques est donnée par la loi de Nernst :

$$V_1 - V_2 = \frac{-RT}{ZF} \ln \left(\frac{C_1}{C_2} \right)$$

Note :

1. L'effet Donnan n'est observable qu'avec une membrane dialysante.
2. Chacun des ions en présence vérifie l'équilibre de Donnan à travers son potentiel :

$$V_1 - V_2 = \frac{-RT}{+1F} \ln \frac{[Na]_1}{[Na]_2}$$

$$V_1 - V_2 = \frac{-RT}{-1F} \ln \frac{[Cl]_1}{[Cl]_2}$$

$$V_1 - V_2 = \frac{-RT}{+2F} \ln \frac{[Ca]_1}{[Ca]_2}$$

$$V_1 - V_2 = \frac{-RT}{-2F} \ln \frac{[SO_4]_1}{[SO_4]_2}$$

On définit à partir d'égalités un rapport r (rapport de Donnan) :

$$r = \frac{[Na^+]_1}{[Na^+]_2}$$

Bien que les concentrations ne soient pas égales, il est important de comprendre que l'équilibre de Donnan respecte les lois de l'électroneutralité. Chacune des solutions est électriquement neutre.

Le signe du potentiel dépend de la localisation de la protéine. Tout compartiment a même signe que la protéine qu'il contient.

Cette technique est utilisée pour :

- ✓ Concentrer une solution macromoléculaire.

- ✓ Changer le solvant dans lequel sont dissoutes les macromolécules.

Chromatographie

Chromatographie



Introduction

Au début du vingtième siècle, le botaniste russe Mikhaïl Semenovivch Tswett (1872-1919) a pu, pour la première fois en 1903, séparer des pigments végétaux par une méthode qu'il l'a appelé chromatographie (c'était une colonne en glass remplie de carbonate de calcium et l'éther de pétrole comme éluant). Depuis, l'histoire de cette méthode a connu une grande révolution tant au coté scientifique que technique.

1. Définition

La chromatographie est une méthode de séparation d'un mélange homogène liquide ou gazeux en ses différents constituants. C'est également une méthode d'analyse qui a pour but d'identifier et de quantifier les composés d'un mélange homogène.

2. Principe

Le principe repose sur les équilibres de concentration des composés à l'égard de deux phases non miscibles en contact :

- ✓ **La phase stationnaire** qui est emprisonnée dans une colonne ou fixée (greffée) sur un support poreux (gel de silice).
- ✓ **La phase mobile** se déplaçant au contact de la phase stationnaire (éthanol).

L'entraînement à des vitesses différentes des constituants par la phase mobile au contact de la phase stationnaire conduit à leur séparation comme le montre la figure 2. Les constituants portés par la phase mobile traversent la phase stationnaire avec des temps qui dépendent de leurs propriétés intrinsèques (taille, structure, charge électrique, polarité ...) ou de leur affinité vis-à-vis des deux phases (solubilité...). Chaque constituant est donc soumis à une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et une force de mobilité (due à la phase mobile).

De ce phénomène appelé rétention, il résulte que les constituants du mélange injecté se déplacent tous moins vite que la phase mobile et que leurs vitesses de déplacement sont différentes. Ils sont ainsi élués de la colonne les uns après les autres et donc séparés. A leur arrivée en bout de la colonne, le détecteur mesure en continu la quantité de chaque constituant.

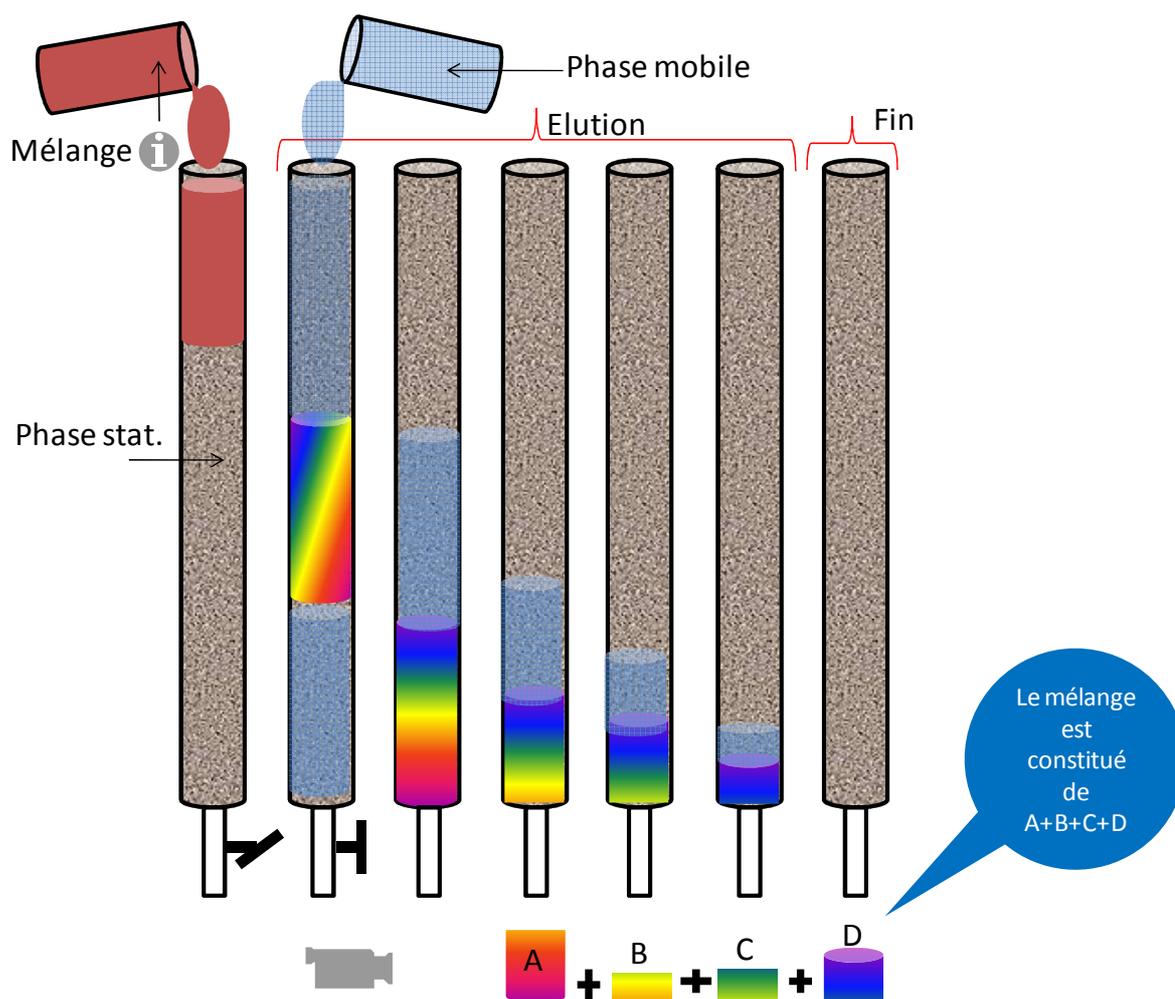


Fig.9. Principe de la chromatographie.

3. Terminologie (glossaire)

- **Phase mobile** : fluide qui peut être soit liquide soit gazeux (mais pas solide !).
- **Phase stationnaire** : peut-être soit :

- ✓ Un solide finement pulvérisé (offrant une grande surface de contact).
- ✓ Un liquide (gel) immobilisé sur un support fixe (greffé).
- **Élution** : l'élution est un processus au cours duquel les analytes sont entraînés à travers une phase stationnaire par le mouvement d'une phase mobile.
- **Éluant** : solvant permettant d'éluer le composé.
- **Adsorption** : L'adsorption définit la propriété de certains matériaux de fixer à leur surface des ions ou des molécules de façon plus ou moins réversible. Les médias utilisés ont une structure poreuse (leur conférant une grande surface spécifique).

Prenant l'exemple d'une phase mobile apolaire (hydrocarbures) et une phase stationnaire polaire (comme le gel de silice); lors du passage des solutés, des interactions électrostatiques s'établissent entre ceux-ci et la silice tandis que l'éluant (apolaire) passe avec une vitesse plus grande que les solutés. Donc, les solutés sortent par ordre croissant de leur polarité (les plus polaires sortent en dernier).

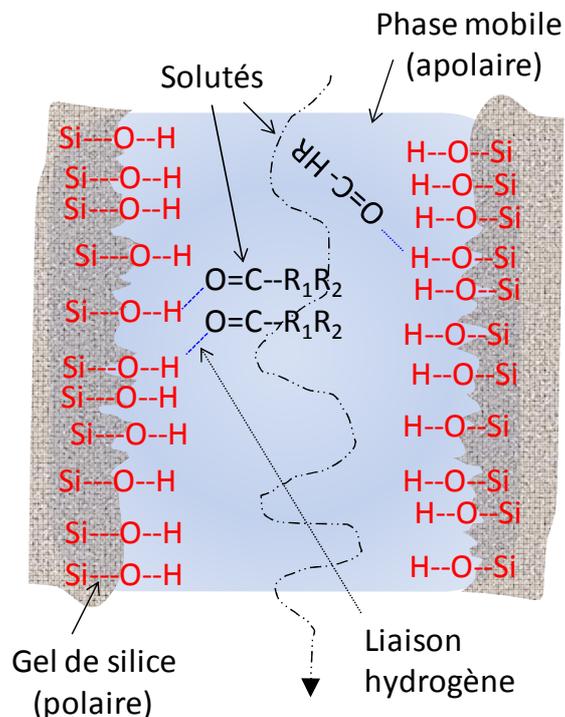


Fig.10. Principe de l'adsorption

- **Partage (partition) :** répartition différentielle de chacun des solutés entre deux liquides non miscibles, l'un constituant la phase stationnaire et l'autre la phase mobile. Lorsque l'on ajoute un composé dans un milieu comprenant deux phases liquides non miscibles en contact, celui-ci va se répartir dans ces deux phases dans des proportions bien définies dépendantes de son coefficient de partage K entre ces deux phases (notion de solubilité). Ce coefficient est une constante thermodynamique d'équilibre définie à une température T et à un pH donné.
- **Temps de rétention :** temps au bout duquel un composé est élué de la colonne (ou plaque) et détecté (caractérise qualitativement une substance).

4. Interactions intermoléculaires

Ce sont des interactions de nature électrostatique et de faible énergie. Les phénomènes chromatographiques sont gouvernés et régis essentiellement par ce type de liaison. On cite les plus connues par ordre croissant de leur force.

4.1. Forces de dispersion de London

- ✓ Interaction entre dipôles instantanés
- ✓ Interaction présente dans tous les composés
- ✓ N'intervient qu'à courte distance
- ✓ Augmentent avec la polarisabilité des molécules

4.2. Forces de Debye

- Interaction entre dipôles permanents et dipôles instantanés (ou induits)

4.3. Forces de Keesom

- Attraction entre dipôles permanents

4.4. Liaison hydrogène

- Attraction de type Keesom entre un H lié à un atome électronégatif et un autre atome électronégatif.
- Interaction à plus longue distance

5. Types de chromatographie (classification)

Il existe plusieurs types de chromatographie selon la nature physique de la phase mobile, la nature de phénomènes de rétention, le conditionnement de la phase stationnaire et selon le procédé d'observation de la séparation (détection).

- **Selon la nature physique de la phase mobile**
 - Chromatographie en phase liquide : le fluide porteur est un liquide ;
 - Chromatographie en phase gazeuse : le fluide porteur est un gaz.
- **Selon le type de support et le phénomène de rétention**
 - La chromatographie d'absorption (interaction chimique) ;
 - La chromatographie de partage (solubilité dans l'une des 2 phases) ;
 - La chromatographie d'affinité (reconnaissance par forme) ;
 - La chromatographie d'échange ionique (force ionique) ;
 - La chromatographie de filtration ou d'exclusion (exclusion par taille).

Le tableau suivant résume les différents types de chromatographie

Chromatographie en phase liquide		
	Type	Phase stationnaire
Liquide/solide	Adsorption	Solide poreux
	Echange d'ions	Solide à la surface duquel se trouvent des sites ioniques qui permettent à l'aide d'un solvant approprié l'échange d'ions présents dans la phase mobile (colonne échangeuse d'ions)
	D'exclusion (filtration sur gel, perméation de gel)	Solide dont la dimension des pores permet la séparation des espèces selon leur taille
Liquide/liquide	Partage (phase normale)	Solide poreux inerte enrobé de liquide (de moins en moins utilisée)
	partage (phase inversée)	Solide poreux sur lequel sont greffées des chaînes hydrocarbonées non-polaires

Chromatographie en phase gazeuse		
	Type	Phase stationnaire
Gaz/solide	Adsorption	Solide poreux
Gaz/liquide	Partage	Dans les colonnes remplies, solide poreux inerte enrobé de liquide
		Dans les colonnes capillaires, paroi interne de la colonne qui sert de support

➤ On s'intéresse ici qu'aux trois principaux types de chromatographie :

- Chromatographie en couche mince (CCM) ;
- Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) ;
- Chromatographie en phase gazeuse (CPG).

5.1. Chromatographie sur couche mince (CCM ou TLC)

Cette technique fait partie de la chromatographie planaire où la phase stationnaire (sous forme d'une couche mince) est fixée sur une plaque (en métal ou en plastique) sur laquelle on dépose une goutte de chaque échantillon à analyser (voir figure 4). Cette technique s'est rapidement devenue une alternative à la chromatographie sur papier de part sa commodité relative et sa simplicité de mise en œuvre et encore sa rapidité.

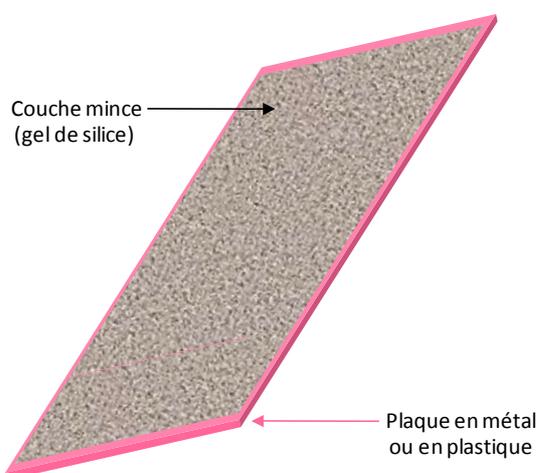


Fig.11. Couche mince pour la chromatographie

5.1.1. Principe

Son principe est simple et est basé essentiellement sur les phénomènes d'adsorption et de partage.

L'échantillon (environ 1 microlitre de solution du mélange à analyser) est déposé ponctuellement en bas de la plaque (la plaque est placée dans la cuve à chromatographie contenant l'éluant ; phase mobile). Les différents constituants sont élués par la phase mobile qui grimpe par capillarité vers le haut de la plaque.

- Le milieu poreux est constitué par une couche mince (0.1-2mm) d'un matériau adsorbant comme le gel de silice, alumine, cellulose, déposé sur une plaque de métal ou plastique.
- Les substances à séparer (analyser) sont déposées sur une plaque, à l'état dissous dans un solvant approprié.
- Le liquide porteur est un solvant ou un mélange de solvants pour faire varier la polarité du liquide. Il remonte par capillarité en circulant de bas en haut de la couche.
- La séparation est due à l'adsorption sur la phase stationnaire de molécules dissoutes ; plus son affinité pour les molécules est grande, plus les molécules sont retenues et leur transit est retardé.
- La détection est généralement effectuée directement sur la plaque, soit par l'application d'un révélateur (permanganate de potassium) ou par une substance fluorescente incorporée dans le matériau adsorbant ou par des rayonnements UV.

5.1.2. Appareillage

L'appareillage utilisé pour la chromatographie sur couche mince est relativement simple, étant composé d'une plaque et d'une cuve rectangulaire pour l'éluion. On peut également utiliser un simple bocal de verre pour les couches minces plus petites.

Les principales étapes d'une chromatographie sur couche mince sont :

- a) Préparation de la plaque (activation par chauffage à l'étuve) ;
- b) Déposition des échantillons inconnus et des standards ;
- c) Préparation de l'éluant et de la cuve ;
- d) Elution de la plaque ;
- e) Séchage de la plaque ;
- f) Révélation des taches (lampe U.V, iode ou réactifs chimiques spécifiques) ;
- g) Calcul des R_f et interprétation des résultats.

✓ La chromatographie sur couche mince sert essentiellement à l'analyse qualitative.

5.2. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique comme le montre la Fig. 5.

5.2.1. Principe

Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne et grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

Appareillage

La chromatographie liquide à haute pression s'effectue avec un appareil commercial dont ses principaux constituants sont montrés sur la figure suivante.

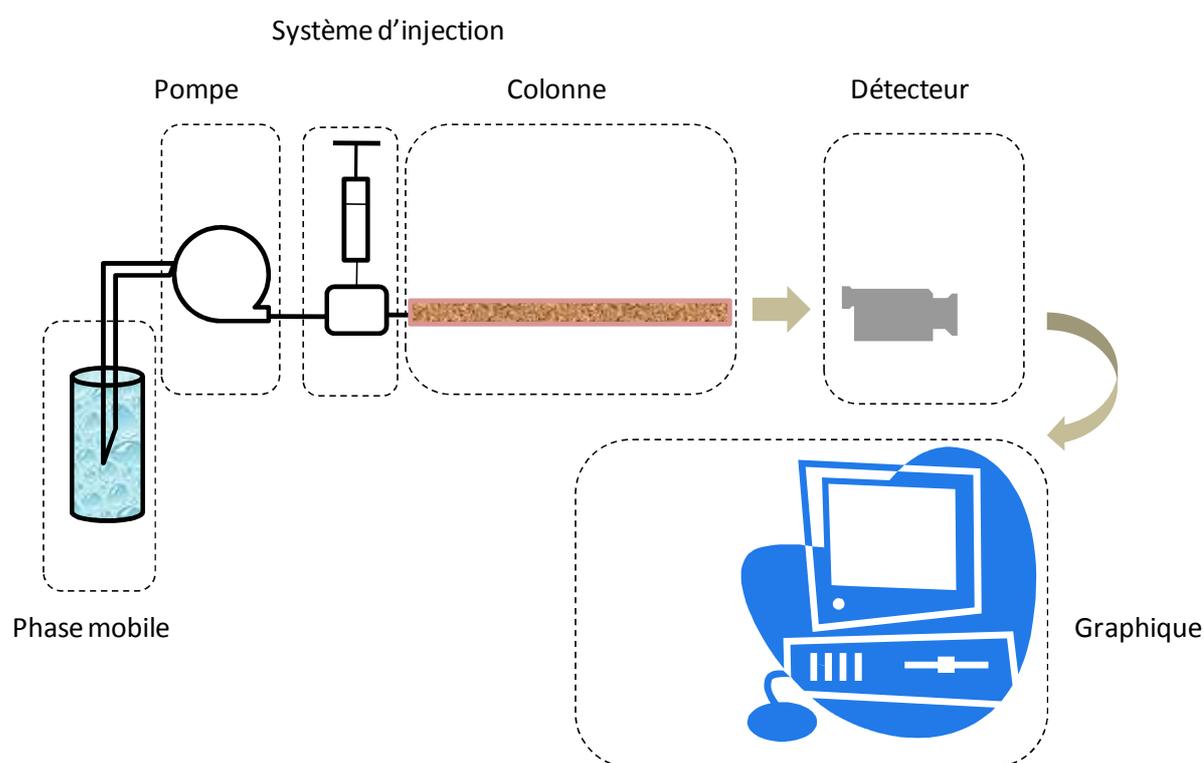


Fig.12. Principe de fonctionnement de l'HPLC

La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants qui doit être de pureté analytique.

La phase stationnaire est un support plus ou moins poreux recouvert d'un gel (liquide greffé) qui a les propriétés désirées pour retenir les molécules de solutés. La phase mobile ou éluant est un liquide qui entraîne les solutés à travers la colonne.

Le rôle de la pompe en HPLC est de pousser l'éluant à travers la colonne à une pression élevée et à un débit constant. Elle doit être inerte à la corrosion des solvants utilisés, offrir un bon choix de débits et être conçue pour réduire les pulsations au minimum.

5.3. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Technique de séparation applicable aux composés gazeux ou aux composés susceptibles d'être volatilisés par élévation de la température. La nécessité de maintenir les molécules à l'état gazeux implique donc que toute opération chromatographique se réalise à une température compatible avec cet état sans provoquer leur destruction. La phase mobile est un gaz vecteur et la phase stationnaire est un solide seul (chromatographie d'adsorption) ou une phase liquide imprégnée sur un solide (chromatographie de partage).

Appareillage

Un appareil de chromatographie en phase gazeuse comporte trois parties ou systèmes : chambre d'injection, colonne et détecteur (Fig. 00) à travers lesquels un gaz vecteur de haute pureté entraîne les substances d'un mélange à séparer. Les gaz vecteur les plus utilisés sont l'hélium, l'argon et l'azote...

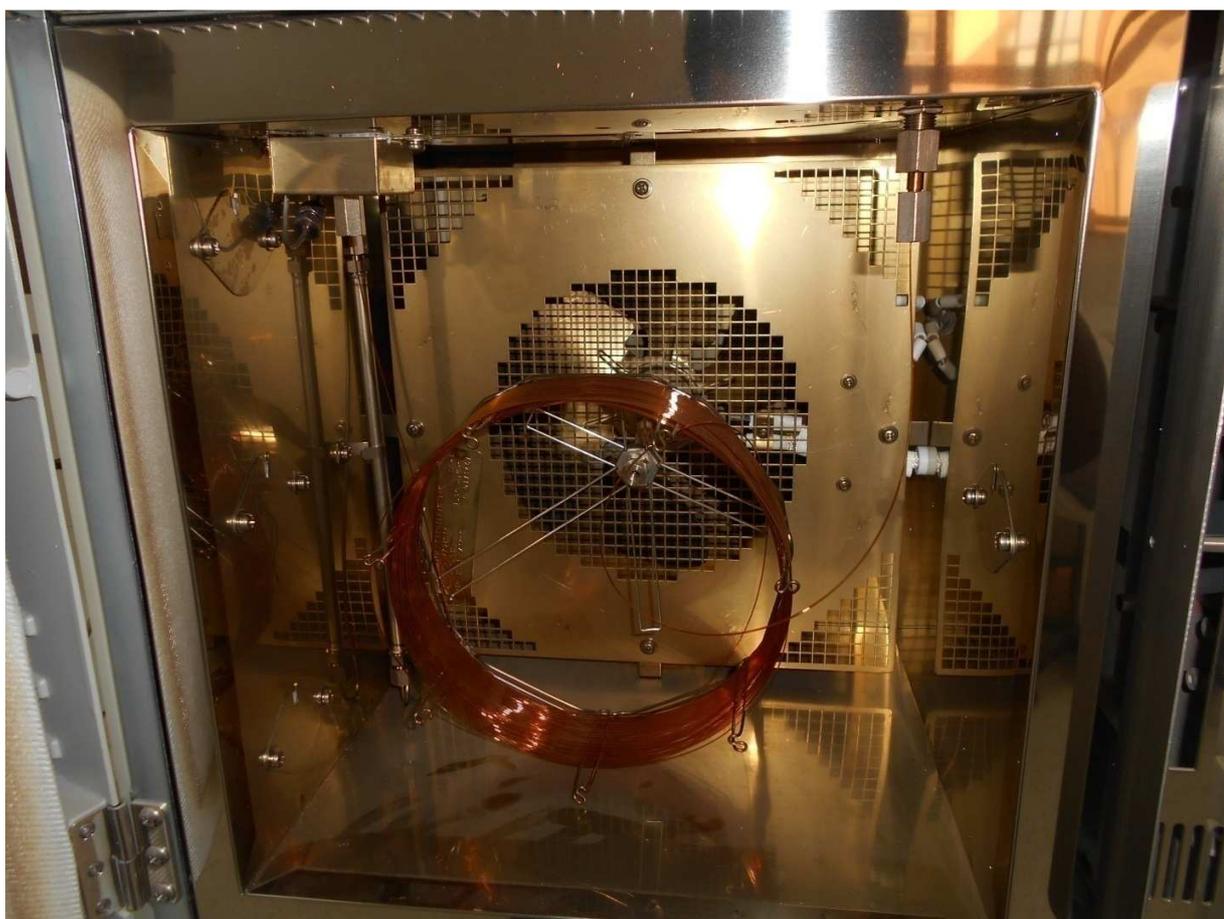


Fig.13. Colonne pour chromatographie en phase gazeuse

6. Détection

C'est l'une des étapes les plus intéressantes en chromatographie, durant laquelle les composés seront identifiés en exploitant une propriété qui les différencient les uns des autres. Pour ce faire, ils existent plusieurs méthodes de détection à savoir :

6.1. Spectrophotométrie d'absorption UV-visible

Ces détecteurs utilisent les propriétés d'absorption des molécules à une longueur d'onde caractéristique. Cette propriété est partagée par beaucoup de molécules, ce qui fait de ces détecteurs peu sélectifs et leur limite de détection est de 1 ng.

6.2. Détecteurs à ionisation de flamme (FID)

C'est un détecteur non spécifique, car il peut déceler pratiquement tous les composés combustibles, c'est-à-dire les composés organiques. Il est cependant insensible aux molécules minérales ayant un potentiel d'ionisation élevé : H₂O, CO, CO₂, N₂, ce qui présente un avantage lorsqu'on veut analyser des solutions aqueuses ou des atmosphères.

6.3. Fluorimétrie

Certains composés absorbent de l'énergie dans le domaine ultra-violet et en réémettent une fraction à une longueur d'onde plus grande. L'intensité réémise est proportionnelle à la concentration des molécules. Cependant, peu de substances soumises à un rayonnement ultraviolet sont fluorescentes, ce qui limite l'utilisation de ce mode de détection. Des traitements de dérivation peuvent rendre des molécules fluorescentes, mais cela ajoute une étape supplémentaire à l'analyse.

6.4. Spectromètre de masse

L'identification des composés séparés se fait en analysant les ions formés dans le spectromètre et qui se séparent dans un champ électromagnétique en fonction de leur charge et de leur masse. Ce détecteur est universel et très sensible, avec des limites de détection de l'ordre du ng. Il permet l'identification et la quantification des espèces chromatographiées. La difficulté majeure est l'élimination de la phase mobile et la vaporisation du soluté avant son entrée dans le spectromètre. De plus, ce mode de détection détruit l'échantillon (analyse destructive).

7. Paramètres décrivant la colonne et le chromatogramme

7.1. Chromatogramme typique

Le résultat de l'analyse est présenté sous forme d'un graphe appelé chromatogramme (ensemble de pics) qui représente la distribution statistique des temps de transit des composés dans la colonne (courbe de Gauss).

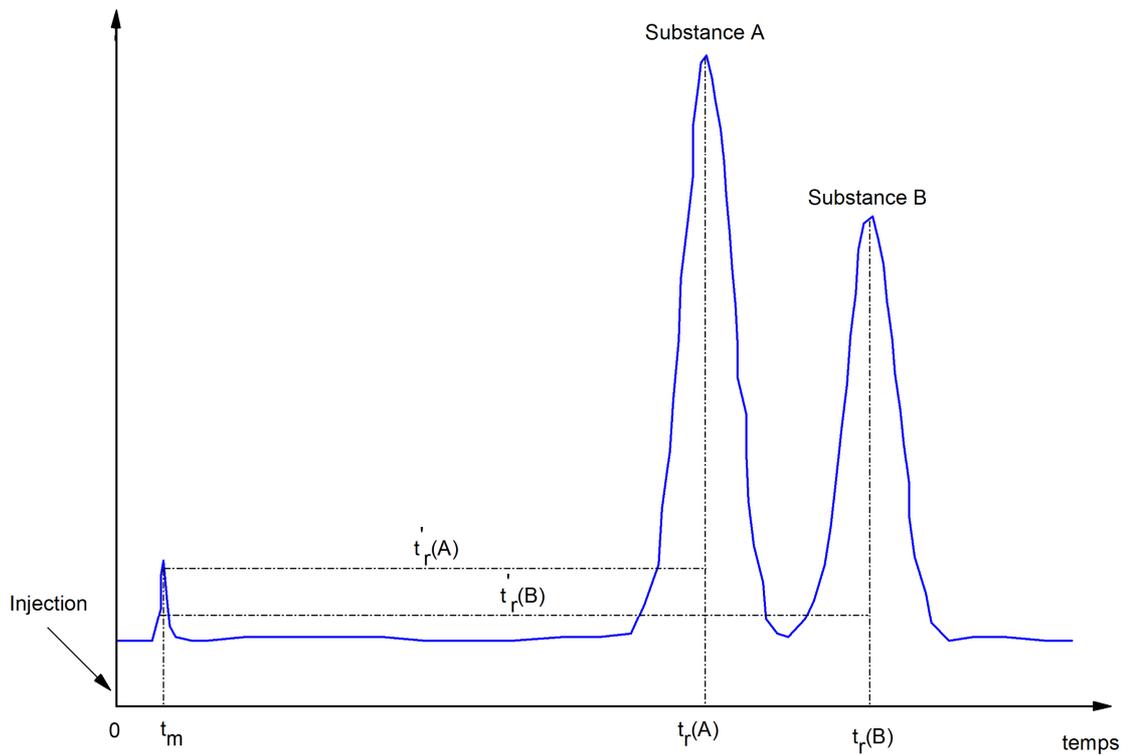


Fig.14. Chromatogramme typique

- Le temps de rétention est une grandeur qualitative : il est identique pour des conditions identiques.
- L'aire ou la hauteur est une grandeur quantitative.

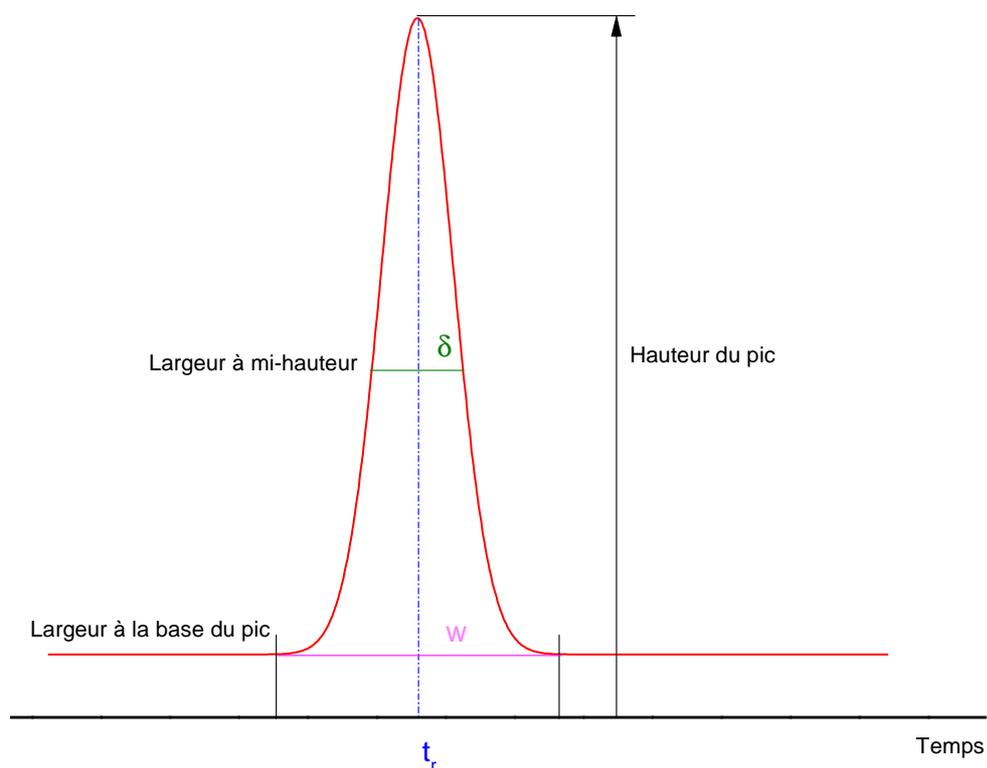


Fig.15. Représentation graphique d'un pic d'éluant

Un chromatogramme est un graphique mettant en évidence différents pics d'allure sensiblement gaussienne qui apparaissent à des temps qui sont propres à chaque soluté (composé). En fait, chacun des solutés se déplace indépendamment des autres avec une vitesse qui lui est propre et qui dépend de son comportement vis-à-vis des deux phases, notamment de son affinité avec la phase stationnaire.

t_m ou t_0 : temps que met l'éluant (non retenu) pour arriver au bas de la colonne, ce qui correspond au temps mis pour parcourir les espaces interstitiels et les volumes dits morts. La vitesse de passage de la phase mobile est constante.

t_r : temps écoulé entre l'introduction du composé dans la colonne et le moment où il sort à sa concentration maximale (temps de rétention brut) ;

t_s : temps de séjour du composé dans la phase stationnaire, [temps de rétention net] (aussi appelé : temps corrigé ou réduit t'_r).

7.2. Nombre de plateaux théoriques (efficacité d'une colonne)

On assimile la colonne chromatographique à une suite de plateaux sur lesquels s'établit l'équilibre du soluté entre les phases stationnaires et mobiles.

Pour une distribution approximativement gaussienne, la formule du nombre de plateaux théoriques est donnée par :

$$N_{th} = 5.54 \left(\frac{t_r}{w} \right)^2$$

t_r : temps de rétention

w : largeur du pic à mi-hauteur (unité de temps)

7.3. Hauteur d'un plateau théorique

Afin de pouvoir comparer les colonnes chromatographiques, on définit la hauteur équivalente de plateaux théoriques :

$$HEPT = \frac{L}{N_{th}}$$

L : longueur de la colonne

7.4. Coefficient de distribution (ou de partage)

Il caractérise la rétention d'un composé par la phase stationnaire.

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

C_s = concentration du soluté dans la phase stationnaire

C_m = concentration du soluté dans la phase mobile

7.5. Facteur de capacité (ou de rétention)

$$K' = \frac{m_s}{m_m} = \frac{C_s \times V_s}{C_m \times V_m} = K \times \frac{V_s}{V_m}$$

$$K' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

V_s : volume de la phase stationnaire ($V_s = V_{colonne} - V_{mobile}$)

V_m : volume de la phase mobile dans la colonne (l'équivalent du volume mort)

7.6. Facteur de sélectivité

Positions relatives de deux pics adjacents sur un chromatogramme (voire Fig.7). La valeur de α peut être déterminée selon le temps de rétention ou on peut utiliser α pour estimer s'il est possible de séparer les deux espèces en question.

$$\alpha = \frac{t_r(\text{composé B}) - t_m}{t_r(\text{composé A}) - t_m} = \frac{t'_r(\text{composé B})}{t'_r(\text{composé A})}$$

Alpha est supérieur à zéro signifie une meilleure séparation

7.7. Résolution

La résolution est une mesure de la qualité d'une séparation chromatographique.

$$R_s = 2 \frac{[t_r(B) - t_r(A)]}{(w_B + w_A)}$$

7.8. Volume de rétention

$$V_r = t_r \times D$$

D : débit de la phase mobile

Volume d'un pic

$$V_{pic} = w \times D$$

7.9. Equation de van Deemter

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

A = diffusion turbulente due à l'écoulement irrégulier de la phase mobile à travers la phase stationnaire (particules plus ou moins régulières)

Indépendant du débit

Ne dépend que des particules (augmente quand le diamètre augmente)

B = diffusion longitudinale, rend compte de la diffusion des molécules dans la direction de l'écoulement (d'autant plus important que la vitesse est faible)

C = transfert de masse représente les inégalités de passage des molécules d'une phase à l'autre

Toutes les molécules ne sont pas entraînées à la même vitesse

Le contact entre phase mobile et phase stationnaire ne s'effectue pas partout de manière identique

Les molécules de solutés dans la phase stationnaire sont situées à des distances variables de la phase mobile

u = vitesse de la phase mobile, dépend de : température, pression, colonne

✓ **Une bonne séparation en chromatographie liquide implique**

1. que les divers constituants du mélange soient retenus sur la colonne, donc présentent une affinité pour la phase stationnaire suffisante pour qu'ils apparaissent dans l'effluent après un volume supérieur au volume interstitiel de la colonne.
2. que les différents pics soient bien séparés, ce qui pour deux pics successifs dépend de la distance séparant les sommets et leur largeur.
3. que l'analyse soit aussi rapide que possible.

Electrophorèse

Electrophorèse

Introduction

L'électrophorèse est une méthode de séparation d'espèces ou de molécules chargées (molécules organiques, telles que protéine) électriquement par migration différentielle sous l'action d'un champ électrique extérieur.

Electrophorèse

Principe

Les espèces ou molécules chargées sont placées dans un gel. Une tension est appliquée et les molécules se déplacent à travers le gel, tout dépend de leur masse et charge et aussi tout en respectant leur signe (les cations vers l'électrode négative et les anions vers l'électrode positive).

Bibliographie

Martine Rebstein, Chantal Soerensen, Chimie : préparation au bac et à la maturité, presse polytechniques et universitaires romandes (2007), ISBN 978-2-88074-739-8

R. Freitag, Modern Advances in Chromatography, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2002, ISBN : 3-540-43042-3

J. Michael Hollas, Modern Spectroscopy, John Wiley & Sons, 2004 (ISBN : 0 470 84416 7), The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England

