

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur Et de La Recherche Scientifique



Université de Ghardaïa



Faculté des Sciences et de la Technologie

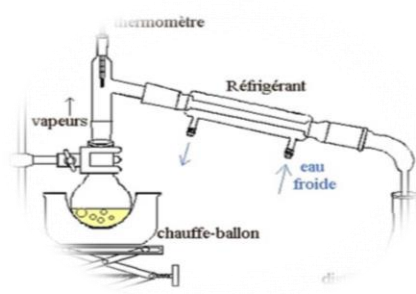
Polycopie de

# Cours de techniques d'analyse physico-chimique

*Partie I*  
*Méthodes de séparation*

**Dr. Hellali Naima**

Cours destinés aux étudiants  
de 2<sup>ème</sup> année Chimie domaine science de la matière



**Année universitaire 2019/2020**

# Avant propos

Ce polycopié s'adresse à tous les étudiants poursuivant des études dans les différentes filières des sciences et technologies, notamment les étudiants de deuxième année licence des sciences de la matière, Il a été rédigé dans le but de permettre d'avoir un outil de travail et de référence recouvrant les connaissances qui leur sont demandés.

Ce polycopié est structuré en six chapitres comme suit :

Au chapitre I, nous avons présenté des généralisations sur les états de la matière et les méthodes de séparation, ainsi qu'une définition de la matière, de ses formes trouvées dans la nature et les différents types de mélanges.

Le deuxième chapitre décrit quelques méthodes utilisées pour la séparation des constituants d'un mélange hétérogène, parmi ces méthodes nous avons cité : la décantation, la centrifugation et la filtration.

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

Le quatrième chapitre est consacré aux deux techniques : la distillation et la lyophilisation, qui sont utilisées pour séparer des constituants d'un mélange homogène par l'utilisation d'une méthode repose sur le changement d'état de l'un des constituants.

Dans les deux derniers chapitres (5ème et 6ème), nous étudions les méthodes chromatographiques, nous avons commencé dans le chapitre cinq par définitions et généralités sur les méthodes chromatographiques plus la mise en œuvre de la CCM ensuite l'étude théorique et l'HPLC et le CPG (instrumentations et la mise en œuvre) sont donnés au chapitre 6.

En fin de ce manuscrit nous donnons une liste de références bibliographiques utilisées.

*Dr. Hellali Naima*

# Abréviation

aq : Phase aqueuse  
C : Concentration  
CCM : Chromatographie sur couche mince  
 $C_M$  : Concentration à l'équilibre du soluté dans la phase mobile.  
CPG : Chromatographie en phase gazeuse  
CPL : Chromatographie en phase liquide  
 $C_S$  : Concentration à l'équilibre du soluté dans la phase stationnaire  
FID : Flame Ionization Detector  
Hp : Hauteur d'élution du produit  
HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance  
Hs : Hauteur d'élution du solvant  
GC : Gaz Chromatography  
K : Coefficient de distribution du composé entre la phase stationnaire et la phase mobile  
K' : Facteur de capacité  
 $K_p$  : Coefficient de partage  
LC : Liquid chromatography  
N : Nombre de plateaux théoriques dans la colonne  
 $N_{eff}$  : Nombre de plateaux effectifs  
org : Phase Organique  
PhS : Phase stationnaire.  
PhM : Phase mobile  
PVC : Poly(chlorure de vinyle)  
R : Rendement  
 $R_f$  : Rapport frontal de la substance  
S : Solubilité  
 $t_0$  : Temps de début de l'injection,  
 $T_{eb}$  : Température d'ébullition  
 $t_m$  : Temps mort,  
 $t_r$  : Temps de rétention (ou encore d'élution  $t_e$ ) d'un composé  
 $t_r'$  : Temps de rétention réduit,  
UV : Ultraviolet  
 $V_e$  : Volume d'élution d'un composé  
 $V_e'$  : Volume d'élution réduit,  
 $V_h$  : Volume équivalent de phase mobile dans le plateau théorique  
Vis : Visible  
 $V_m$  : Volume mort de la colonne,  
 $V_r$  : Volume de rétention,  
 $W_b$  : largeur du pic à la base  
 $W_h$  : largeur du pic à mi-hauteur

# Table des Matières

Titre .....Page

## Chapitre I

### *Généralités sur les états de la matière et les méthodes de séparations*

|          |  |   |
|----------|--|---|
| I.1.     | La matière .....                             | 2 |
| I.1.1    | Les corps purs.....                          | 3 |
| I.1.2.   | Les états de la matière .....                | 3 |
| I.1.3.   | Les changements d'états.....                 | 4 |
| I.1.3.1. | Influence de la température.....             | 5 |
| I.1.3.2. | Influence de la pression.....                | 6 |
| I. 2.    | Mélanges.....                                | 7 |
| I.2.1.   | Définition.....                              | 7 |
| I.2.2.   | Mélanges hétérogènes.....                    | 7 |
| I.2.3.   | Mélanges homogènes.....                      | 8 |
| I.3.     | Les méthodes de séparation d'un mélange..... | 9 |
| I.3.1.   | Définition.....                              | 9 |
| I.3.2.   | Principe de la séparation.....               | 9 |

## Chapitre II

### *Séparation des constituants d'un mélange hétérogène*

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| II.1.     | La filtration .....   | 12 |
| II.1.1.   | Principe de la filtration .....                                       | 12 |
| II.1.2.   | Les objectifs de la filtration .....                                  | 13 |
| II.1.3.   | Les matériaux filtrants .....   | 13 |
| II.1.4.   | Inconvénients de la filtration.....                                   | 13 |
| II.1.5.   | Les techniques de filtration.....                                     | 14 |
| II.1.6.   | Applications .....  | 15 |
| II.2.     | La décantation.....   | 15 |
| II.2.1.   | Décantation solide-liquide (sédimentation) .....                      | 15 |
| II.2.1.1. | Principe de la sédimentation .....                                    | 15 |
| II.2.2.   | Décantation liquide-liquide (deux phases liquides non miscibles)..... | 17 |
| II.3.     | La centrifugation .....   | 18 |
| II.3.1.   | Principe de la centrifugation .....                                   | 18 |
| II.3.2.   | Les équations de la centrifugation .....                              | 19 |
| II.3.3.   | Appareillage .....  | 20 |
| II.3.4.   | Choix des centrifugeuses.....   | 21 |
| II.3.5.   | Applications de la centrifugation .....                               | 21 |

## Chapitre III

### *Séparation par rupture de phase et extraction*

|            |  |    |
|------------|--|----|
| III.1.     | Séparation par rupture de phase .....                                | 24 |
| III.1.1.   | Techniques d'élimination du solvant .....                            | 24 |
| III.1.1.1. | Elimination du solvant sous pression ambiante.....                   | 24 |
| III.1.1.2. | Elimination du solvant sous pression réduite .....                   | 25 |
| III.1.1.3. | Elimination du solvant par l'utilisation des agents desséchants..... | 27 |
| III.1.2.   | Rupture de phase par diminution de la solubilité.....                | 27 |
| III.1.2.1. | Précipitation par vaporisation.....                                  | 28 |

|              |  |    |
|--------------|--|----|
| III.1.2.2.   | Précipitation par modification de la température.....              | 29 |
| III.1.2.3.   | Précipitation par modification du solvant.....                     | 29 |
| III.1.2.4.   | Précipitation par ajout d'ion (effet d'ion commun).....            | 29 |
| III.2.       | Séparation par extraction .....                                    | 30 |
| III.2.1.     | Principe général.....  | 30 |
| III.2.2.     | Extraction liquide-liquide .....                                   | 30 |
| III.2.2.1.   | Propriétés des solvants d'extraction.....                          | 31 |
| III.2.2.2.   | Coefficient de partage.....  | 33 |
| III.2.2.3.   | Rendement d'extraction .....                                       | 34 |
| III.2.2.3.1. | Détermination expérimentale.....                                   | 34 |
| III.2.2.3.2. | Détermination théorique.....                                       | 34 |
| III.2.2.4.   | Optimisation du rendement R .....                                  | 36 |
| III.2.2.5.   | Relation entre la masse restante et le nombre des extractions..... | 37 |
| III.2.2.6.   | Comment améliorer l'extraction pratiquement.....                   | 38 |
| III.2.2.7.   | Problèmes rencontrés.....  | 39 |
| III.2.2.7.1  | Emulsions.....   | 39 |
| III.2.2.7.2  | Produits d'interface.....  | 39 |
| III.2.3.     | Extraction solide-liquide.....                                     | 40 |
| III.2.3.1.   | Principe.....  | 40 |
| III.2.3.2.   | Extraction discontinue (Macération).....                           | 40 |
| III.2.3.2.1. | Avantages de la macération.....                                    | 40 |
| III.2.3.2.2. | Inconvénients de la macération.....                                | 41 |
| III.2.3.3.   | Extraction continue.....   | 41 |
| III.2.3.4.   | Récupération du soluté.....  | 42 |
| III.2.3.5.   | Lavage de la phase organique.....                                  | 43 |
| III.2.3.6.   | Séchage de la phase organique.....                                 | 43 |
| III.2.3.7.   | Evaporation du solvant d'extraction.....                           | 43 |

## Chapitre IV

### *Séparation par changement d'état*

|         |  |    |
|---------|--|----|
| IV.1.   | La distillation.....                             | 45 |
| IV.1.1. | Principe de la distillation.....                 | 45 |
| IV.1.2. | Distillation simple (ou élémentaire).....        | 45 |
| IV.1.3. | Distillation fractionnée (ou rectification)..... | 46 |
| IV.1.4. | Distillation sous pression réduite.....          | 47 |
| IV.2.   | La lyophilisation.....                           | 47 |
| IV.2.1. | Technique de la lyophilisation.....              | 48 |
| IV.2.2. | Avantages.....                                   | 48 |
| IV.2.3. | Applications.....                                | 48 |

## Chapitre V

### *Généralités sur les méthodes chromatographiques*

|          |  |    |
|----------|--|----|
| V.1.     | Définition de la chromatographie .....                           | 50 |
| V.2.     | Historique de la chromatographie .....                           | 50 |
| V.3.     | Terminologie générale de la chromatographie.....                 | 51 |
| V.4.     | Principe général.....  | 52 |
| V.5.     | Classification des techniques chromatographiques .....           | 53 |
| V.5.1.   | La chromatographie sur couche mince (CCM ou TLC en anglais)..... | 55 |
| V.5.1.1. | La phase mobile (PhM).....                                       | 55 |
| V.5.1.2. | La phase stationnaire(PhS).....                                  | 56 |

|            |  |    |
|------------|--|----|
| V.5.1.3.   | L'échantillon.....   | 56 |
| V.5.1.4.   | Choix des conditions opératoires.....                      | 56 |
| V.5.1.4.1. | Choix de la phase stationnaire.....                        | 56 |
| V.5.1.4.2. | Choix de l'éluant.....                                     | 57 |
| V.5.1.5.   | Réalisation d'une CCM.....                                 | 57 |
| V.5.1.6.   | Révélation.....  | 58 |
| V.5.1.6.1. | Révélation UV.....   | 58 |
| V.5.1.6.2. | Révélation à l'iode.....                                   | 58 |
| V.5.1.6.3. | Révélation par atomisation.....                            | 58 |
| V.5.1.7.   | Calculs et interprétation.....                             | 58 |
| V.5.1.8.   | Chromatographie bidimensionnelle.....                      | 59 |
| V.5.2.     | Chromatographie sur colonne en phase liquide (LC).....     | 60 |
| V.5.2.1.   | Chromatographie d'adsorption .....                         | 61 |
| V.5.2.2.   | Chromatographie de partage.....                            | 63 |
| V.5.2.3.   | Chromatographie d'exclusion stérique (SEC en anglais)..... | 64 |
| V.5.2.4.   | Chromatographie sur échangeurs d'ions(IEC en anglais)..... | 65 |
| V.5.2.5.   | Chromatographie d'affinité .....                           | 67 |
| V.5.3.     | Chromatographie en phase gazeuse.....                      | 67 |
| V.5.3.1.   | La chromatographie gaz-liquide.....                        | 68 |
| V.5.3.2.   | La chromatographie gaz-solide.....                         | 69 |
| V.5.4.     | Autres types de chromatographie.....                       | 70 |
| V.5.4.1.   | La chromatographie supercritique.....                      | 70 |
| V.5.4.2.   | L'électrophorèse .....                                     | 70 |

## Chapitre VI

### *La chromatographie sur colonne (HPLC et CPG) : Instrumentations et Aspects théoriques*

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| VI.1.       | La Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC).....                    | 72 |
| VI.1.1.     | Instrumentation .....   | 72 |
| VI.1.1.1.   | Réservoirs de solvants (éluant).....  | 73 |
| VI.1.1.2.   | Pompe.....  | 73 |
| VI.1.1.3.   | Vanne d'injection .....   | 73 |
| VI.1.1.4.   | Colonne.....  | 74 |
| VI.1.1.5.   | Détecteurs.....   | 75 |
| VI.2.       | La chromatographie en phase gazeuse (CPG).....                                | 75 |
| VI.2.1.     | Instrumentation .....   | 75 |
| VI.2.1.1.   | Legazvecteur(phasemobile).....  | 76 |
| VI.2.1.2.   | Échantillons.....   | 76 |
| VI.2.1.3.   | Injecteur.....  | 77 |
| VI.2.1.3.1. | Injection à chaud avec vaporisation directe dans le corps de l'injecteur..... | 77 |
| VI.2.1.3.2. | Injection à chaud « dans la colonne » avec vaporisation directe.....          | 77 |
| VI.2.1.3.3. | Injecteur split / splitless.....  | 77 |
| VI.2.1.3.4. | Injection à froid suivie d'une brusque montée de la température.....          | 78 |
| VI.2.1.4.   | Colonne (phasestationnaire).....  | 78 |
| VI.2.1.5.   | Four.....   | 79 |
| VI.2.1.6.   | Détecteur.....  | 80 |
| VI.3.       | Grandeurs et facteurs caractérisant la séparation en HPLC et CPG.....         | 81 |
| VI.3.1.     | Caractéristiques de l'élution .....   | 81 |
| VI.3.1.1.   | Coefficient de distribution .....   | 82 |
| VI.3.1.2.   | Facteur de capacité .....   | 83 |
| VI.3.2.     | Notion de pression.....   | 83 |
| VI.3.3.     | Notion d'efficacité .....   | 84 |

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| VI.3.3.1.   | Model des plateaux théoriques .....                                 | 84 |
| VI.3.3.2.   | Efficacité réelle (nombre de plateaux théoriques effectifs) .....   | 87 |
| VI.3.3.3.   | Hauteur équivalent à un plateau théorique H .....                   | 87 |
| VI.3.4.     | Qualité de la séparation .....                                      | 87 |
| VI.3.4.1.   | Coefficient de sélectivité ( $\alpha$ ).....                        | 87 |
| VI.3.4.2.   | Coefficient de résolution (R).....                                  | 88 |
| VI.3.5.     | Modèle cinétique de la chromatographie .....                        | 89 |
| VI.3.5.1.   | Diffusion turbulente (Terme A) .....                                | 89 |
| VI.3.5.2.   | Diffusion longitudinale (Terme B).....                              | 90 |
| VI.3.5.3.   | Résistance au transfert de masse (Terme C).....                     | 91 |
| VI.3.5.4.   | Courbe de Van Deemter.....  | 91 |
| VI.3.6.     | Application de la chromatographie à l'analyse.....                  | 93 |
| VI.3.6.1    | Analyses des chromatogrammes.....                                   | 93 |
| VI.3.6.2.   | Analyse quantitative .....  | 93 |
| VI.3.6.2.1. | Méthode de l'étalonnage externe .....                               | 93 |
| VI.3.6.2.2. | Méthode des ajouts .....  | 94 |
| VI.3.7.3.   | Méthode de l'étalon interne (utilisée essentiellement en CPG) ..... | 94 |

**Chapitre I**  
*Généralité sur les états de la matière*  
*Et les méthodes de séparation*



Dans la nature, on trouve en général des mélanges. Or le chimiste s'intéresse aux propriétés des corps purs. Ainsi, il doit être capable de séparer les mélanges en leurs corps purs constitutifs, c'est-à-dire trier les particules.

Ainsi, avant de discuter des méthodes de séparation, nous devons nous familiariser avec la matière, leurs formes qui existent dans la nature et les différents types des mélanges.

## I.1. La matière

Tout l'univers qui nous entoure est formé de matière. La matière est formée de différents corps. Chaque corps a une masse et occupe un volume.

### Exemple :

La figure I.1 représente quelques exemples des matières : le mercure, le cuivre, le soufre, le sel, le dibrome, le fer et le plastique (polypropène).

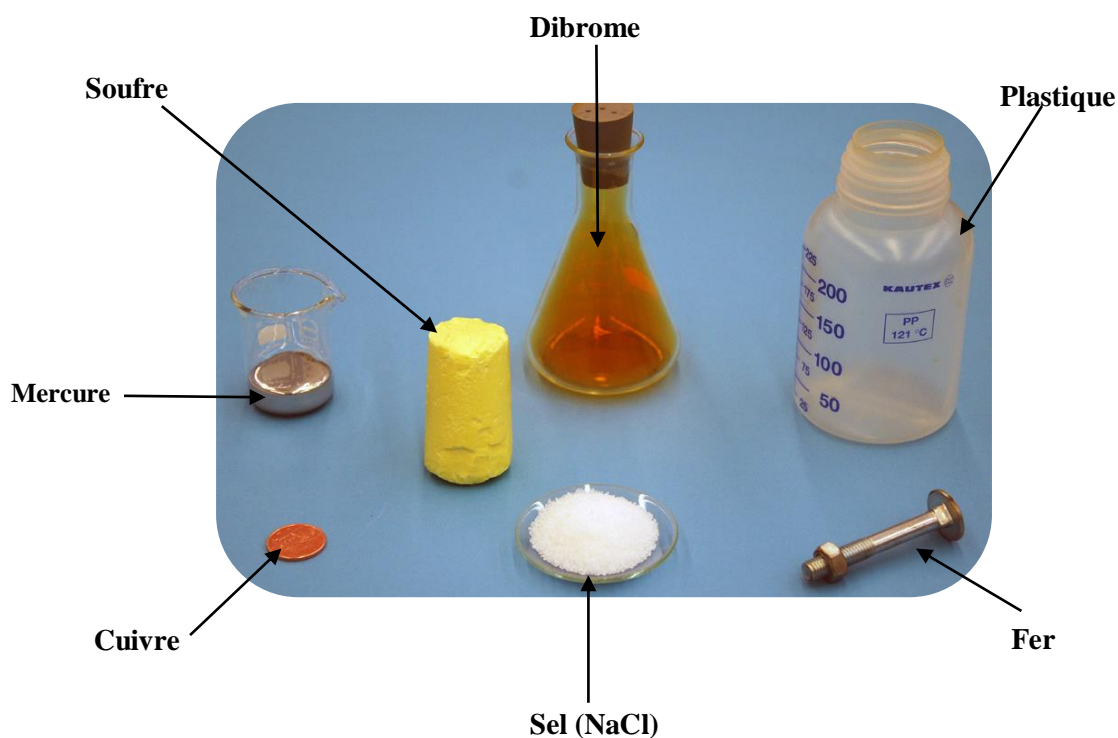


Figure I.1 : Exemples des matières

### I.1.1. Les corps purs

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

Voici quelques exemples de corps purs (Figure I.2) : le fer, l'eau distillée et le chlorure de sodium (sel de cuisine).

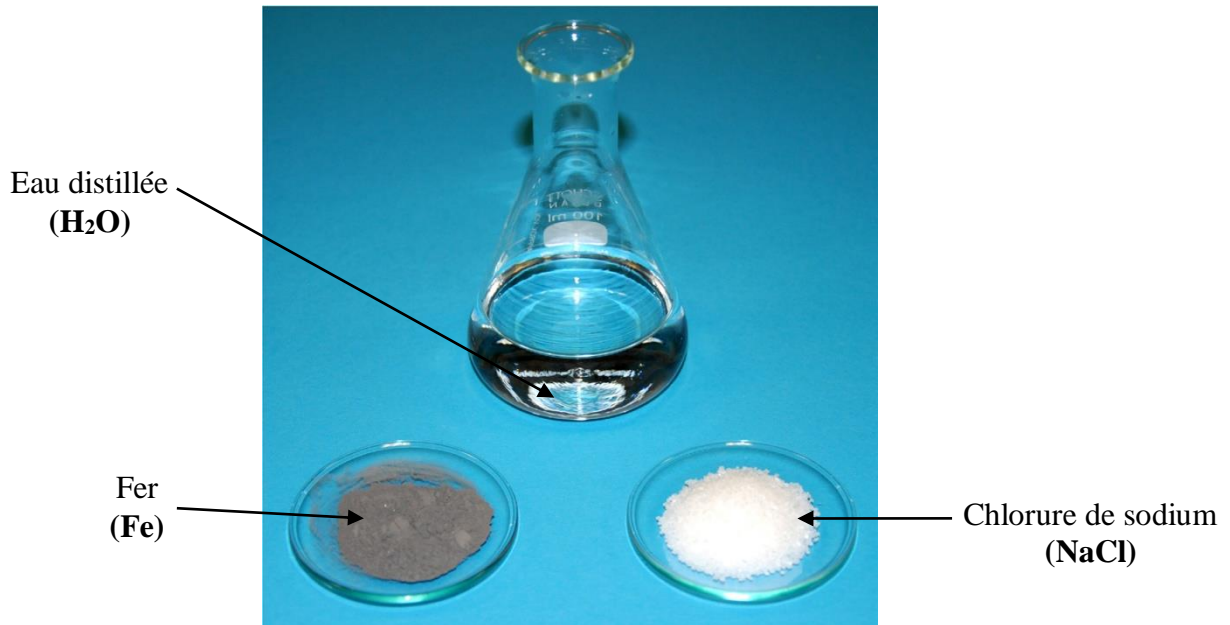
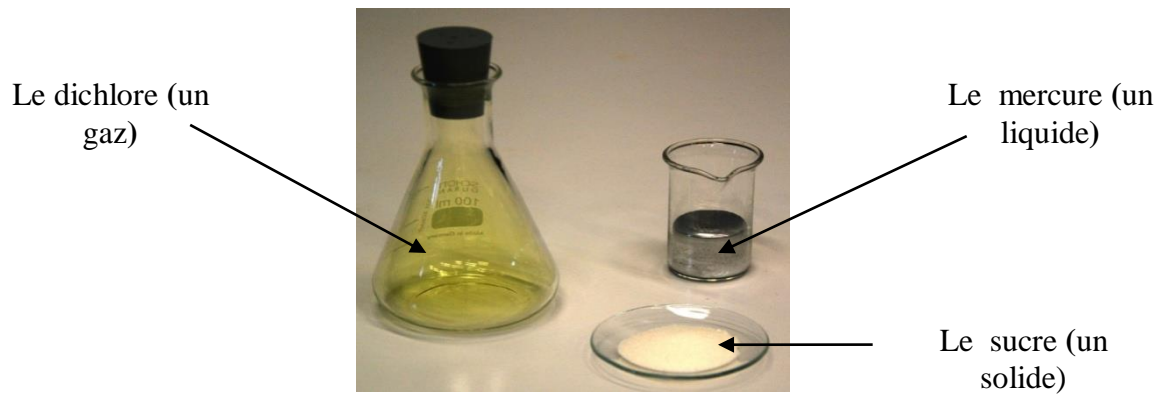


Figure I.2 : Exemples des corps purs

### I.1.2. Les états de la matière

La matière peut se présenter sous trois états différents : les corps peuvent être à l'état solide, liquide ou gazeux (Figure I.3). Un corps pur se trouve toujours dans un de ces 3 états.

- A l'état **solide** on trouve la glace présente dans les glaciers, la banquise et la grêle. On trouve également la neige constituée de minuscules cristaux de glace.
- A l'état **liquide** on trouve les cours d'eau, les mers, les océans, la pluie ainsi que les nuages et le brouillard constitués de minuscules gouttelettes d'eau
- A l'état **gazeux** on trouve la vapeur d'eau présente dans l'air mais invisible à l'œil nu.



**Figure I.3 :** Exemples des corps purs dans différents états

### Remarque

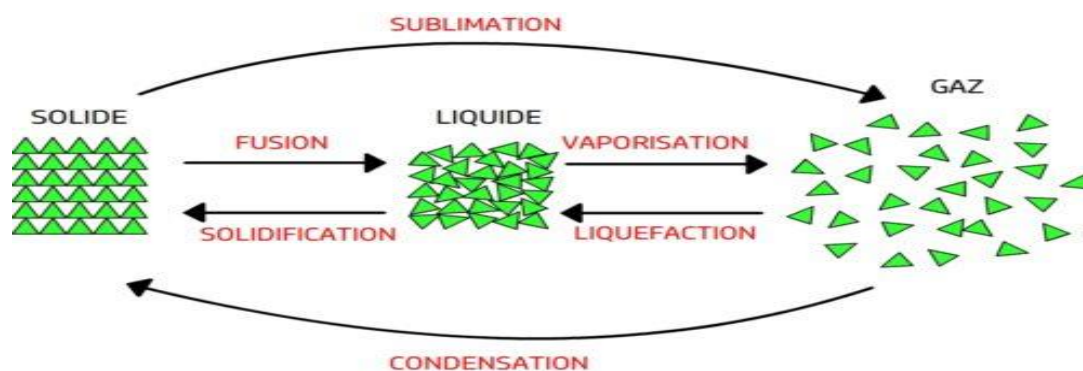
La matière peut présenter, dans des situations particulières, des formes qualifiées d'état, on peut par exemple citer:

- Le plasma
- Le plasma de quarks-gluons (quagma)
- Le gaz de fermions dégénérés
- Le condensat de Bose-Einstein

Nous allons étudier maintenant comment un corps pur peut passer d'un état à l'autre.

### I.1.3. Les changements d'états

Les changements d'états sont des transformations physique de la matière en fonctionne la température et de pression à la pression à la quelle cette matière est soumise. La Figure I.4 c'est un Schéma résumant les différents changements d'état possibles:



**Figure I.4 :** Les différents changements d'état possibles

Voici les définitions correspondantes:

- Fusion : passage de l'état solide à l'état liquide.
- Vaporisation : passage de l'état liquide à l'état gazeux.
- Liquéfaction : passage de l'état gazeux à l'état liquide.
- Solidification : passage de l'état liquide à l'état solide.
- Sublimation : passage de l'état solide à l'état gazeux.
- Condensation : passage de l'état gazeux à l'état condensé (solide ou liquide).

**Remarques :**

- La vaporisation d'un liquide peut se faire soit de manière progressive et naturelle comme par exemple lors d'une exposition au soleil. On dit alors qu'il y a évaporation. Elle peut également s'obtenir par une élévation rapide de température qui provoque l'apparition de bulles de gaz: on parle alors d'ébullition.
- La sublimation et la condensation restent assez rares sur Terre mais elles peuvent se produire dans des conditions extrêmes.
- Le terme condensation peut porter à confusion car il est parfois utilisé aussi pour désigner le passage de l'état gazeux à l'état liquide. On précise alors s'il s'agit de condensation liquide ou de condensation solide.
- On pourrait considérer d'autres changements d'état comme le passage de l'état gazeux à l'état plasmatique

### I.1.3.1. Influence de la température

- Lorsqu'on chauffe de la glace , elle se transforme en eau liquide : c'est la **fusion**.
- Lorsqu'on chauffe de l'eau, elle se transforme en vapeur d'eau : c'est la **vaporisation** ou l'**ébullition**.



Figure I.5 : Exemple de fusion et d'ébullition

- Certains corps purs solides, comme le diiode se comportent différemment lors du chauffage, par exemple si on chauffe un peu de diiode, dans un bécher. Le diiode se sublimera (figure I.6).



Figure I.6 : Sublimation de diiode

- **Inversement :**
  - Lorsqu'on refroidit de la vapeur d'eau, elle redevient liquide : c'est la **condensation**.
  - Lorsqu'on refroidit de l'eau, elle devient solide (glace) : c'est la **solidification**.

### I.1.3.2. Influence de la pression

Dans les bonbonnes à gaz vendues pour le camping se trouve du propane. Lorsqu'on ouvre le robinet, un gaz s'échappe. Par contre, lorsqu'on secoue une telle bonbonne à gaz, on remarque qu'elle contient un liquide. Comment est-ce possible ?

Le gaz dans la bonbonne se trouve sous pression. Ainsi, on peut conclure que l'augmentation de la pression provoque le passage de l'état gazeux à l'état liquide.

## I.2. Mélanges

Jusqu'à présent, nous n'avons considéré que des corps purs. Mais la plupart des substances qu'on trouve sur terre ne sont pas des corps purs. Par exemple, l'eau de mer, qui couvre 70% de la surface terrestre, a un goût salé. Elle est donc constituée d'au moins deux corps purs : l'eau et le sel. Une telle association de différents corps purs est appelée mélange.

### I.2.1. Définition

Un mélange est constitué d'au moins 2 corps purs. Il est donc constitué d'au moins 2 types de particules différents. Il existe différents types de mélanges.

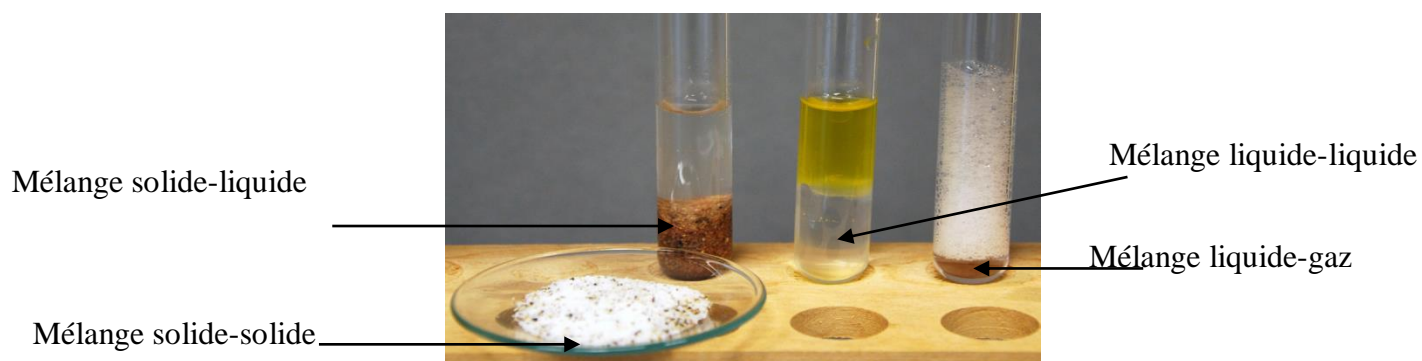
### I.2.2. Mélanges hétérogènes

Pour certains mélanges, on peut voir à l'œil nu qu'il s'agit d'un mélange. Un mélange hétérogène est un mélange où l'on peut distinguer les composants à l'œil nu.

Les mélanges hétérogènes ont des noms spécifiques (Tableau I.1 et la Figure I.7) qui dépendent des états des constituants.

**Tableau I.1 :** Exemple des mélanges

| mélange           | désignation |
|-------------------|-------------|
| liquide - liquide | émulsion    |
| liquide - gaz     | brouillard  |
|                   | mousse      |
| solide - liquide  | suspension  |
| solide - gaz      | Fumée       |
|                   | mousse      |
| solide - solide   | /           |



**Figure I.7 :** Quelques mélanges hétérogènes

### I.2.3. Mélanges homogènes

Un mélange homogène est un mélange où l'on ne peut pas distinguer les composants à l'œil nu. Comme les mélanges hétérogènes, les mélanges homogènes ont des noms spécifiques qui dépendent des états des constituants (Tableau I.2 et Figure I.8).

**Tableau I.2 :** Différents types de mélanges homogènes

| Mélange                  | Désignation               |
|--------------------------|---------------------------|
| <b>solide - solide</b>   | cristaux mixtes, alliages |
| <b>solide - liquide</b>  | Solution                  |
| <b>liquide - liquide</b> | Solution                  |
| <b>liquide - gaz</b>     | Solution                  |
| <b>solide - gaz</b>      | /                         |



**Figure I.8 :** Quelques mélanges homogènes

**Remarque :**

- Dans les solutions, on appelle « **soluté** » le **corps qui est** dissous dans le liquide, qui lui est appelé « **solvant** ».
- Dans une solution, le soluté est subdivisé jusqu'aux particules Individuelles.

### I.3. Les méthodes de séparation d'un mélange

#### I.3.1. Définition

En chimie, un procédé de séparation est une technique ou une technologie permettant de transformer un mélange de substances en deux ou plusieurs composants distincts et ensuite analysables. Les procédés de séparation sont basés sur les différentes propriétés physiques des constituants du mélange, le choix du procédé est en fonction du mélange considéré. Les objectifs de ces opérations peuvent être différents, parmi lesquels:

- La purification des impuretés (exemple : fabrication d'un médicament),
- La concentration d'une solution (exemple : élimination d'une partie de l'eau dans un parfum)
- Le fractionnement du mélange (exemple : distillation de fruits pour obtenir de l'alcool).

#### I.3.2. Principe de la séparation

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

On peut séparer les composés chimiques grâce aux :

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

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



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

# Chapitre II

## *Séparation des constituants d'un mélange hétérogène*

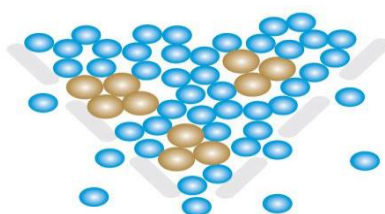
La décantation, la centrifugation et la filtration sont des techniques de **séparation** des **mélanges hétérogènes**. Elles permettent de **séparer** les particules solides du liquide auquel elles sont mélangées. Elle s'obtient en laissant reposer le **mélange**.

## II.1. La filtration

La filtration est un procédé qui permet la séparation des constituants d'une suspension.

### II.1.1. Principe de la filtration

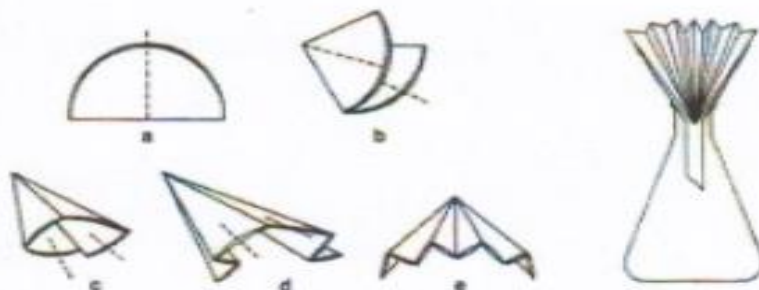
Le **papier filtre** est doté d'une multitude de pores minuscules. Les particules de liquide, capables de se déplacer l'une par rapport à l'autre, peuvent se faufiler à travers ces pores. Les particules de solide, associées l'une à l'autre en réseau, sont trop grandes pour passer à travers les pores du papier filtre.



**Figure II.1** : Schéma d'un filtre

Le papier filtre agit (figure II.1) donc comme un tamis : les particules isolées libres de se déplacer indépendamment peuvent y passer, tandis que les associations de particules sont retenues.

La figure suivante montre les étapes correctes pour expliquer comment utiliser le papier filtre



**Figure II.2** : Préparation d'un filtre plissé et mise en place dans l'entonnoir

**Exemple** : la filtration d'une suspension de sable dans l'eau (Figure II.3.)



**Figure II.3** : schéma de la filtration d'une suspension de sable dans l'eau

### II.1.2. Les objectifs de la filtration

Les objectifs de la filtration sont :

- Récupération d'un solide exemple: précipitation d'un solide dans l'eau
- Purification d'un liquide : exemple: eaux usées
- Récupération et purification exemple: recristallisation d'un solide dans un solvant

### II.1.3. Les matériaux filtrants

On peut citer:

- les tissus filtrants: textiles naturels (coton), toiles métalliques (fer, inox), tissus en matière plastique (nylon, PVC)
- les milieux filtrants pulvérulents: sable, charbon
- les matières poreuses: porcelaine, silice
- produits à base de cellulose:
  - papier filtre
  - Pate de cellulose
  - polymères organiques: membranes filtrantes: disques en polymère de porosité parfaitement définie.

### II.1.4. Inconvénients de la filtration

- Sensibles aux solutions alcalines.
- Pouvoir adsorbant.

## II.1.5. Les techniques de filtration

On distingue:

- ❖ **la filtration par gravité:** le mélange est soumis uniquement à la pression atmosphérique. Le liquide passe à travers le support filtrant (Figure II.4), qui peut être du sable par exemple, tandis que le solide est récupéré sur le support filtrant.

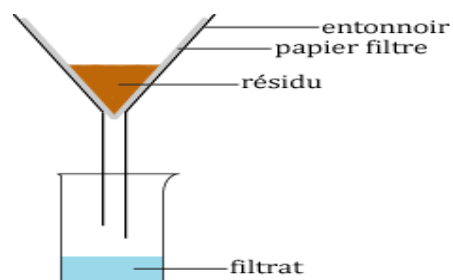


Figure II.4 : Montage de la filtration simple

- ❖ **la filtration par surpression:** la suspension arrive sous pression dans le filtre.
- ❖ **la filtration sous pression réduite:** le mélange est soumis d'un côté du filtre à la pression atmosphérique, et de l'autre côté, où sort le filtrat, à une dépression réalisée grâce à une pompe à vide (Figure II.5).

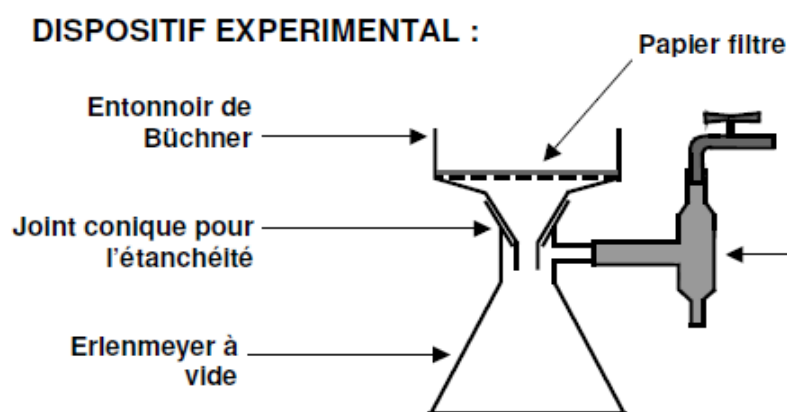


Figure II.5 : Montage de la filtration sous vide

La différence de pression entre l'amont et l'aval a une grosse importance car elle règle la vitesse de filtration. On peut concevoir deux types de filtration:

- **filtration à pression constante:** on règle la différence de pression amont-aval à une valeur constante. L'épaisseur du gâteau augmentant au cours du temps, la vitesse de filtration va donc diminuer.
- **filtration à débit constant :** on augmente au cours du temps la différence de pression amont-aval pour garder un débit constant malgré l'augmentation de perte de charge.

### II.1.6. Applications

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

## II.2. La décantation

C'est un procédé mécanique qui permet de séparer

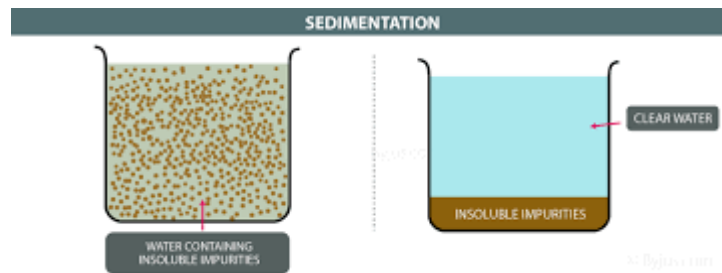
1. Soit une phase solide de matières en suspension dans un liquide de masse volumique moindre (solide - liquide)
2. Soit deux phases liquides non miscibles de densités différentes (liquide -liquide) et de polarité différente

### II.2.1. Décantation solide-liquide (Sédimentation)

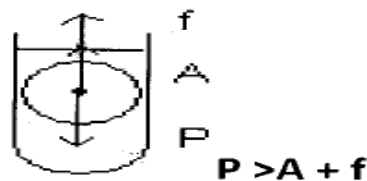
En physique-chimie, la sédimentation (décantation) est l'un des procédés de séparation des mélanges. Il consiste à laisser se sédimenter les particules en suspension dans le liquide pour pouvoir les séparer. C'est un principe utilisé par certaines stations d'épuration de l'eau (bassin de décantation).

### II.2.1.1. Principe de la sédimentation

Lors de la sédimentation (Figure II.6) de particules solides de masse  $m$ , de rayon  $r$  et de masse volumique  $\rho_s$  dans un milieu fluide de masse volumique  $\rho_L$  et de coefficient de viscosité  $\eta$ , à priori au repos, les particules sont soumises à l'action de trois forces (Figure II.7).



**Figure II.6** : schéma du principe de la sédimentation



**Figure II.7**: Forces appliquées à une particule lors de son sédimentation

- **P** : le poids, Force de pesanteur ( $=mg$  ; attraction des particules vers le bas)
- **A** : La poussée d'Archimède(N), fonction de la différence de masse volumique entre la particule et le milieu fluide et dirigée vers le haut,  $A=m'g$  avec  $m'$ = masse du volume de liquide déplacé  $= \rho_L V$  avec :
  - $\rho_L$  = masse volumique du liquide ( $\text{kg/m}^3$ )
  - $V$ =volume de la particule ( $\text{m}^3$ )
  - $g$ = constante gravitationnelle  $= 9,81\text{ms}^{-2}$
- **f** : La forces de frottement exercées sur la particule par le fluide, du fait de sa viscosité, elle est calculée par la loi de Stokes  $f= 6\pi \eta r v_s$  avec  $v_s$  = vitesse de sédimentation.

Lorsque les forces de frottement visqueux équilibrent la résultante du poids et de la poussée d'Archimède, la particule se déplace alors à une vitesse constante appelée vitesse de sédimentation, que l'on peut déterminer dans les deux cas suivants :

- En régime laminaire, loi de Stokes,  $v_s = (2r^2 \cdot (\rho_s - \rho_L) \cdot g) / (9 \cdot \eta)$
- En régime turbulent, loi de Newton,  $v_s = (6 \cdot g \cdot r \cdot (\rho_s - \rho_L) / \rho_L)^{1/2}$

En conséquence, la vitesse de sédimentation augmente avec la différence de masse volumique particule-fluide  $\rho_s - \rho_L$ , l'accélération de la pesanteur  $g$  (ou centrifuge  $\omega^2$ ), le diamètre de la particule (son carré en régime laminaire). La vitesse de sédimentation diminue lorsque la viscosité du milieu augmente, ou le diamètre des particules diminue. Les particules de plus gros diamètre sédimentent plus rapidement que les particules de petit diamètre, ce qui donne lieu à une méthode de classement, mais conduit également à un seuil de coupure d'un décanteur.

Les facteurs clefs de la sédimentation sont la différence de masse volumique entre le solide et le liquide, la taille des particules et la viscosité du fluide. Pour des particules de quelques microns, la vitesse de sédimentation devient trop faible.

On utilise alors des adjuvants de floculation pour agglomérer les particules entre elles et augmenter ainsi leur vitesse limite de chute.

### II.2.2. Décantation liquide-liquide (deux phases liquides non miscibles)

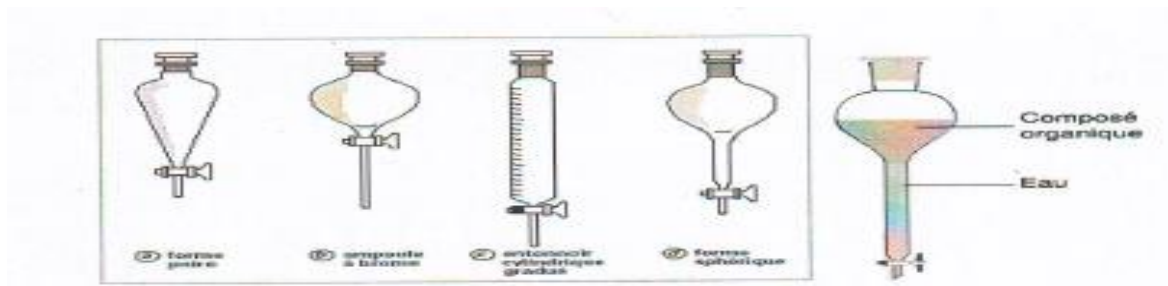
La décantation est un procédé qui permet de séparer des liquides non-miscibles et des masses volumiques différentes (Exemple dans la figure II.8). Le mélange à séparer est introduit dans une ampoule à décanter. Dans l'ampoule, un liquide se superpose à l'autre, et le liquide inférieur peut être récupéré en ouvrant le robinet.



**Figure II.8 :** La décantation d'une émulsion d'eau et d'huile



Les ampoules à décanter sont disponibles à des formes différentes en verre ou en plastique, la figure II.9 démontre quelques formes des Ampoules.



**Figure II.9 :** Les différents types des ampoules à décanter

### II.3. La centrifugation

La centrifugation est une sédimentation accélérée dans laquelle  $g$  (=l'accélération de la pesanteur) est remplacée par l'accélération centrifuge.

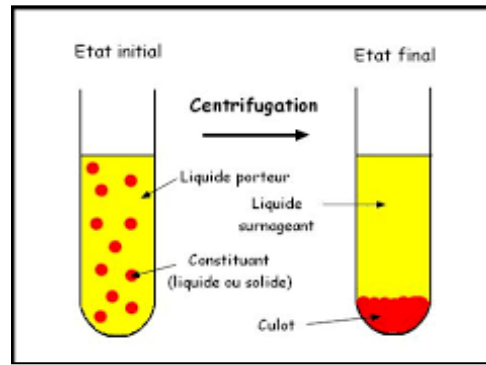
La centrifugation est une opération de séparation mécanique, par action de la force centrifuge, de deux à trois phases entraînées dans un mouvement de rotation.

On peut séparer

- deux phases liquides.
- Une phase solide en suspension dans une phase liquide,
- deux phases liquides contenant une phase solide.
- En biochimie, il s'agit de la séparation de protéines en solution qui ont la capacité de sédimenter dans un champ centrifuge élevé.

#### II.3.1. Principe de la centrifugation

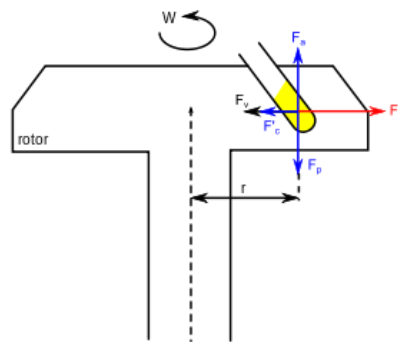
La séparation des composés d'un mélange (figure II.10) est réalisable par décanter, sous l'action de la seule gravitation mais elle nécessite parfois une longue durée pour acquérir de bons résultats et est donc souvent inefficace. Il est donc plus efficace d'utiliser la centrifugation. Au cours de cette opération de séparation.



**Figure II.10 :** Schéma du principe de la centrifugation

### II.3.2. Les équations de la centrifugation

Les composés dans le fluide situés à une distance  $r$  de l'axe de rotation sont soumis à différentes forces (Figure II.11).



**Figure II.11 :** Schéma des différentes forces s'appliquant sur le composé à séparer

- La force de pesanteur descendante  $F_p$
- La poussée d'Archimède ascendante  $F_a$
- Une force de friction  $F_v$
- La force centripète  $F'_c$
- La force centrifuge  $F_c$

La séparation s'opère par l'action de la force centrifuge  $F_c$  sur les composés. Cette force centrifuge, exprimée en newtons, est donnée par la relation  $F_c = m\gamma_c$  avec  $\gamma_c = r\omega^2$  en  $m/s^2$  dont :

- La masse  $m$  du composé à séparer
- La distance  $r$  du tube à l'axe de rotation de la centrifugeuse

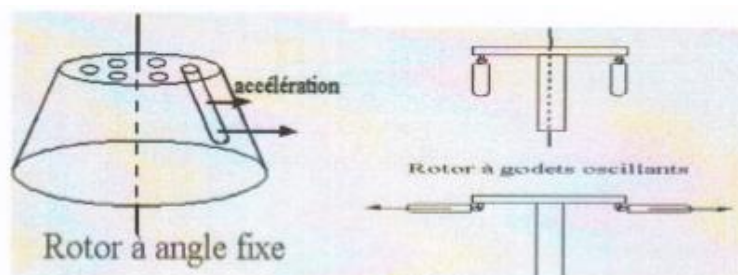
- La vitesse angulaire  $\omega$  exprimée en radians par seconde ou en tour par minute.

Le rapport de la force centrifuge  $F_c$  sur le poids  $F_p$  est appelé **intensité de la pesanteur artificielle** et s'exprime en "g". Les valeurs utilisées en centrifugation sont d'environ 400 à 10 000 g ce qui correspond à des vitesses de rotation de l'ordre 2 000 à 10 000 tr/min suivant le rayon des rotors.

La centrifugation fait appel à la force centrifuge exercée sur les particules incluses dans la solution, afin de ségréguer certaines composantes. Cette séparation s'effectue selon la densité des particules. La force exercée par l'accélération à haute vitesse de la solution à séparer est régie par la loi de Stokes :

$$v_s = \frac{2r^2 g \Delta\rho}{9\eta}$$

Cette loi permet de calculer la vitesse de sédimentation des particules. Dans cette équation, la composante  $v_s$  est la vitesse de sédimentation. Le  $r$  est le rayon de la particule en solution. Le  $\Delta\rho$  est la différence de densité entre la particule et le milieu où la particule est contenue. Le "g" est l'accélération due à la force centrifuge dans la centrifugeuse (Figure II.12). Le  $\eta$  est la viscosité de la solution.



**Figure II.12** : Schéma d'une centrifugeuse

### II.3.3. Appareillage

Plusieurs types de centrifugeuses (Tableau II.1) :

- Centrifugeuses analytiques : c'est l'observation du déplacement des molécules pour avoir l'information sur la constante de sédimentation, sur les formes et masse moléculaire, taille, composition.
- Centrifugeuses Préparative : Exploitation des phénomènes d'enrichissement des zones > ou < du tube pour la Séparation des différents constituants d'un mélange.
- Centrifugeuses analytiques et ou préparatives.

Toute centrifugeuse comprend:

- ❖ Une Chambre de rotation
- ❖ Des Éléments périphériques

**Tableau II.1:** Différents modèles de centrifugeuses

| Types de centrifugeuses                | Accélération S      | Contenance  | Système de réfrigération | Remarques   |
|--|---------------------|---|--------------------------|---|
| <b>Centrifugeuses de table –main</b>   | 1000à2000g<br>3000g | Petits volumes<br>10 ml                           | ±                        | -Modèle simple<br>-Manivelle manuelles              |
| <b>Centrifugeuses au sol</b>           | 20 000g             | Gros volumes<br>4 ou 6<br>bouteilles de<br>250 ml | +                        |   |
| <b>Ultracentrifugeuses</b>             | 300 000g            | Dizaine de<br>tubes de 40                         | +                        | Analyses très<br>pointues                           |
| <b>Ultracentrifugeuses analytiques</b> |                     |   |                          | Analyses la taille et<br>la masse des<br>particules |
| <b>Micro centrifugeuses</b>            | 12-15 000g          | Micro-volumes<br>Micro-tubes de<br>1.5 ml         | ±                        | Biochimie moderne                                   |

### II.3.4. Choix des centrifugeuses

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

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

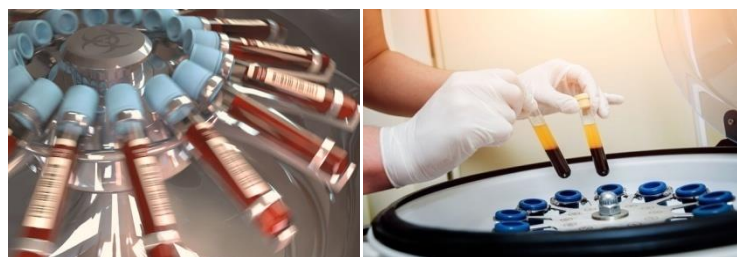
### II.3.5. Applications de la centrifugation

Elles s'appliquent aussi bien aux mélanges homogènes qu'aux mélanges hétérogènes

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

#### *Exemple :*

À l'aide d'une centrifugeuse, on peut séparer les globules rouges du plasma sanguin (Figure II.13).



**Figure II.13 :** La séparation des globules rouges et du plasma sanguin

# Chapitre III

## *Séparation par Rupture de phase et Extraction*

De nombreux mélanges homogènes peuplent notre quotidien : le jus de fruit, le lait, le savon, l'eau de javel ou encore le sang sont des mélanges qui contiennent énormément de composants mais nous ne sommes pas capables de les distinguer lorsque nous les voyons.

Pour séparer les constituants d'un mélange homogène, on peut baser sur les caractéristiques physiques ou chimiques, dans ce chapitre, on va discuter certaines méthodes utilisées pour séparer les composants d'un mélange homogène.

### III.1. Séparation par rupture de phase

**Principe :** Provoque une hétérogénéité dans la phase homogène, Cas d'une phase homogène liquide, la rupture de phase peut être provoquée

- soit en augmentation de la concentration par **élimination du solvant liquide**
- Soit par en diminuant la solubilité  $S$  par **diminution du pouvoir solvant**.

#### Exemple:

- Un mélange solide-liquide: provoque l'apparition d'un solide dans une phase liquide
- Mélange liquide-liquide provoque l'apparition deux phase dans une phase liquide

#### III.1.1. Techniques d'élimination du solvant

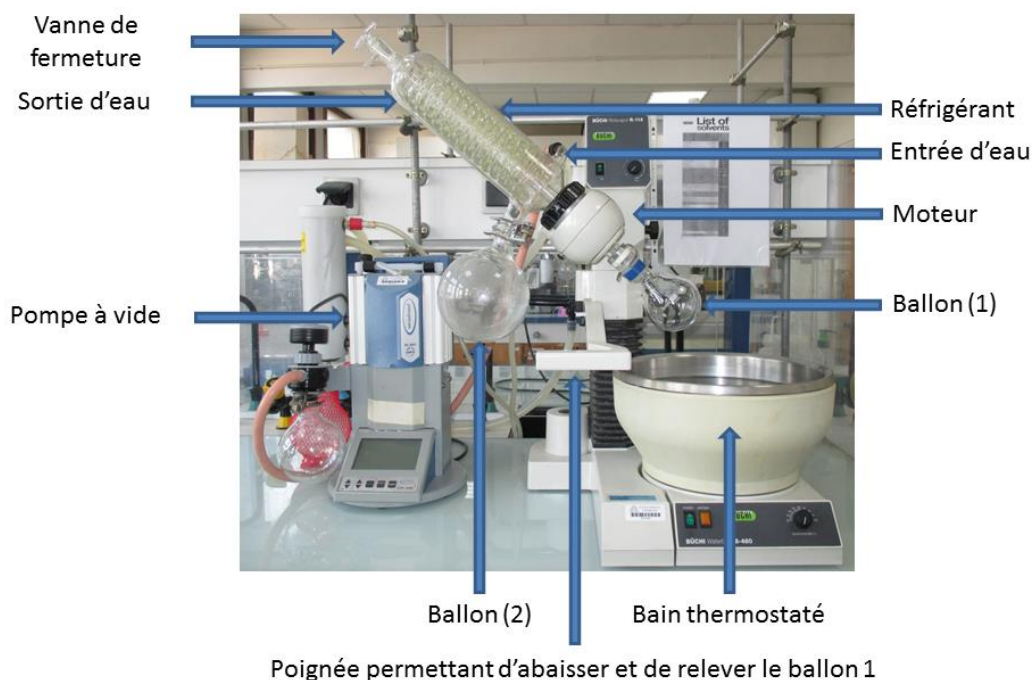
Pour augmenter la concentration de la solution, il faut éliminer le solvant partiellement ou totalement. Pour éliminer un solvant on peut jouer soit sur les facteurs physiques (la pression, la température, ou sur les facteurs chimiques (la solubilité de la substance).

##### III.1.1.1. Elimination du solvant sous pression ambiante

Cette technique nous permet d'éliminer une quantité importante du solvant par ébullition à pression ambiante, le procédé est simple et consiste à chauffer la solution, on l'appelle aussi l'évaporation (voir le chapitre VI), parmi les inconvénients de ce procédé : risque détérioration des produits thermolabile et risque d'intoxication.

### III.1.1.2. Elimination du solvant sous pression réduite

Concentration sous pression réduite on limite l'élévation de température, l'opération est souvent réalisée dans un évaporateur rotatif (**Figure III.1**)



**Figure III.1** : Photo annotée d'un évaporateur rotatif

Il est constitué notamment :

- d'un ballon (1) dans lequel on place le mélange contenant le solvant à évaporer ;
- d'un bain-marie avec contrôle de température ;
- d'un réfrigérant en forme de serpent, permettant aux vapeurs de solvant de se liquéfier ;
- d'un ballon (2) permettant de récupérer le solvant liquide (après liquéfaction des vapeurs) ;
- d'un moteur permettant de mettre en rotation le ballon contenant le mélange à évaporer, afin d'obtenir une évaporation plus régulière.

Il est relié à un système permettant d'abaisser la pression au sein du dispositif (une pompe par exemple).



Le ballon (1) contient le mélange dont on veut évaporer le solvant. Le solvant s'évapore et les vapeurs ainsi formées sont condensées par le réfrigérant dans un récipient différent du ballon (1) : le ballon de récupération (2).

On sait que l'évaporation est terminée :

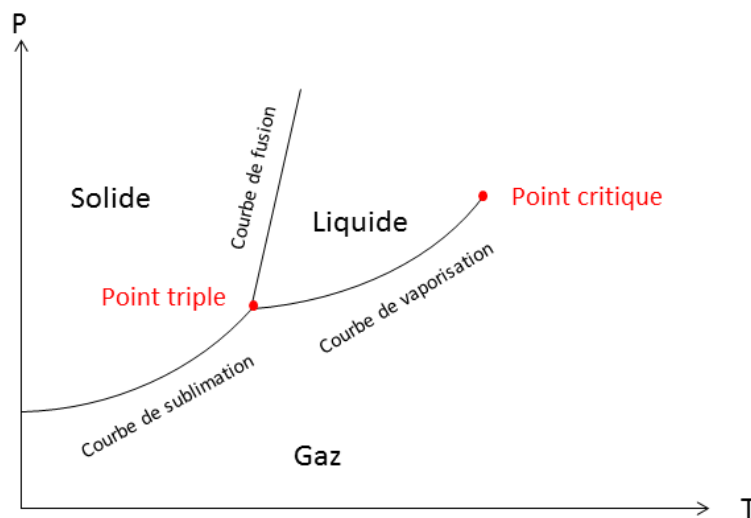
- si le volume de solvant récupéré dans le ballon (2) n'augmente plus ;
- si la masse du contenu du ballon (1) est constante.

Après évaporation du solvant, on récupère :

- soit un solide si le produit solide à température et pression ambiantes ;
- soit une huile si le produit est liquide à température et pression ambiantes.

### ✚ Intérêt de travailler sous pression réduite

- 1) Cette méthode permet de ne chauffer qu'à des températures raisonnables (millier de degrés) grâce au vide créé. On remarque sur le diagramme ci-dessous (Figure III.2) que la température d'ébullition diminue si la pression diminue.



**Figure III.2:** Diagramme Pression-Température du corps pur

- 2) l'évaporateur rotatif permet d'évaporer rapidement un solvant à une température relativement basse.

#### Remarque

Si le solvant est sous un faible volume et très volatil, la tension de vapeur est suffisante pour qu'il s'évapore totalement sans chauffage.

### III.1.1.3. Elimination du solvant par l'utilisation des agents desséchants

On peut parachever l'élimination des traces de solvants dans un dessiccateur contenant des agents desséchants (Tableau III.1.).

**Exemple :**  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$

**Tableau III.1:** Quelques agents desséchants

| <i>Nom</i>                    | <i>formule de l'hydrate prépondérant</i>       | <i>Efficacité</i> | <i>Vitesse</i> | <i>capacité</i> | <i>Domaine d'utilisation</i>                        |
|-------------------------------|--|-------------------|----------------|-----------------|---|
| <i>sulfate de Magnésium</i>   | $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$           | ++                | +++            | +++             | Général (sauf amines)                               |
| <i>Sulfate de sodium</i>      | $\text{NaSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$           | +                 | ++             | +++             | Général   |
| <i>Chlorure de Calcium</i>    | $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$           | +++               | +++            | ++              | Hydrocarbures<br>Halogénures                        |
| <i>Sulfate de Calcium</i>     | $\text{CaSO}_4, 1/2\text{H}_2\text{O}$         | +++               | +++            | +++             | Général   |
| <i>Carbonate de Sodium</i>    | $\text{Na}_2\text{CO}_3, 10\text{H}_2\text{O}$ | ++                | ++             | ++              | Amines,<br>Esters<br>Amides,<br>Cétones,<br>Alcools |
| <i>Carbonate de potassium</i> | $\text{K}_2\text{CO}_3, 1/2\text{H}_2\text{O}$ | ++                | ++             | ++              | Amines,<br>Esters<br>Amides,<br>Cétones,<br>Alcools |

### III.1.2. Rupture de phase par diminution de la solubilité

La **solubilité** est la capacité d'une substance, appelée soluté, à se dissoudre dans une autre substance, appelée solvant, pour former un mélange homogène appelé solution. En thermodynamique, la solubilité massique est une grandeur physique notée  $s$  désignant la concentration massique maximale du soluté dans le solvant, à une température donnée. La solution ainsi obtenue est alors saturée. De même, la solubilité molaire est la concentration molaire maximale du soluté dans le solvant à une température donnée. La solubilité massique s'exprime en g/L, et la solubilité molaire s'exprime en mol/L.

La précipitation peut être considérée comme le phénomène inverse de la dissolution. Pour rappel, la dissolution est l'obtention d'un mélange homogène (une seule phase) à partir d'une espèce chimique (souvent solide) et d'un solvant liquide. Les particules (ions ou molécules)

du soluté se dispersent parmi les molécules du solvant tant que la capacité d'accueil n'est pas excédée c'est à dire tant que la limite de solubilité n'est pas atteinte.

Une précipitation correspond donc à la formation, dans une solution, d'un composé solide (distinct de la phase liquide du solvant) à partir d'une ou plusieurs espèces chimiques initialement dissoutes.

**Exemple:** soit un composé A dissout dans une phase liquide, la phase est homogène si la concentration  $C$  est inférieure à la limite de saturation, si on augmente la concentration au-dessus de la limite de saturation il y a rupture de phase.

Une précipitation a lieu lorsque les concentrations des espèces chimiques dissoutes dans une solution excèdent l'une des valeurs de solubilité. Cette situation peut se présenter:

- suite à une variation de concentration des espèces chimiques dissoute
- suite à une variation de la solubilité elle-même
- en raison de l'introduction de nouvelle espèce chimique en solution

### III.1.2.1. Précipitation par vaporisation

La vaporisation d'une solution provoque une diminution du volume de solvant qui s'accompagne d'une augmentation de la concentration en solutés. Si la concentration dépasse la solubilité des solutés alors ceux-ci précipitent. On peut observer par exemple la précipitation du chlorure de sodium lors de la vaporisation (naturelle ou provoquée) d'une eau salée (Figure III.3), on peut aussi observer la précipitation du sucre (formation de cristaux) lors de la vaporisation d'une eau sucrée etc...



**Figure III.3:** l'évaporation de l'eau salée pour récupérer le sel dissous.

**Attention :** *Il ne faut pas utiliser l'évaporation lorsque le solvant est facilement inflammable ou toxique !*

### III.1.2.2. Précipitation par modification de la température

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

### III.1.2.3. Précipitation par modification du solvant

La solubilité d'une espèce chimique dépend du solvant utilisé et si la composition de ce dernier est changée (en ajoutant un autre liquide miscible avec le premier) alors il peut se produire une diminution de solubilité susceptible de provoquer une précipitation.

### III.1.2.4. Précipitation par ajout d'ion (effet d'ion commun)

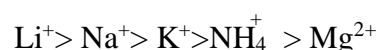
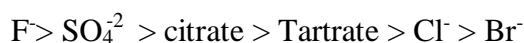
La solubilité d'un cation dépend de l'anion auquel il est combiné (et inversement), si l'on introduit dans une solution ionique un nouvel ion dont la solubilité est très faible avec l'un des ions déjà présent alors il peut se produire une précipitation, Cette technique est également appelée le 'Relargage'.

#### Remarque :

- A peut-être un liquide et le relargage doit être complété par une décantation liquide-liquide.
- A peut-être un solide et le relargage doit être suivi d'une filtration (Exemple: préparation d'un savon).

- **Agents relargants**

Ils doivent être solubles dans le solvant (donc le plus généralement dans l'eau). On peut classer d'après leur pouvoir relargant décroissant les différents anions et cations selon les séries de Hofmeister : à titre d'exemple :



- **Avantages du relargage :**

C'est une méthode de séparation très douce qui ne fait pas intervenir d'élévation de température, et pour cela présente un grand intérêt en biochimie.

**Exemple :**

La solubilité du chlorure de sodium dans l'eau est d'environ 360 g/L, celle du nitrate d'argent est de 35 g/L mais celle du chlorure d'argent est seulement  $1,8 \cdot 10^{-3}$  g/L.

Si l'on ajoute quelques gouttes d'une solution de nitrate d'argent dans une solution de chlorure de sodium alors la concentration massique de  $1,8 \cdot 10^{-3}$  g/L sera rapidement dépassée et le chlorure d'argent précipitera. C'est ce phénomène qui est mis à profit dans les tests de reconnaissance d'ion par précipitation.

## III.2. Séparation par extraction

L'**extraction** est un procédé de séparation, qui consiste à extraire une espèce chimique, c'est-à-dire prélever une ou plusieurs espèces chimiques d'un mélange solide ou liquide.

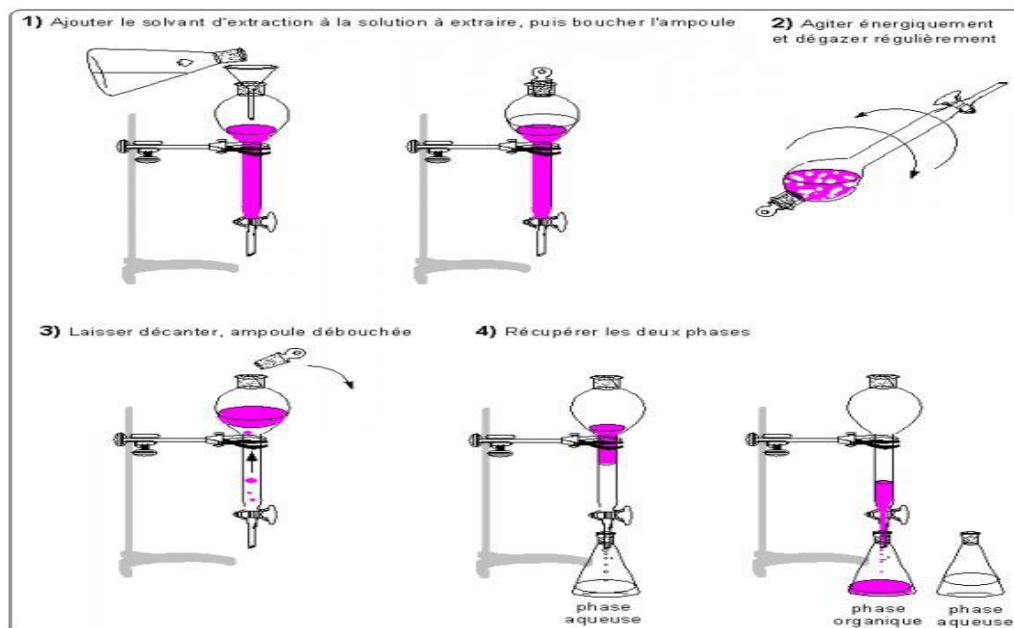
### III.2.1. Principe général

Un moyen d'extraction est utilisé pour extraire sélectivement un ou plusieurs composés d'un mélange initial, sur la base de propriétés chimiques ou physiques. Le moyen d'extraction n'est pas ou peu miscible avec les composants principaux du mélange initial, et le composé à extraire possède plus d'affinité avec le moyen d'extraction qu'avec les composants principaux du mélange initial.

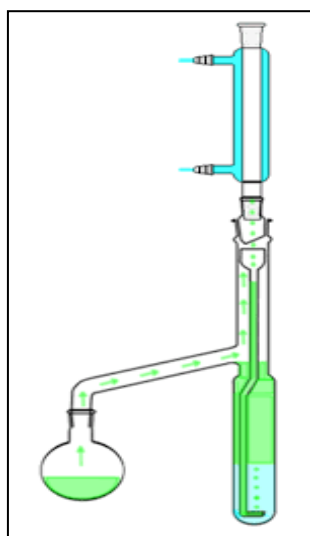
### III.2.2. Extraction liquide-liquide

Cette technique permet d'extraire une substance dissoute dans un solvant (phase d'alimentation), à l'aide d'un autre solvant, appelé phase solvant d'extraction, dans lequel elle est plus soluble. Le solvant initial et le solvant d'extraction ne doivent pas être miscibles.

Pour effectuer une extraction liquide-liquide en laboratoire, on peut utiliser une ampoule à décanter (Figure III.4) ou un extracteur en continu tel que l'extracteur de Kutschner-Streudel (Figure III.5).



**Figure III.4 :** Protocole d'extraction liquide-liquide à l'ampoule à décanter..



**Figure III.5 :** l'extracteur de Kutscher-Streudel.

### III.2.2.1. Propriétés des solvants d'extraction

Les solvants d'extraction doivent :

- Dissoudre le mieux possible le produit à extraire.
  - Etre facilement éliminés après extraction et donc avoir un point d'ébullition bas. Leur point d'ébullition doit être le plus éloigné possible de celui des produits à extraire.
- Pour éviter les problèmes de séparation.

- Etre inertes chimiquement vis-à-vis de la solution à extraire.
- Etre aussi peu toxiques que possible.
- Ils ne doivent pas être miscibles au solvant à extraire. il ne doivent pas former une seule phase

Le tableau (III. 2) regroupe les avantages et les inconvénients des solvants les plus usuels lors des extractions.

**Tableau III.2 :** Avantages et inconvénients de quelques solvants usuels pour les extractions

| Solvant             | T <sub>eb</sub> en °C | Densité | Avantage                      | Inconvénients                                |
|---------------------|-----------------------|---------|-------------------------------|--|
| Acétate d'éthyle    | 77                    | 0.90    | Bon pouvoir de solubilisation | Inflammable, modérément difficile à éliminer |
| Cyclohexane         | 81                    | 0.78    | Peu toxique                   | Facilement inflammable                       |
| Dichloro-1.2-éthane | 83                    | 1.26    | Peu inflammable               | Modérément toxique, Vapeurs irritantes       |
| Dichlorométhane     | 40                    | 1.34    | Facile à éliminer             | Forme des émulsions, nocif                   |
| éther éthylique     | 35                    | 0.71    | Facile à éliminer             | Très inflammable                             |
| Hexane              | 69                    | 0.66    | Facile à éliminer             | Très inflammable                             |
| Pentane             | 36                    | 0.63    | Facile à éliminer             | Très inflammable                             |
| Toluène             | 111                   | 0.87    | Peu toxique                   | Inflammable                                  |
| Trichloroéthylène   | 87                    | 1.46    | Inflammable                   | Modérément toxique                           |

En chimie organique, la phase d'alimentation est généralement aqueuse et le solvant organique. En pétrochimie, les deux phases sont généralement organiques.

Le but est de transporter un produit d'une phase où il est difficilement isolable à une autre phase (solvant d'extraction facilement évaporable) où la séparation est facilitée.

C'est un transfert de matière au travers d'une interface (liquide- liquide ou solide – liquide). Généralement le système comprend une phase d'alimentation contenant initialement le soluté (liquide ou solide) et une phase d'extraction (liquide) destinée à recevoir le soluté. La plupart du temps, la phase à extraire est une solution aqueuse. La phase d'extraction quant à elle, est constituée par un solvant organique à bas point d'ébullition.

**Tableau III.3 :** Tableau de miscibilité des solvants

| Solvant 1                | Acide acétique | Acétone | Acétonitrile | Benzène | <i>n</i> -Butanol | Chloroforme | Cyclohexane | Cyclopentane | Dichloroéthane | Dichlorométhane | Diméthylformamide | Diméthylsulfoxyde | Dioxane | Eau | Ethanol | Acétate d'éthyle | Ether diéthylique | <i>n</i> -Heptane | <i>n</i> -Hexane | Méthanol | Méthyle éthyle cétone | Iso-octane | <i>n</i> -Pentane | 2-Propanol | Di-isopropyle éther | Tétrachloroéthane | Tétrachlorure de carbone | Tétrahydrofuranne | Toluène | Trichloroéthane | Xylène |  |
|--------------------------|----------------|---------|--------------|---------|-------------------|-------------|-------------|--------------|----------------|-----------------|-------------------|-------------------|---------|-----|---------|------------------|-------------------|-------------------|------------------|----------|-----------------------|------------|-------------------|------------|---------------------|-------------------|--------------------------|-------------------|---------|-----------------|--------|--|
| Acide acétique           |                |         |              |         |                   |             |             |              |                |                 |                   |                   |         |     |         |                  |                   |                   |                  |          |                       |            |                   |            |                     |                   |                          |                   |         |                 |        |  |
| Acétone                  |                |         |              |         |                   |             |             |              |                |                 |                   |                   |         |     |         |                  |                   |                   |                  |          |                       |            |                   |            |                     |                   |                          |                   |         |                 |        |  |
| Acétonitrile             |                |         |              |         |                   |             |             |              |                |                 |                   |                   |         |     |         |                  |                   |                   |                  |          |                       |            |                   |            |                     |                   |                          |                   |         |                 |        |  |
| Benzène                  |                |         |              |         |                   |             |             |              |                |                 |                   |                   |         |     |         |                  |                   |                   |                  |          |                       |            |                   |            |                     |                   |                          |                   |         |                 |        |  |
| <i>n</i> -Butanol        |                |         |              |         |                   |             |             |              |                |                 |                   |                   |         |     |         |                  |                   |                   |                  |          |                       |            |                   |            |                     |                   |                          |                   |         |                 |        |  |
| Chloroforme              |                |         |              |         |                   |             |             |              |                |                 |                   |                   |         |     |         |                  |                   |                   |                  |          |                       |            |                   |            |                     |                   |                          |                   |         |                 |        |  |
| Cyclohexane              |                |         |              |         |                   |             |             |              |                |                 |                   |                   |         |     |         |                  |                   |                   |                  |          |                       |            |                   |            |                     |                   |                          |                   |         |                 |        |  |
| Cyclopentane             |                |         |              |         |                   |             |             |              |                |                 |                   |                   |         |     |         |                  |                   |                   |                  |          |                       |            |                   |            |                     |                   |                          |                   |         |                 |        |  |
| Dichloroéthane           |                |         |              |         |                   |             |             |              |                |                 |                   |                   |         |     |         |                  |                   |                   |                  |          |                       |            |                   |            |                     |                   |                          |                   |         |                 |        |  |
| Dichlorométhane          |                |         |              |         |                   |             |             |              |                |                 |                   |                   |         |     |         |                  |                   |                   |                  |          |                       |            |                   |            |                     |                   |                          |                   |         |                 |        |  |
| Diméthylformamide        |                |         |              |         |                   |             |             |              |                |                 |                   |                   |         |     |         |                  |                   |                   |                  |          |                       |            |                   |            |                     |                   |                          |                   |         |                 |        |  |
| Diméthylsulfoxyde        |                |         |              |         |                   |             |             |              |                |                 |                   |                   |         |     |         |                  |                   |                   |                  |          |                       |            |                   |            |                     |                   |                          |                   |         |                 |        |  |
| Dioxane                  |                |         |              |         |                   |             |             |              |                |                 |                   |                   |         |     |         |                  |                   |                   |                  |          |                       |            |                   |            |                     |                   |                          |                   |         |                 |        |  |
| Eau                      |                |         |              |         |                   |             |             |              |                |                 |                   |                   |         |     |         |                  |                   |                   |                  |          |                       |            |                   |            |                     |                   |                          |                   |         |                 |        |  |
| Ethanol                  |                |         |              |         |                   |             |             |              |                |                 |                   |                   |         |     |         |                  |                   |                   |                  |          |                       |            |                   |            |                     |                   |                          |                   |         |                 |        |  |
| Acétate d'éthyle         |                |         |              |         |                   |             |             |              |                |                 |                   |                   |         |     |         |                  |                   |                   |                  |          |                       |            |                   |            |                     |                   |                          |                   |         |                 |        |  |
| Ether diéthylique        |                |         |              |         |                   |             |             |              |                |                 |                   |                   |         |     |         |                  |                   |                   |                  |          |                       |            |                   |            |                     |                   |                          |                   |         |                 |        |  |
| <i>n</i> -Heptane        |                |         |              |         |                   |             |             |              |                |                 |                   |                   |         |     |         |                  |                   |                   |                  |          |                       |            |                   |            |                     |                   |                          |                   |         |                 |        |  |
| <i>n</i> -Hexane         |                |         |              |         |                   |             |             |              |                |                 |                   |                   |         |     |         |                  |                   |                   |                  |          |                       |            |                   |            |                     |                   |                          |                   |         |                 |        |  |
| Méthanol                 |                |         |              |         |                   |             |             |              |                |                 |                   |                   |         |     |         |                  |                   |                   |                  |          |                       |            |                   |            |                     |                   |                          |                   |         |                 |        |  |
| Méthyle éthyle cétone    |                |         |              |         |                   |             |             |              |                |                 |                   |                   |         |     |         |                  |                   |                   |                  |          |                       |            |                   |            |                     |                   |                          |                   |         |                 |        |  |
| Iso-octane               |                |         |              |         |                   |             |             |              |                |                 |                   |                   |         |     |         |                  |                   |                   |                  |          |                       |            |                   |            |                     |                   |                          |                   |         |                 |        |  |
| <i>n</i> -Pentane        |                |         |              |         |                   |             |             |              |                |                 |                   |                   |         |     |         |                  |                   |                   |                  |          |                       |            |                   |            |                     |                   |                          |                   |         |                 |        |  |
| 2-Propanol               |                |         |              |         |                   |             |             |              |                |                 |                   |                   |         |     |         |                  |                   |                   |                  |          |                       |            |                   |            |                     |                   |                          |                   |         |                 |        |  |
| Di-isopropyle éther      |                |         |              |         |                   |             |             |              |                |                 |                   |                   |         |     |         |                  |                   |                   |                  |          |                       |            |                   |            |                     |                   |                          |                   |         |                 |        |  |
| Tétrachloroéthane        |                |         |              |         |                   |             |             |              |                |                 |                   |                   |         |     |         |                  |                   |                   |                  |          |                       |            |                   |            |                     |                   |                          |                   |         |                 |        |  |
| Tétrachlorure de carbone |                |         |              |         |                   |             |             |              |                |                 |                   |                   |         |     |         |                  |                   |                   |                  |          |                       |            |                   |            |                     |                   |                          |                   |         |                 |        |  |
| Tétrahydrofuranne        |                |         |              |         |                   |             |             |              |                |                 |                   |                   |         |     |         |                  |                   |                   |                  |          |                       |            |                   |            |                     |                   |                          |                   |         |                 |        |  |
| Toluène                  |                |         |              |         |                   |             |             |              |                |                 |                   |                   |         |     |         |                  |                   |                   |                  |          |                       |            |                   |            |                     |                   |                          |                   |         |                 |        |  |
| Trichloroéthane          |                |         |              |         |                   |             |             |              |                |                 |                   |                   |         |     |         |                  |                   |                   |                  |          |                       |            |                   |            |                     |                   |                          |                   |         |                 |        |  |
| Xylène                   |                |         |              |         |                   |             |             |              |                |                 |                   |                   |         |     |         |                  |                   |                   |                  |          |                       |            |                   |            |                     |                   |                          |                   |         |                 |        |  |

### III.2.2.2. Coefficient de partage

L'opération d'extraction liquide-liquide exploite la différence d'affinité d'un soluté vis-à-vis des deux phases en présence. À l'équilibre, les concentrations du soluté dans les deux phases sont telles que le coefficient de partage  $K_p$  soit égal au rapport de l'activité chimique du soluté dans les deux phases :

$$K_p = \frac{a_B}{a_A}$$

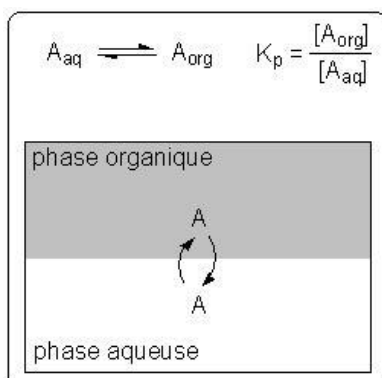
Où A et B sont les deux phases considérées.

Si les deux solutions sont suffisamment diluées, on peut considérer que :  $K_p = \frac{a_B}{a_A} = \frac{C_B}{C_A}$

Où  $C_B$  la concentration de la substance à extraire dans la phase d'alimentation, et  $C_A$  la concentration de la substance dans le solvant d'extraction,



Ce coefficient de partage est une constante d'équilibre (Figure III.6) qui, pour un soluté et des solvants donnés, ne dépend que de la température et éventuellement de la pression.



**Figure III.6 :** Équilibre de partage d'un soluté A entre deux phases liquides non-miscibles (aqueuse et organique)

### III.2.2.3. Rendement d'extraction

On peut déterminer le rendement (R) expérimentalement ou théoriquement :

#### III.2.2.3.1 Détermination expérimentale

La méthode la plus simple et la plus précise de calculer le rendement d'une extraction chimique consiste à doser soit la quantité d'espèce passée dans la phase organique, soit la quantité d'espèce restant dans la phase aqueuse, connaissant la quantité totale d'espèce mise en jeu :

$$R = \frac{n_{org}}{n_{totale}} \quad \text{où} \quad R = \frac{n_{totale} - n_{aq}}{n_{totale}}$$

Où :

- R : rendement de l'extraction
- $n_{org}$  : le nombre de mole de la substance dans la phase organique
- $n_{aq}$  : le nombre de mole de la substance dans la phase aqueuse
- $n_{totale} = n_0$  : le nombre de mole de la substance total ou initial

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

### III.2.2.3.2. Détermination théorique

Le rendement  $R$  d'une extraction est la quantité de matière de A récupérée dans la phase organique (notée B) rapportée à la quantité de matière  $n_0$  de A située initialement en phase aqueuse (notée A). À l'équilibre, on récupère  $n_{org} = [A]_{org} \cdot V_{org} = C_B \cdot V_B$  moles de A dans la phase organique il en reste  $n_{aq} = [A]_{aq} \cdot V_{aq} = C_A \cdot V_A$  en phase aqueuse.

Le rendement est donc :

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

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

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

**Donc :**

$$\frac{n_{aq}}{n_{org}} = \frac{C_A \cdot V_A}{C_B \cdot V_B} = \frac{1}{K_P} \frac{V_A}{V_B}$$

$$\frac{n_{aq}}{n_{org}} = \frac{1}{K_P} \frac{V_{aq}}{V_{org}}$$

Ainsi :

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

Nous constatons que le rendement de l'extraction sera d'autant meilleur que :

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

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

Ceci dit, on obtient déjà de bons rendements en prenant  $V_{org}$  du même ordre que  $V_{aq}$ . Il est donc inutile de prendre une quantité trop élevée de solvant d'extraction, pour plusieurs raisons :

- coût du solvant lorsque ce n'est pas l'eau ;
- nécessité de l'éliminer par la suite pour récupérer A ;
- volume limité de l'ampoule à décanter ;
- risque d'extraire également des composés B à faible constante de partage  $K_P$  que l'on voulait laisser dans la phase initiale.

### III.2.2.4. Optimisation du rendement R

On peut montrer que pour un volume donné de solvant d'extraction, il est plus efficace de procéder en plusieurs extractions avec des fractions de ce volume qu'en une seule fois.

On peut alors se poser la question suivante : pour un volume donné de solvant d'extraction, ici  $V_{org}$ , est-il plus efficace d'extraire en une fois avec  $V_{org}$  ou bien de répéter l'opération d'extraction  $n$  fois avec le volume  $V_{org}/n$ , en rassemblant ensuite les phases aqueuses ?

Pour répondre à cette question, on calcule le rendement d'extraction consécutif à  $n$  extractions. Si on note  $\alpha$  le rendement d'une seule extraction.

- Effectuons une première extraction :

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

- Initialement, on a une quantité  $n_0$  de A à extraire.
  - L'extraction n°1 extrait  $\alpha n_0$  et il reste  $n_1 = (1 - \alpha) n_0$  de A dans la phase aqueuse
  - L'extraction n°2 extrait  $\alpha n_1$  et il reste  $n_2 = (1 - \alpha) n_1 = (1 - \alpha)^2 n_0$ .
  - Après la  **$n$ -ième extraction** : il reste donc dans la phase initiale  $= (1 - \alpha)^n n_0$  moles de A.
  - Le reste se retrouve dans les phases organiques que l'on rassemble pour retrouver le volume  $V_{org}$  contenant  $n_0 - (1 - \alpha)^n n_0$  moles de A.
- D'où le rendement global :

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

(Rappel :  $\alpha$  dépend de  $n$ )

On peut démontrer que  $R$  croît avec  $n$ , c'est à dire **qu'on a toujours intérêt à extraire plusieurs fois avec un petit volume qu'une fois avec un grand volume. En pratique, les opérations d'extractions sont souvent réalisées deux ou trois fois.**

### III.2.2.5. Relation entre la masse restante et le nombre des extractions

La distribution d'un composé  $x$  à extraire entre deux solvants non miscibles est déterminée par le coefficient de partage  $K_p$  entre les concentrations des deux phases.

Soit :

$V_A$  : volume de solvant **A** d'alimentation.

$V_B$  : volume de solvant **B** d'extraction

$m_0$  : masse initiale du composé  $x$  dans le solvant **A**

$m_{A1}$  : masse restante du composé  $x$  dans le solvant **A** après une extraction

$m_{An}$  : masse restante du composé  $x$  dans le solvant **A** après  $n$  extraction

$m_B$  : masse du composé  $x$  extraite par le solvant **B**,

$C_A$  et  $C_B$  : concentrations du produit donné à l'équilibre, à température constante dans le solvant **A** et le solvant **B**.

On a :  $m_B = m_0 - m_{A1}$

$$K_p = \frac{C_B}{C_A}$$

$$\Rightarrow K_p = \frac{C_B}{C_A} = \frac{m_B}{V_B} \cdot \frac{V_A}{m_{A1}} = \frac{m_B \cdot V_A}{m_{A1} \cdot V_B}$$

$$\Rightarrow K_p = \frac{(m_0 - m_{A1}) \cdot V_A}{m_{A1} \cdot V_B} = \frac{V_A}{V_B} \cdot \left[ \frac{m_0}{m_{A1}} - 1 \right]$$

Soit à la première extraction :

$$m_{A1} = \frac{m_0 \cdot V_A}{K_p \cdot V_B + V_A}$$

Pour la deuxième extraction :

$$m_{A2} = \frac{m_{A1} \cdot V_A}{K_p \cdot V_B + V_A} = \frac{m_0 \cdot V_A}{K_p \cdot V_B + V_A} \cdot \frac{V_A}{K_p \cdot V_B + V_A} = m_0 \cdot \left[ \frac{V_A}{K_p \cdot V_B + V_A} \right]^2$$

**A la nième extraction :**

$$m_{An} = m_0 \left[ \frac{V_A}{K_p \cdot V_B + V_A} \right]^n$$

**Exemple :**

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

Comparons:

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

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

- Cas N°2 :  $V_B = 100$  mL, on effectue 2 extractions

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

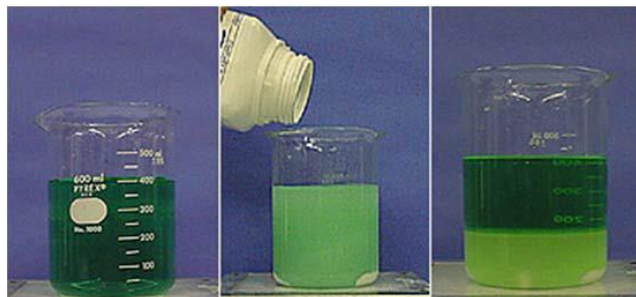
Dans les deux cas, le volume total de solvant d'extraction est identique. Mais comme on peut le voir, la quantité de produit restant à extraire est près de deux fois plus faible dans le premier cas.

**En conclusion, il vaut mieux faire plusieurs extractions avec faibles volumes qu'une seule avec un grand volume.**

### III.2.2.6. Comment améliorer l'extraction pratiquement

En pratique, le coefficient de partage du composé à extraire est rarement connu dans les solvants utilisés. Il est conseillé de faire des extractions avec une quantité de solvant organique égale à celle de la phase aqueuse. Pour savoir le nombre d'extractions à effectuer, le suivi sur plaque chromatographique sur couche mince (CCM) est le moyen le plus simple pour contrôler qu'il n'y ait plus de produit en phase aqueuse.

On peut modifier le coefficient de partage du produit en ajoutant un peu de saumure (solution aqueuse saturée en NaCl) dans la phase aqueuse. On appelle ce phénomène le relavage « salting-out » (Figure III.7).



**Figure III.7 :** Exemple de l'effet d'un agent relagant sur la séparation de deux phases

### III.2.2.7. Problèmes rencontrés

#### III.2.2.7.1. Emulsions

Il peut arriver que lors de la séparation, l'interface ne soit pas nette ou même que l'ensemble du mélange ne forme plus qu'une seule phase et que l'on soit en présence d'une émulsion stable. Cela peut arriver avec beaucoup de solvant, mais cela est plus fréquent lorsqu'on utilise des solvants tels que la dichlorométhane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) ou le chloroforme ( $\text{CHCl}_3$ ) ou encore en présence d'agents tensioactifs.

Il existe diverses astuces pour briser une émulsion.

- L'attente, s'il n'y a pas de changement au bout de quelques minutes, il faut changer de méthode
- On peut essayer de filtrer l'émulsion sur laine de verre ou sur papier filtre, l'émulsion se brise généralement.
- On obtient le même résultat avec des agents chimiques tels que l'addition d'un sel inorganique (généralement du chlorure de sodium ( $\text{NaCl}$ ), par modification de la densité relative des deux phases).
- La centrifugation peut également aider pour casser une émulsion trop importante ou trop stable.
- Les ultra-sons ou l'ajout de quelques gouttes de solvants polaire (méthanol, éthanol, acétone) contribuent à rétablir l'équilibre entre les deux phases.

#### III.2.2.7.2. Produits d'interface

Les produits d'interface (aspect filamenteux, globulaire.....) peuvent être éliminés par simple rotation de l'ampoule à décanter. Sinon, n les prélève régulièrement dans la phase organique et l'on les éliminer seulement à la dernière extraction dans la phase aqueuse.

##### **Remarque :**

Dans le laboratoire lors de la dernière étape de lavage des phases organiques contenant des produits d'interface, il est important de bien laver l'erlenmeyer ayant recueilli les phases organiques. Avec du solvant, de l'eau et de tout verser dans l'ampoule à décanter. La phase organique lavée, est alors recueillie à l'aide d'un autre erlenmeyer propre.

### III.2.3. Extraction solide-liquide

#### III.2.3.1.Principe

L'extraction solide-liquide consiste à faire passer une substance d'un solide vers un solvant dans lequel elle est soluble et dont elle sera facilement isolable.

Les domaines d'application de l'opération unitaire sont par ex. l'obtention d'huile de fruits oléagineux ou le lavage de minerais.

Le rendement massique (R) d'extraction correspond à :

$$R = 100x (\text{masse d'extrait/masse de matière solide mise en œuvre})$$

L'extraction solide liquide est un phénomène lent et bien que l'extraction discontinue existe (macération), on emploie plus généralement des procédés d'extraction continus. La pulvérisation du solide permet d'augmenter la surface d'échange et par conséquent la vitesse de transfert.

#### III.2.3.2. Extraction discontinue (Macération)

Elle met en jeu la **macération**, qui consiste à laisser tremper le solide dans un solvant à température ambiante, à chaud ou à ébullition pour extraire les constituants solides.

Après filtration, on peut répéter l'opération sur le résidu avec une nouvelle portion de solvant. Cette méthode est rapide mais pas toujours très efficace.

La dissolution est toujours plus rapide lorsque la substance solide est dispersée dans le solvant sous forme divisée (végétaux broyés, poudre etc) et elle peut aussi être accélérée en maintenant une agitation.

##### III.2.3.2.1. Avantages de la macération

- La macération est une extraction à froid et par conséquent elle limite la libération (et la perte) d'espèces chimiques volatiles dans l'air. Elle permet aussi d'éviter l'altération d'espèces chimiques organiques fragiles qui peuvent à température plus élevée réagir et se dégrader (par réaction avec d'autres espèces du milieu chimique, par hydrolyse, oxydation au contact de l'air etc).

- La macération ne nécessite pas de dispositif de chauffage, elle est donc plus simple et moins coûteuse.

### III.2.3.2. Inconvénients de la macération

- La macération est souvent longue (plusieurs heures voire plusieurs jours)
- En raison du temps qu'elle prend il y a risque de prolifération bactérienne
- A froid la solubilité est moins bonne

### III.2.3.3. Extraction continue

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

- **Percolation** : elle consiste à faire passer lentement un solvant à travers une couche de substance finement pulvérisée, habituellement contenue dans une cartouche de papier poreux et épais ou une pochette de papier filtre. Pour que la durée de contact entre le solvant et l'échantillon soit assez longue, on utilise par exemple l'extracteur de **Soxhlet**. La figure III.8 représente quelques montages utilisant dans l'extraction par percolation .

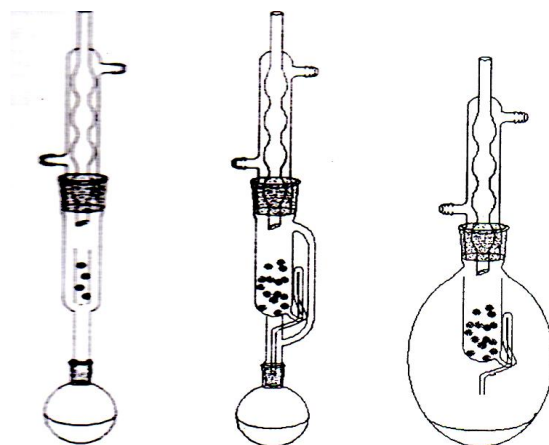


Figure 4 : Montage A Montage B Montage C  
Montage A : montage simple d'extracteur solide - liquide.  
Montage B : extracteur de Soxhlet. Le soluté est mis à l'intérieur avec du papier poreux. Il faut que le composé résiste à la chaleur, car le montage est souvent porté au reflux.  
Montage C : extracteur de Kumagawa.

Figure III.8 : Montages de l'extraction solide liquide

- Entraînement à la vapeur et hydrodistillation: ce sont deux techniques (Figure III.9 et Figure III.10) basées sur la distillation d'un mélange hétérogène eau-composé



organique. Elles sont mises en oeuvre pour l'isolement des huiles essentielles des plantes ou d'un composé organique situé dans un milieu hétérogène.

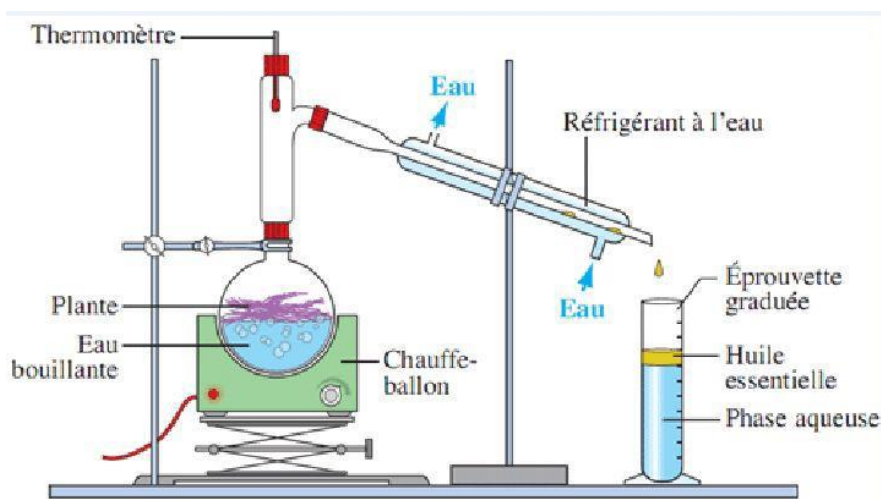


Figure III.9 : Montage de l'hydrodistillation

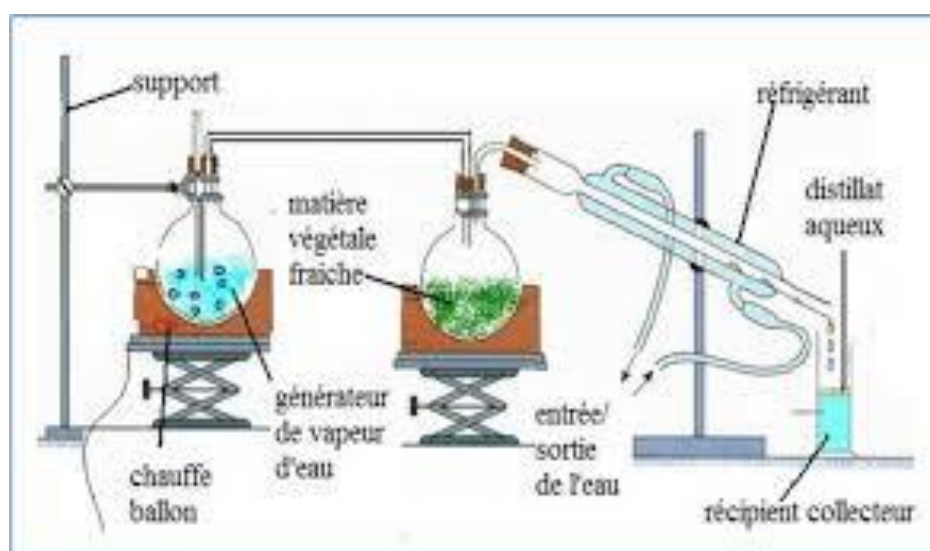


Figure III.10 : Montage entraînement à la vapeur d'eau

### III.2.4. Récupération du soluté

Deux étapes sont essentielles pour la récupération du soluté :

1. en premier lieu, il faut laver la phase organique, afin de revenir à un milieu neutre.
2. en second lieu, il faut sécher le soluté obtenu. il peut alors être concentré par évaporation du solvant d'extraction.

### III.2.4.1. Lavage de la phase organique

Le lavage de la phase organique permet de neutraliser la solution d'extraction.

- Si le pH est acide, un lavage par une solution de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), l'hydrogencarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ ) ou de soude diluée ( $\text{NaOH}$ ) est nécessaire.
- Si le pH est basique, on effectue un lavage par une solution d'acide chlorhydrique ou sulfurique diluée ( $\text{HCl}$  ou  $\text{H}_2\text{SO}_4$ )

### III.2.4.2. Séchage de la phase organique

Il est nécessaire d'éliminer l'eau restant diluée dans la phase organique et donc de sécher celle-ci, ceci est généralement effectué grâce à des minéraux possédant une forte affinité pour l'eau, l'action de ces déshydratants provient souvent de la formation de différents hydrates par capture des molécules d'eau dans le solvant. Le déshydratant doit présenter les qualités suivantes :

- Il ne doit pas donner de réaction chimique avec le ou les composés organiques dissous dans le solvant,
- L'action déshydratante doit être rapide et efficace,
- Sa solubilité dans le solvant organique doit être négligeable,
- Son prix doit être bas,
- Il ne doit pas avoir d'effet catalytique en favorisant des réactions telles que la polymérisation, la condensation ou l'oxydation.

### III.2.4.3. Evaporation du solvant d'extraction

L'opération d'évaporation est généralement réalisée au rotavapor, mais on peut aussi concentrer le solvant dans un montage à distiller classique en ayant préalablement séché la phase d'extraction (phase organique) sur un agent desséchant (sauf si le produit n'est pas stable à haute température et à l'oxygène).

# Chapitre IV

## *Séparation par changement d'état*

Un changement d'état est une transition de phase lors du passage d'un état de la matière à un autre état. Les trois principaux états de la matière sont : solide, liquide et gazeux, mais il existe plusieurs autres états moins courants : plasma, fluide supercritique, mésophase. Le changement d'état d'un corps pur est provoqué par une modification de sa pression, de sa température et/ou de son volume. Il est possible de séparer les différents constituants d'un mélange homogènes par l'utilisation d'une méthode repose sur le changement d'état de l'un des constituants par exemple: la vaporisation (voir le chapitre III), la liquéfaction, la distillation, la cristallisation, la lyophilisation....

Dans ce chapitre nous aborderons deux techniques : la distillation et la lyophilisation.

## IV.1. La distillation

### IV.1.1. Principe de la distillation

La distillation est une technique de séparation de liquides dans un mélange homogène. Les liquides sont vaporisés les uns à la suite des autres par ordre de température d'ébullition croissante. Ils sont récupérés dans des récepteurs distincts.

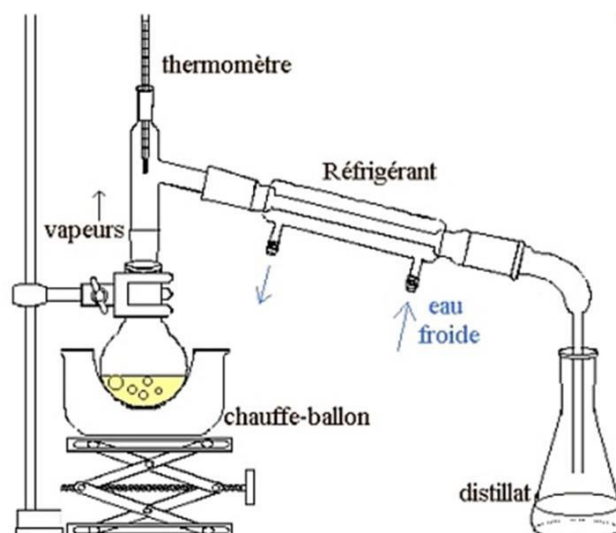
La distillation permet de récupérer l'eau présente dans le mélange. Elle repose sur deux changements d'état inverses : la vaporisation et la liquéfaction. La vaporisation de l'eau permet de séparer l'eau, sous forme de vapeur, du reste du mélange. L'eau est ensuite récupérée sous la forme liquide par liquéfaction au contact d'une surface froide. Le liquide récupéré après distillation est appelé un **distillat**.

### IV.1.2. Distillation simple (ou élémentaire)

L'appareil est monté sans colonne. Le distillat est le produit d'une seule séquence vaporisation - condensation.

Par distillation simple on élimine un solvant volatil dans lequel est dissous un solide ou un liquide peu volatil.

Le montage (Figure IV.1) se fait en partant du support élévateur puis du ballon de réaction et en déposant successivement la tête de distillation, le réfrigérant, l'allonge puis le récipient.

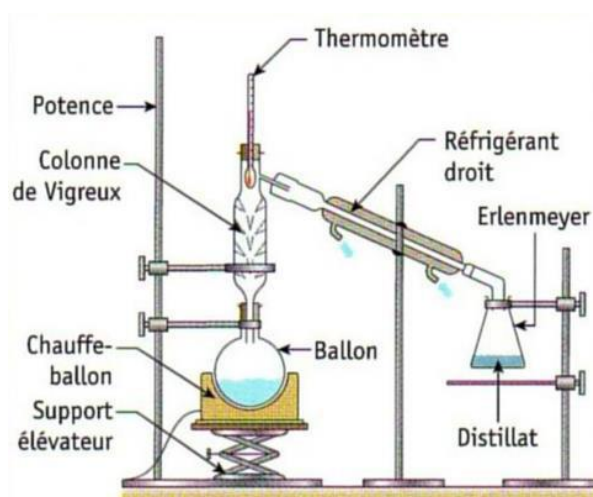


**Figure IV.1 :** Montage de distillation simple

### IV.1.3. Distillation fractionnée (ou rectification)

L'appareil (figure VI.2) est monté avec une colonne à distiller (colonne de Vigreux). La rectification permet :

- La purification d'un composé
- L'isolement des constituants d'un mélange
- Le déplacement d'un équilibre par élimination d'un produit de la réaction.



**Figure IV.2:** Montage de distillation fractionnée

### IV.1.4. Distillation sous pression réduite

En abaissant la pression, on diminue la température d'ébullition d'un liquide.

La réalisation d'une distillation fractionnée sous pression réduite (figure IV.3) est plus complexe qu'une distillation sous pression atmosphérique. Elle présente néanmoins plusieurs avantages :

- Distiller des composés dont le point d'ébullition sous pression atmosphérique est supérieur à 180 °C.
- Distiller des produits qui se dégradent à la chaleur ou qui s'oxydent à l'air.

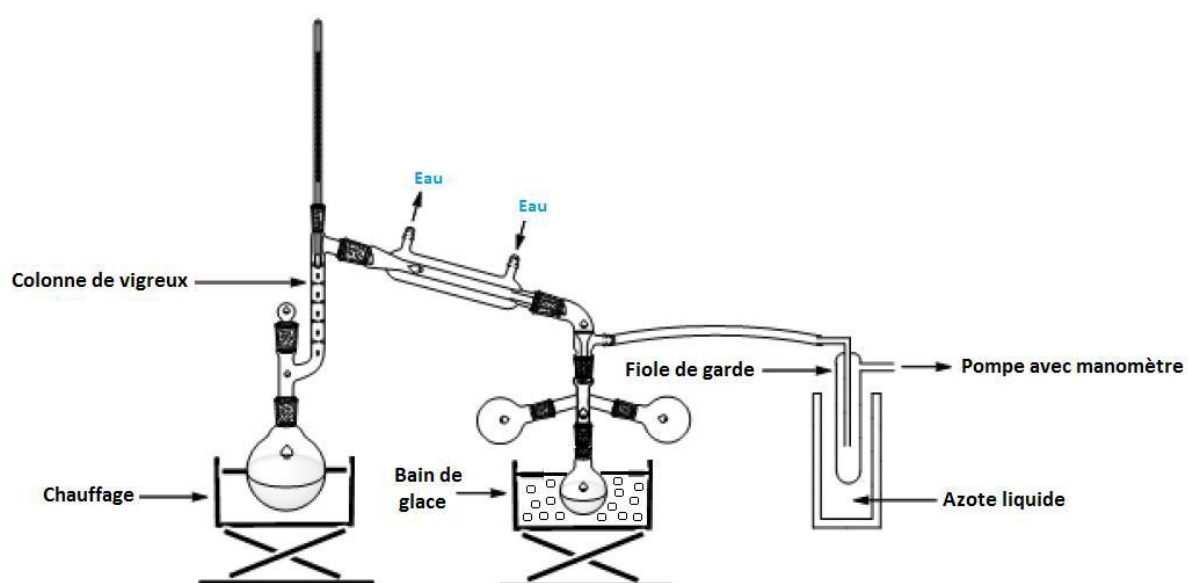


Figure IV.3: Montage de distillation sous pression réduite

## IV.2. La lyophilisation

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

dissoudre ou de se laisser pénétrer par un solvant avec une grande rapidité. Pour obtenir de nouveau le produit initial, une 3<sup>ème</sup> étape de réhydratation est nécessaire.

### IV.2.1. Technique de la lyophilisation

Cette opération est réalisée en trois phases:

1. Congélation du produit entre  $-30^{\circ}\text{C}$  et  $-50^{\circ}\text{C}$  ;
2. Dessiccation primaire ou sublimation: Durant cette étape dite de sublimation, effectuée sous vide, l'eau contenue dans le produit passe de l'état solide (glace) à l'état gazeux (vapeur). Cette opération se déroule à une température supérieure à  $-20^{\circ}\text{C}$ .
3. Dessiccation secondaire ou séchage final: Cette étape du procédé s'effectue toujours sous vide à une température n'excédant pas  $+50^{\circ}\text{C}$ . L'humidité résiduelle finale du produit est comprise entre 4 et 6 %.

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

### IV.2.2. Avantages

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

### IV.2.3. Applications

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

# Chapitre V

## *Généralités sur les méthodes chromatographiques*



Chromatographie est un terme général, utilisé pour définir des méthodes de séparation basées sur la distribution d'un soluté entre deux phases, l'une étant mobile (un gaz ou un liquide), l'autre stationnaire (un solide ou un liquide).

### V.1. Définition de la chromatographie

La chromatographie, méthode d'analyse physico-chimique, sépare les constituants d'un mélange (**les solutés**) par entraînement au moyen d'une **phase mobile** (liquide ou gaz) le long d'une **phase stationnaire** (solide ou liquide fixé), grâce à la répartition sélective des solutés entre ces deux phases. Chaque soluté est donc soumis à une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et une force de mobilité (due à la phase mobile).

### V. 2. Historique de la chromatographie

La première chromatographie a été réalisée en 1906 par le botaniste russe **Mikhaïl Tswett** et consistait à séparer les pigments (en grec : "chromato") d'une feuille d'épinard. Tswett avait observé la séparation des colorants végétaux, dont les chlorophylles, lorsqu'il filtrait leur solution dans l'éther de pétrole, sur une colonne de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ). Il a observé sur la colonne la formation de bandes de couleur différente (vert, orange, jaune..), la Figure V.1 est montrée l'expérience de Tswett. Il a donné à cette technique le nom de chromatographie (écriture des couleurs vient du grec: **Khroma= couleur; Graphain= écrire**). Il a défini également les termes : **chromatogramme, élution, rétention**.

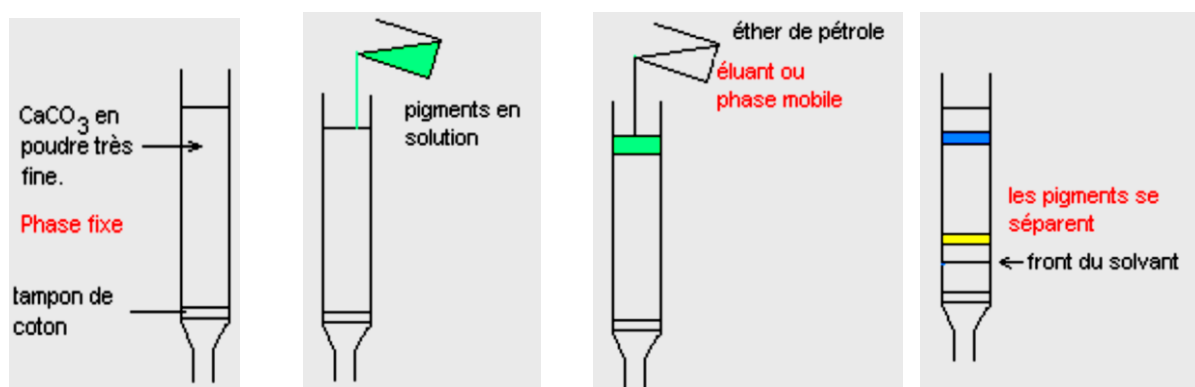


Figure V.1 : la représentation de l'expérience de Tswett en 1906

(Mikhail TSWETT a utilisé une colonne en verre remplie de carbonate de calcium (phase stationnaire) et l'éther de pétrole comme phase mobile pour séparer les pigments colorés de la chlorophylle.)

Cette technique fut quasi-abandonnée jusqu'en 1930, où Edgar Lederer a purifié par la méthode de Tswett la lutéine du jaune d'œuf.

- **En 1938** mise au point de la C.C.M par **Ismailov et Shraiber**
- **En 1941** : **Martin et James** (prix Nobel 1962), ont développé la chromatographie liquide sur colonne et devient une technique d'utilisation courante en biochimie et en chimie organique.
- **En 1952** : mise au point par Martin et James de la chromatographie en phase gazeuse C.P.G La chromatographie est en plein évolution actuellement surtout avec l'arrivée des colonnes capillaires en C.P.G et le couplage avec d'autres méthodes tel que la spectrométrie de masse.
- En 1968, mise au point de la Chromatographie Liquide Haute Performance CLHP ou HPLC en anglais.
- En 1979, première séparation chirale par HPLC.

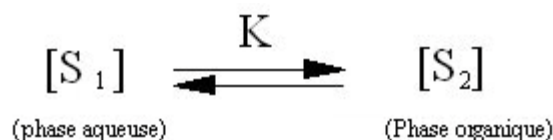
### V. 3. Terminologie générale de la chromatographie

- **Soluté (S)**: toute substance, constituant d'un mélange, séparée par chromatographie.
- **Phase mobile (PhM)**: le vecteur, liquide ou gazeux, qui déplace le soluté.
- **Phase stationnaire (PhS)**: le produit qui, par ses affinités avec les solutés, va permettre leur séparation quand la phase mobile les déplace.
- **Support**: Un substrat inerte qui porte la phase stationnaire.
- **Colonne chromatographique**: tube de diamètre et longueur variable, en verre, métal ou autre substance, à l'intérieur duquel s'opèrent les séparations chromatographiques.
- **Valeurs de rétention**: toutes données qui permettent de chiffrer l'action spécifique de la PhS sur le soluté, au cours de l'analyse (temps de rétention, volume de rétention...).
- **Chromatogramme**: l'ensemble des réponses successives du détecteur, au cours de l'élution des solutés hors de la colonne.
- **Elution** : Un est un procédé permettant de mettre en solution (dite *éluee*) un composé adsorbé à l'aide d'un solvant nommé l'*éluant*.

## V.4. Principe général

La chromatographie est une méthode basée sur la différence de miscibilité d'un soluté entre deux phases. Cette méthode s'apparente à l'**extraction**. Le principe de l'extraction est simple : Soit un soluté **S** réparti entre 2 phases non miscibles (1) et (2).

A l'équilibre, on a :

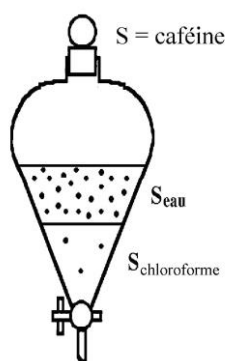


avec la constante d'équilibre  $K = [S_2]/[S_1]$ , **K** s'appelle aussi le coefficient de partition.

### Exemple:

Extraction de la caféine avec du chloroforme dans une décoction de thé (Figure V.2).

$$K = [\text{caféine}(\text{CHCl}_3)]/[\text{caféine}(\text{eau})] = 8,36.$$

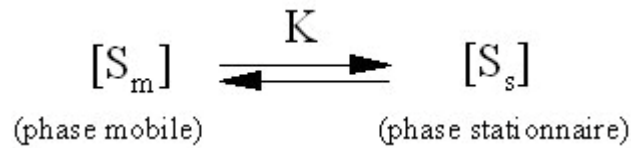


**Figure V.2 :** Extraction de la caféine avec du chloroforme par l'utilisation de l'ampoule à décanté

1- une phase mobile (**PhM**) qui est un fluide qui traverse la colonne (pour Tswett = éther de pétrole.)

2- une phase stationnaire (**PhS**) qui est une substance fixée sur la colonne (pour Tswett = carbonate de calcium.)

Avec l'équilibre suivant :



On a toujours  $[S_{PhM}] \ll [S_{PhS}]$ , d'où  $K \gg 1$  suivant la valeur de  $K$  le produit sera plus ou moins retenu sur la colonne, il sera "élué" plus ou moins rapidement. Les répartitions différentes des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire viennent d'adsorptions différenciées des produits.

A l'origine de ces phénomènes d'adsorption, il a des paramètres physiques (taille des particules, porosité, surface spécifique...) et des paramètres chimiques (interactions intermoléculaires comme les liaisons hydrogène, liaisons de Van der Waals...).

## V.5. Classification des techniques chromatographiques

La classification des chromatographies peut se faire en fonction des mécanismes de séparation. Les facteurs qui interviennent dans le partage des molécules à séparer entre les phases fixe et mobile sont : la solubilité dans un solvant liquide, la taille (la forme), la polarité, la charge électrique, la présence de groupements d'atomes formant des sites particuliers. Les différents types de chromatographie résultent du fait que l'on a privilégié l'effet de l'un de ces facteurs, mais l'exclusivité d'un mécanisme n'est jamais totale au cours d'une séparation chromatographique.

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

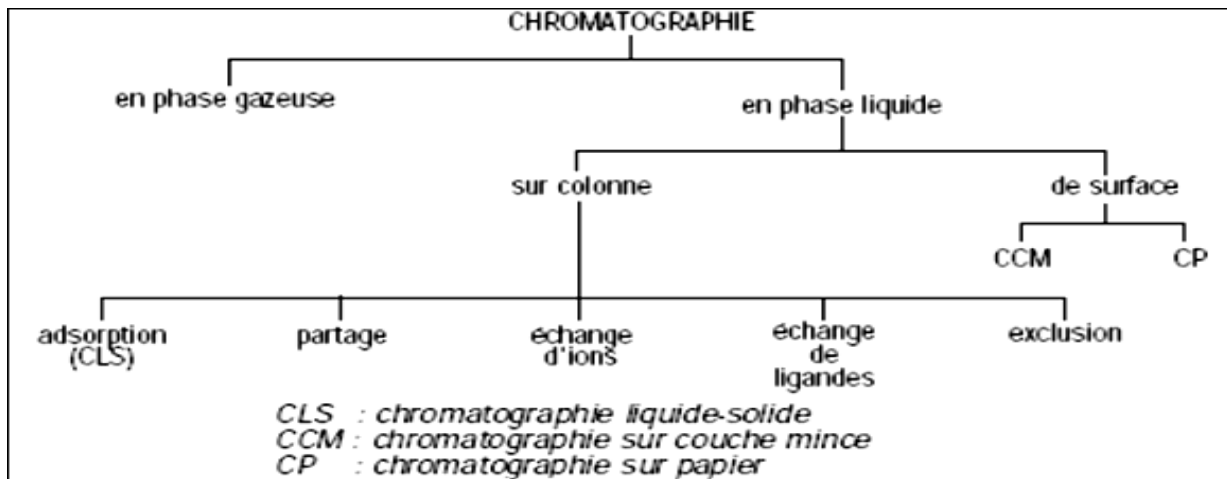
- 1) Classification selon la **nature physique des phases** : Premièrement on peut subdiviser les méthodes chromatographiques selon la nature de la phase mobile en deux grandes classes :
  - La chromatographie en phase liquide (CPL)
  - La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Deuxièmement, selon la nature de la phase stationnaire on distingue:

- la chromatographie gaz / solide CGS

- la chromatographie gaz / liquide CGL
  - la chromatographie liquide / solide CLS
  - la chromatographie liquide / liquide CLL
- 2) Classification selon le **phénomène mis en œuvre** : Cette classification repose sur la nature de la **phase stationnaire** et son interaction avec les molécules à séparer. On distingue :
- La chromatographie d'adsorption
  - La chromatographie de partage
  - La chromatographie d'échange d'ions
  - La chromatographie d'exclusion
  - La chromatographie d'affinité
- 3) **Classification selon la technique mise en jeu** : Selon le support de la chromatographie on distingue :
- **La chromatographie sur colonne**
  - **La chromatographie planaire** (chromatographie sur papier ou chromatographie sur couche mince).

On peut résumer les différentes méthodes chromatographiques existantes dans la Figure V.3.



**Figure V.3** : Classification des méthodes chromatographiques

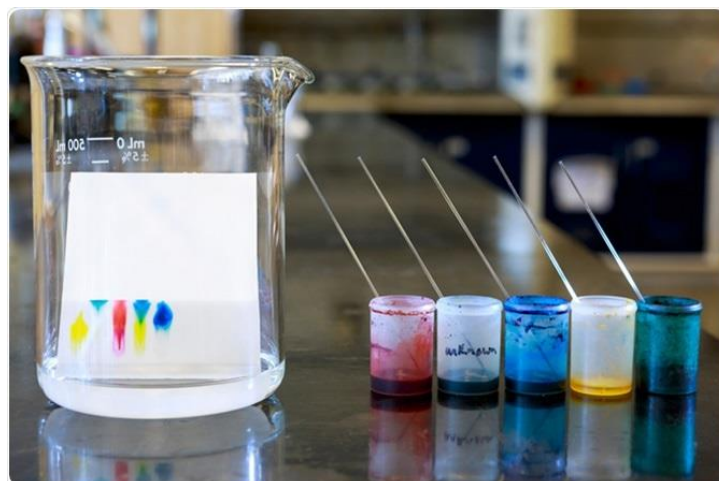
### V.5.1. La chromatographie sur couche mince (CCM ou TLC en anglais)

Cette technique est basée essentiellement sur des phénomènes d'adsorption et sur le principe de la capillarité. Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve chromatographique, l'éluant monte à travers la phase stationnaire (PhS).

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

#### Exemple :

La figure V.4 représente la séparation des composés colorants alimentaires par Chromatographie sur couche mince.



**Figure V.4. : Expérience représentant la séparation des colorants sur une plaque CCM**

Le contenant sera une cuve chromatographique, à savoir un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche.

On va devoir gérer 3 éléments bien définis :

#### V.5.1.1. La phase mobile (PhM)

Egalement appelée **éluant** : c'est un solvant (ou un mélange de solvants), qui progresse le long d'une phase dite « stationnaire », fixée sur un support, en entraînant les composants de l'échantillon.

*Selon le type d'analyse à réaliser, le choix de l'éluant sera variable :*

- pour les hydrocarbures : hexane, éther de pétrole ou benzène
- pour des groupements fonctionnels courants : hexane ou éther de pétrole, mélangés en proportions variables avec du benzène ou de l'éther diéthylique.
- Pour des composés polaires : éthanoate d'éthyle, propanone ou méthanol.

#### V.5.1.2. La phase stationnaire (PhS)

C'est une couche d'environ  $\frac{1}{4}$  d'un adsorbant qui est fixée sur une plaque de verre (ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium, voire même sur une feuille de papier), à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté (plâtre), l'amidon ou un

*Par ordre d'importance décroissante, les adsorbants employés en CCM sont le gel de silice, l'alumine, le kieselguhr et la cellulose.*

polymère organique. Après le dépôt de l'échantillon sur la PhS, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

#### V.5.1.3. L'échantillon

Il est mis en solution (2 à 5 %) dans un solvant volatile, qui n'est pas forcément le même que l'éluant : les plus utilisés sont le trichlorométhane (chloroforme), la propanone ou le dichlorométhane. La solution (1 cm<sup>3</sup> max.) est déposée sur la plaque, à environ 1 cm de la partie inférieure.

#### V.5.1.4. Choix des conditions opératoires

##### V.5.1.4.1. Choix de la phase stationnaire

Il en existe trois principaux : silice, alumine et cellulose. Les supports sont généralement montés sur une plaque d'aluminium. Certaines plaques possèdent un colorant incolore en lumière naturelle mais de couleur verte en UV (ZnS absorbant à 256 nm). Voici comment orienter son choix :

- Silice : c'est le support le plus courant. Il est conseillé de toujours commencer par celui-là.
- Alumine : on l'utilise généralement pour les composés à caractère basique.
- Cellulose : on l'utilise pour les composés fortement polaires, comme les sucres ou les acides aminés.

#### V.5.1.4.2. Choix de l'éluant

Le choix de l'éluant est essentiel. Il n'est pas toujours fourni avec le mode opératoire et il est important de savoir le choisir. L'éluant est souvent un savant mélange de plusieurs (2 ou 3) solvants dans des proportions bien établies. Deux facteurs interviennent lors de l'interaction entre ; l'**éluant et le soluté** (mélange de composés à séparer):

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

**Remarque :**

**Moins un composé est polaire**, moins il s'accroche à l'adsorbant, plus il migre avec l'éluant

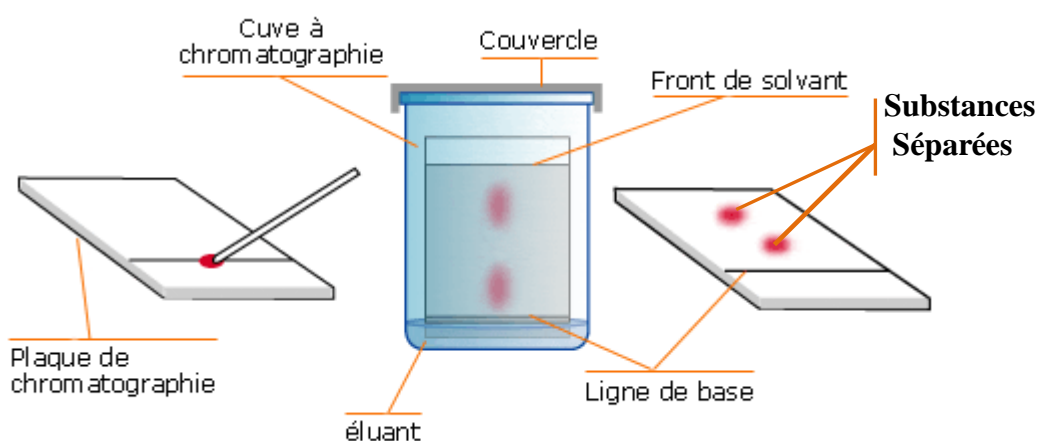
⇒ **Choix d'un éluant peu polaire**

**Plus un composé est polaire**, plus il s'accroche à l'adsorbant, moins il migre avec l'éluant.

⇒ **Choix d'un éluant polaire**

#### V.5.1.5. Réalisation d'une CCM

La CCM se déroule en trois étapes : préparation de la cuve, préparation de la plaque, et élution. La figure (V.5) résume les étapes de réalisation d'une chromatographie sur couche mince



**Figure V.5 :** Etapes à suivre pour une chromatographie sur couche mince



### V.5.1.6. Révélation

Certains composés sont colorés : il n'est pas nécessaire de les révéler. La plupart sont incolores. Voici quelques méthodes utilisées pour révéler les plaques.

#### V.5.1.6.1. Révélation UV

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

#### V.5.1.6.2. Révélation à l'iode

Beaucoup de composés organiques forment des taches jaune-marron en présence d'iode. Dans un flacon, placer la plaque et quelques cristaux d'iodes, puis boucher. Les taches apparaissent.

#### V.5.1.6.3. Révélation par atomisation

Cette technique utilise un atomiseur contenant le révélateur en solution. Selon le produit à révéler, la solution peut-être :

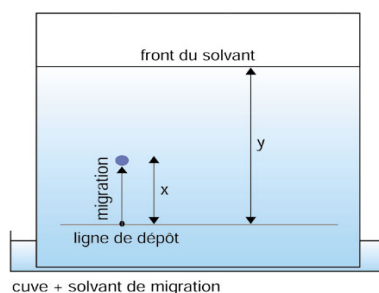
- Ninhydrine pour les acides  $\alpha$ -aminés (taches violettes qui brunissent pour disparaître en quelques jours)
- Acide sulfurique à 50% pour à peu près tout (taches noires).
- On utilise aussi des mélanges complexes d'oxyde de molybdène en présence de sulfate de cérium.

### V.5.1.7. Calculs et interprétation

La position finale de la tache (ou spot) est caractéristique de la molécule. On lui attribue une valeur, le  $R_F$  de **R**etention **f**actor en anglais ((Retardation factor ou « référence front », « coefficient de migration ») qui a été fort habilement traduit comme **R**apport **f**rontal. Ce  $R_f$  est le rapport de la distance parcourue par le composé divisé par la distance parcourue par l'éluant.

$$R_f = H_p/H_s$$

où  $H_p$  = hauteur d'éluion du produit et  $H_s$  = hauteur d'éluion du solvant



**Figure V.6.** : Schéma montrant comment déterminer le rapport frontal d'une substance

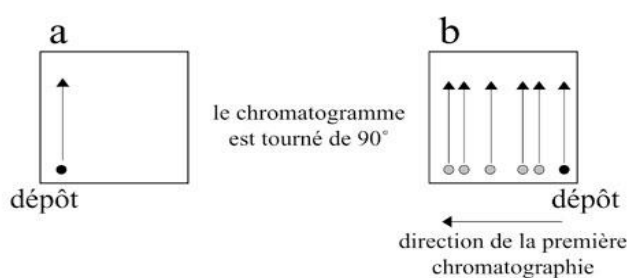
La figure V.6 montre comment déterminer le  $R_f$  dans le cas d'une chromatographie liquide ascendante: On mesure la distance  $x$  ( $H_p$ ) parcourue par la substance à partir de la ligne de dépôt. On mesure également la distance  $y$  ( $H_s$ ) parcourue par le solvant à partir de la ligne de dépôt, jusqu'au front de solvant. Le rapport  $x / y$  toujours inférieur à 1 représente le rapport frontal de la substance ( $R_F$ ).

**Remarque :**

*Un soluté très soluble dans la phase fixe aura un  $R_F$  faible, alors qu'un soluté très soluble dans la phase mobile aura un  $R_F$  élevé et proche de 1.*

### V.5.1.8. Chromatographie bidimensionnelle

Dans le cas où le mélange contient des solutés de mobilités voisines, on peut augmenter le pouvoir séparateur en réalisant une **chromatographie bidimensionnelle** : sur le même support, on réalise une première chromatographie à l'aide d'un système de solvants, puis une deuxième à l'aide d'un second système de solvants, **dans une direction perpendiculaire à la première** (figure V.7).



**Figure V.7.** : Chromatographie liquide-liquide bidimensionnelle

Comme indiqué la figure V.7 en (a), on commence par réaliser la chromatographie de façon classique avec un certain système de solvants. Nous aurons donc une première séparation. La plaque est ensuite tournée à 90° et une nouvelle élution est réalisée avec un autre système de solvants (b).

### V.5.2. Chromatographie sur colonne en phase liquide (LC)

C'est la chromatographie la plus ancienne (Figure .8), où la phase mobile est un liquide (**PhM** = liquide).

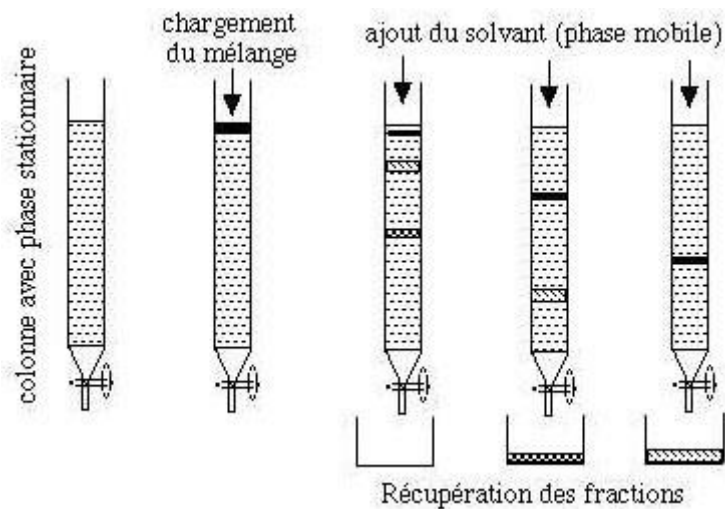


Figure V.8 : Schéma simplifié d'une chromatographie liquide

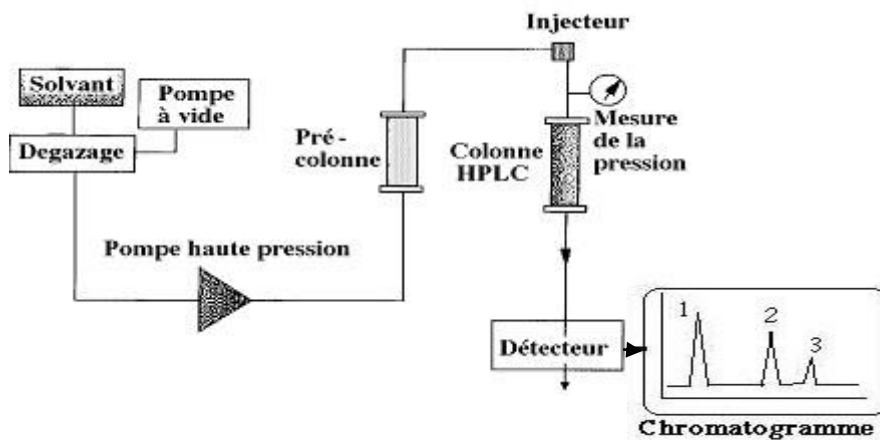


Figure V.9 : Schéma simplifié d'un chromatographe HPLC

La figure V.9 schématisé la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP ou HPLC en anglais) cette dernière est une amélioration de la chromatographie en phase liquide, dans laquelle la phase mobile est utilisée sous haute pression. L'utilisation de la haute pression améliore l'efficacité des séparations et réduit fortement les temps d'analyse.

On peut subdiviser la chromatographie sur colonne en phase liquide en plusieurs classes, selon la nature des phénomènes mis en jeu. Cette classification repose sur la nature de la **phase stationnaire** et son interaction avec les molécules à séparer.

En résumé les différents principes de chromatographie résultent du fait que l'on a privilégié un des facteurs cités dans le Tableau V.1, afin de séparer des composés constituant un mélange :

**Tableau V.1** : Facteurs de séparation de quelques techniques chromatographique selon la nature des phénomènes mis en jeu

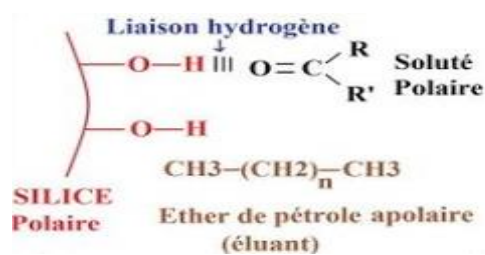
| Technique chromatographique                                    | Facteur de séparation                              |
|--|--|
| Chromatographie d'adsorption et d'adsorption en phase inversée | Polarité   |
| Chromatographie de partage                                     | Solubilité dans un solvant                         |
| Chromatographie d'exclusion                                    | Taille et forme                                    |
| Chromatographie par échange d'ions                             | Charge électrique                                  |
| Chromatographie d'affinité                                     | Groupement d'atomes formant des sites particuliers |

#### V.5.2.1. Chromatographie d'adsorption

C'est une chromatographie liquide-solide. La phase stationnaire est un adsorbant solide polaire. La chromatographie d'adsorption en phase inverse : C'est une chromatographie liquide-solide dans laquelle la phase stationnaire est apolaire.

- **Phase mobile(PhM):** solvant peu polaire (pentane, acétate d'éthyle, éther, dichlorométhane. ....méthanol).
- **Phase stationnaire (PhS):** gel de silice ou d'alumine.

Les interactions sont des interactions électrostatiques (Figure V.10) du type dipôle-dipôle ou dipôle-dipôle induit (Si-O-Si-O-H ----- X).



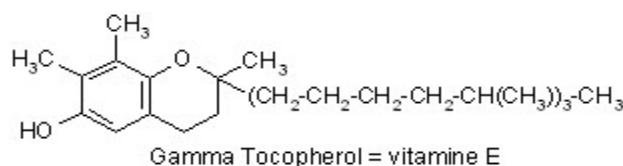
**Figure V.10 :** Principe de la chromatographie d'adsorption

Les solutés sont élués dans l'ordre de polarité croissante (par exemple carbure, puis cétone enfin alcool)

### Exemple :

Pour la séparation d'un mélange des vitamines lipidiques ( $\alpha$ -Tocopherol,  $\beta$ -Tocopherol,  $\gamma$ -Tocopherol,  $\delta$ -Tocopherol, Ergocalciferol, Retinol), on injecte le mélange à séparer dans une appareil HPLC avec les conditions suivantes :

- **Colonne:** SUPELCOSIL LC-Si, 15cm x 4.6mm ID, 5 $\mu$ m particules
- **Phase mobile :** hexane/ alcool amylique (99.65:0.35)
- **débit:** 2mL/min
- **Détecteur.:** UV, 280nm
- **le volume injecteur:** 20 $\mu$ L



Les résultats sont illustrés dans le chromatogramme obtenu (figure V.11), avec :

1.  $\alpha$ -Tocophérol,
2.  $\beta$ -Tocophérol,
3.  $\gamma$ -Tocophérol,
4.  $\delta$ -Tocophérol,
5. Ergocalciférol,
6. Rétinol



**Figure V.11:** Chromatogramme obtenu par HPLC liquide-solide (*phase normale*)

### V.5.2.2. Chromatographie de partage

C'est une chromatographie liquide-liquide (*phase inverse*). La phase stationnaire est un liquide fixé sur un support inerte (ex. : de l'eau sur la cellulose d'un papier). Cette chromatographie est ainsi dénommée car elle est basée sur le partage du soluté dans les deux phases liquides :

- **PhM** = solvants polaires (eau- méthanol - acétonitrile).
- **PhS** = liquide greffé sur un gel de silice, on peut greffer de longues chaînes aliphatiques pour obtenir par exemple le motif  $\text{Si-O-Si-O-C}_{17}\text{H}_{34}\text{-CH}_3$ , (PhS C18) ou des chaînes avec des substituants aromatiques. La phase stationnaire est dans ce cas assimilée à un liquide immobilisé sur la colonne.

Les interactions sont des interactions du type lipidique (interactions avec de longues chaînes hydrocarbonées)

Les solutés sont élués dans l'ordre de polarité décroissante (par exemple alcool, puis cétone enfin carbure), à l'inverse de la chromatographie solide-liquide

**Exemple :** Dosage des acides organiques dans le jus d'orange, dans les Conditions suivants :

- **Colonne :** SUPELCOSIL 15cm x 4.6mm, particules de 5 $\mu\text{m}$  (avec filtre de 0,5 $\mu\text{m}$  avant la colonne)
- **Phase Mobile:** eau à pH 2.0
- **Débit:** 2mL/min
- **Détecteur:** UV, 210nm
- **Injecteur:** 5 $\mu\text{L}$  jus d'orange

Si on compare les deux chromatogrammes obtenus dans la figure (V.12) on remarque la formation de l'Acide fumarique (pic 3) à partir la dégradation de l'acide ascorbique (pic 1).

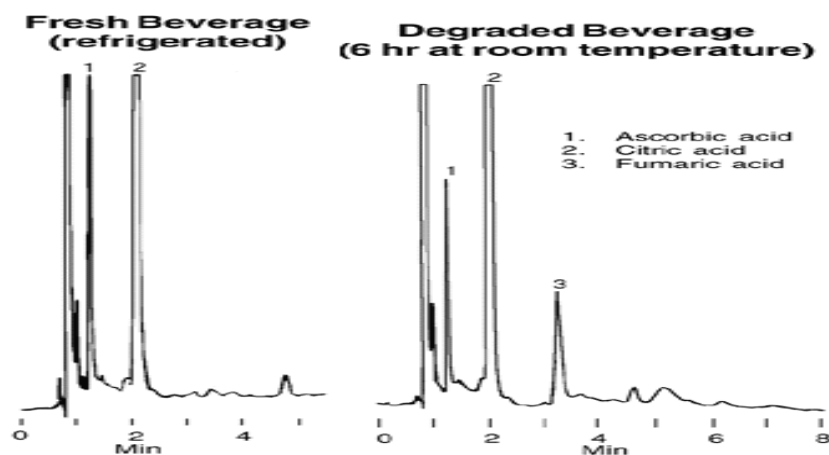


Figure V.12: HPLC liquide-liquide (*phase inverse*).

### V.5.2.3. Chromatographie d'exclusion stérique (SEC en anglais)

On l'appelle également chromatographie d'exclusion diffusion, tamisage moléculaire, gel-filtration ou perméation de gel. La phase stationnaire est un solide poreux : les grosses particules sont exclues de la phase fixe, en revanche, les petites particules incluses diffusent dans les pores du gel (figure V.13).

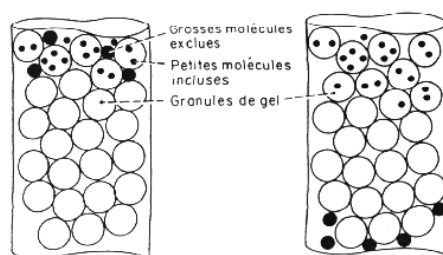


Figure V.13 : Principe de la chromatographie d'exclusion

Cette chromatographie est appelée aussi chromatographie par perméation sur gel (GPC).

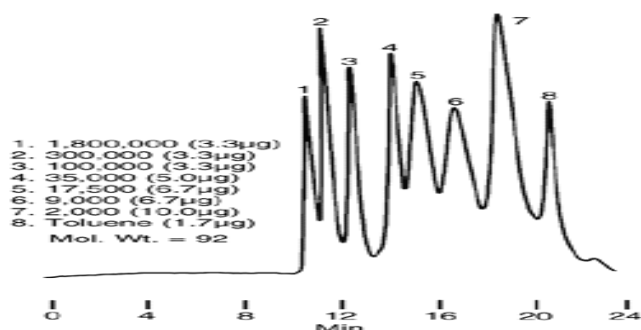
- **PhM** = solvant organique (en général tétrahydrofurane, ou toluène)
- **PhS** = solide poreux. Il y a une relation entre la taille des pores et la taille des molécules.

Par exemple des molécules entre 1000 et 8000 Daltons sont retenues par des pores 4 nm, des molécules entre 200000 et 150000 Daltons sont retenues par des pores 250 nm. Les molécules plus grosses que la taille des pores sont éluées les plus rapidement.

**Applications :** Séparation et dosage des polymères.

**Exemple** : HPLC par exclusion stérique d'un mélange de polystyrènes (Figure V.14), les conditions sont :

- **2 Colonnes en série:** SUPELCOSIL LC-1, 25cm x 6.2mm ID, particules de 5µm puis SUPELCOSIL LC-301, 25cm x 6.2mm ID, particules de 5µm, pores de 300Å
- **Phase mobile:** tetrahydrofuranne
- **Débit:** 1mL/min
- **Température:** 45°C
- **Détecteur:** UV, 254nm
- **Volume Injecté:** 10µL de polymères



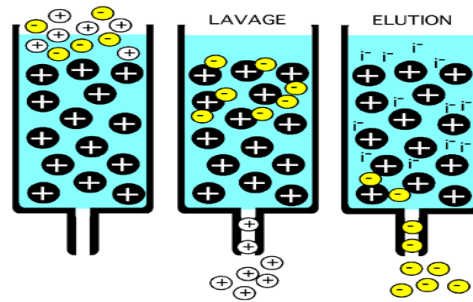
**Figure V.14** : HPLC par exclusion stérique d'un mélange de polystyrènes

- |                                     |                                  |
|-------------------------------------|----------------------------------|
| 1. Polystyrène (M. 1 800 000) 3.3µg | 5. Polystyrène (M. 17 500) 6.7µg |
| 2. Polystyrène (M. 300 000) 3.3µg   | 6. Polystyrène (M. 9 000) 6.7µg  |
| 3. Polystyrène (M. 100 000) 3.3µg   | 7. Polystyrène (M. 2 000) 10.0µg |
| 4. Polystyrène (M. 35 000) 5.0µg    | 8. Toluène 1.7µg                 |

#### V.5.2.4. Chromatographie sur échangeurs d'ions (IEC en anglais)

La phase stationnaire est un échangeur d'ions (Figure V.15) constitué par une résine porteuse de groupements ionisés négativement ou positivement, exerçant des interactions de type électrostatique avec les solutés ioniques du milieu.





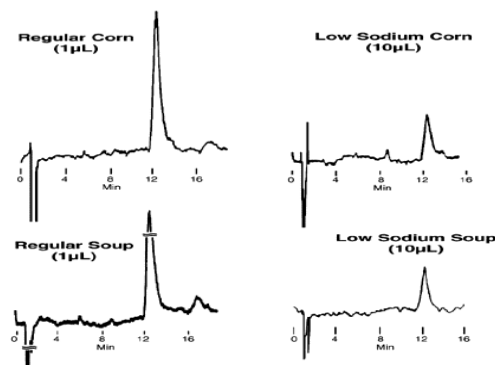
**Figure V.15** : Principe de la chromatographie d'échange d'ions

- **PhM** = solution tampon aqueuse.
- **PhS** = résine échangeuse d'ion , donc un solide comportant des sites ioniques.

La séparation est basée sur des interactions ioniques et s'applique à des solutés eux même ionisés (sels..)

*Applications : Dosage des anions et cations dans une eau*

**Exemple** : Dosage du sodium (Figure V.16) dans des produits alimentaires (maïs et soupes en boîte)



**Figure V.16.** Chromatographie par échange d'ions.

Conditions:

- **Colonne** : SUPELCOSIL LC-SCX, 25cm x 4,6mm ; particules de 5µm
- **Température**: 35°C
- **Phase mobile**: eau avec 0,05M acide citrique, pH 2,4
- **Débit**: 2,0mL/min
- **Détecteur**: conductivité
- **Injecteur**: échantillons de maïs et soupes en boîte dilués (1:1) avec la phase mobile

### V.5.2.5. Chromatographie d'affinité

La phase stationnaire est un support macromoléculaire chimiquement inerte, sur lequel est greffé un effecteur qui présente une affinité biologique (bioaffinité) pour un soluté de l'échantillon à analyser (affinité enzyme-substrat, ligand-récepteur, antigène-anticorps).

La figure (V.17) schématise le principe de chromatographie d'affinité :

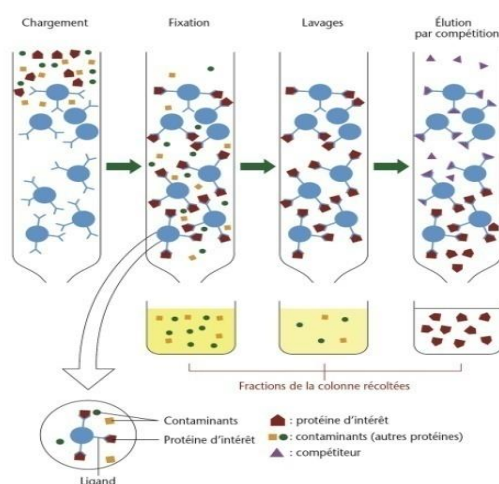


Figure V.17 : Principe de la chromatographie d'affinité

### V.5.3. Chromatographie en phase gazeuse

Cette chromatographie (CPG ou GC en anglais), qui est la plus performante au point de vue de la séparation, est réservée aux produits volatils et thermostables de masse moléculaire inférieure à 500 Daltons. La figure V.18 montre les différentes parties constitutives d'un chromatographe en phase gazeuse.

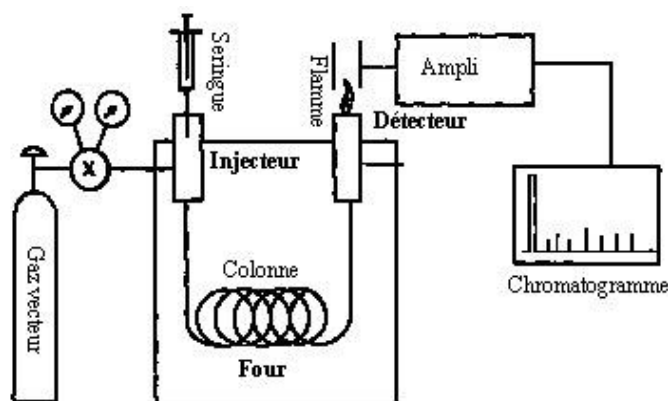


Figure V.18 : Schéma simplifié d'un chromatographe en phase gazeuse

### V.5.3.1. Chromatographie gaz-liquide

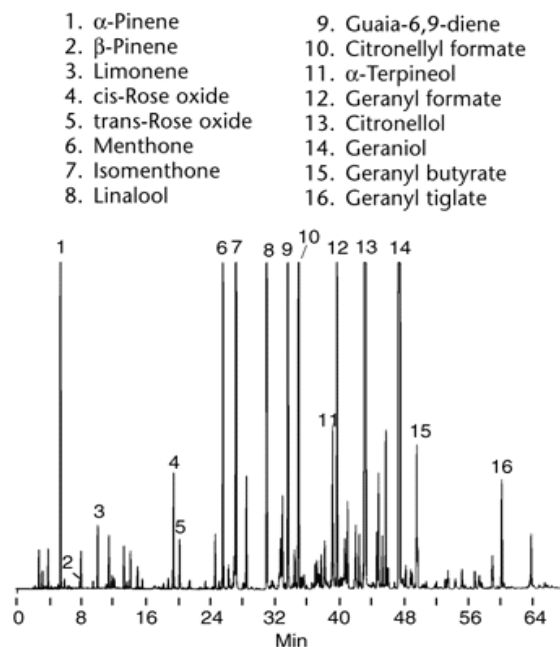
Cette chromatographie est la plus répandue et est utilisée dans de nombreux domaines, dans laquelle :

- **La phase Mobile** : est un gaz vecteur (He, H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>...).
- **La phase stationnaire est un :**
  - liquide greffé sur des particules pour les colonnes remplies.
  - Ou un liquide greffé sur la paroi interne de la colonne pour les colonnes capillaires.

La substance greffée sur la colonne est en général un polymère siliconé, inerte chimiquement et tenant bien la température.

**Exemple :** Analyse par CPG de l'essence de géranium.

Le chromatogramme obtenu dans la figure V. 19, indique que l'huile de géranium contient au moins 16 composés.



**Figure V.19:** Chromatogramme de l'essence de géranium

Les Conditions de l'analyse sont les suivant :

- **Colonne:** SUPELCOWAX 10, 30m x 0.25mm ID, film de 0.25 $\mu$ m

- **Four:** 50°C (2 min) to 280°C at 2°C/min, puis 20 min
- **Phase mobile :** helium, 25cm/sec
- **Détecteur.:** FID
- **Injecteur:** 0.2µL, split (100:1)

### V.5.3.2. Chromatographie gaz-solide

Ce type de chromatographie s'applique aux molécules très volatiles (gaz, hydrocarbures légers...)

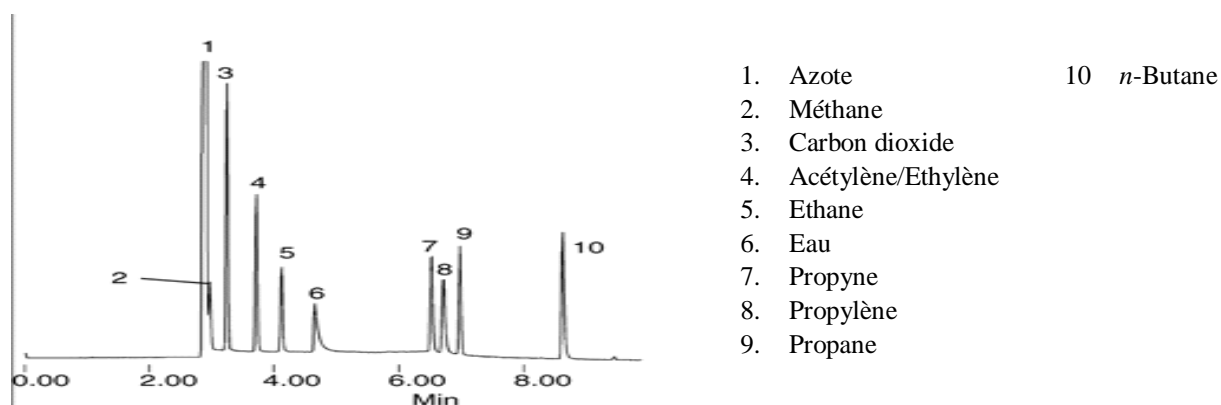
- **PhM** = gaz (He, H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>...)
- **PhS** = solide adsorbant

**Exemple :** Séparation de produits gazeux.

#### Conditions

- **Colonne:** Supel-Q PLOT, 30m x 0.53mm ID
- **Four:** 35°C (3 min) jusqu'à 250°C à 16°C/min
- **Phase mobile:** hélium avec un débit de 3mL/min
- **Détecteur:** TCD à une température de 250°C
- **Injecteur:** 0,1µL

La figure V.20, illustre le chromatogramme obtenu de la séparation de produits gazeux à analyser, dans les conditions précédentes.



**Figure V.20 :** Chromatographie gaz-solide : Séparation de produits gazeux.

## V.5.4. Autres types de chromatographie

Il existe d'autres types de chromatographie, parmi elles :

### V.5.4.1. La chromatographie supercritique

Cette chromatographie combine les bons résultats de la CPG au point de vue séparation et le domaine d'utilisation de la LC.

- **PhM** = gaz à l'état supercritique (en général CO<sub>2</sub> à 50° et 150 bars)
- **PhS** = solide ou liquide greffé sur solide.

### V.5.4.2. L'électrophorèse

- **PhM** = solution tampon.
- **PhS** = gel disposé sur une plaque ou dans un tube capillaire Un champ électrique est appliqué aux deux extrémités de la plaque (ou du tube).

Cette chromatographie est basée sur les différences de mobilité des ions dans un champ électrique. Cette mobilité varie en fonction de la charge de la taille et de la géométrie des molécules.

Les ions positifs vont vers l'électrode négative et vice versa. Pour des raisons de sécurité, une électrode est mise à la masse et l'autre est mise à une haute tension positive ou négative

**Applications** : Séparation des protéines, peptides, empreintes génétiques.

# **Chapitre VI**

***La chromatographie sur colonne  
(HPLC et CPG) :  
Instrumentations et Aspects théoriques***

La chromatographie liquide **haute performance** (HPLC) ou simplement La *chromatographie* en phase *liquide* (CPL) ou *liquid chromatography* (LC) est une technique séparative utilisée en analyse quantitative, qualitative et principalement employée dans le domaine de la chimie analytique comme outil scientifique majeur mais aussi dans des domaines variés tels que la Toxicologie et la Biochimie.

Le champ d'application de l'HPLC recouvre une grande partie du domaine de la chromatographie en phase gazeuse auquel s'ajoute celui de l'analyse des composés thermosensibles ou de masses moléculaires à la fois très grandes et même polaires. Son succès est dû à la possibilité d'agir de manière très précise sur la sélectivité entre les composés par le choix de la colonne et de la composition de l'éluant, c'est-à-dire en exploitant les interactions soluté/phase mobile/phase stationnaire. L'efficacité des colonnes est moindre qu'en CPG, mais l'utilisation de phases chirales ou des nouvelles phases stationnaires opérant suivant plusieurs modes, les techniques par appariement d'ions ainsi que d'interaction hydrophobe accroissent encore plus les possibilités de la CLHP.

Ce chapitre nous permettra de nous familiariser avec les différents composants qui composent chacun d'appareil: HPLC ou CPG, et comment exploiter les résultats d'analyse

## **VI.1. La Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)**

C'est une technique extrêmement intéressante et complémentaire à la CG, puisqu'elle permet l'étude de mélange dont les composants sont peu volatils ou qui se dégradent à haute température. Etant donné l'importance croissante de cette technique dans la plupart des laboratoires, nous allons nous attarder un peu sur elle.

### **VI.1.1. Instrumentation**

Dans tous les appareils HPLC, on retrouve un ensemble de modules reliés entre eux par des tubes de faible diamètre. Une, ou plusieurs pompes assurent le débit du solvant d'éluion. En aval de l'injecteur se trouvent la ou les colonnes où s'effectuera la séparation, puis au bout de la chaîne se trouve le détecteur (figure VI.1.). Par la suite, nous allons aborder un peu plus en détail chacun des composants essentiels d'une HPLC.

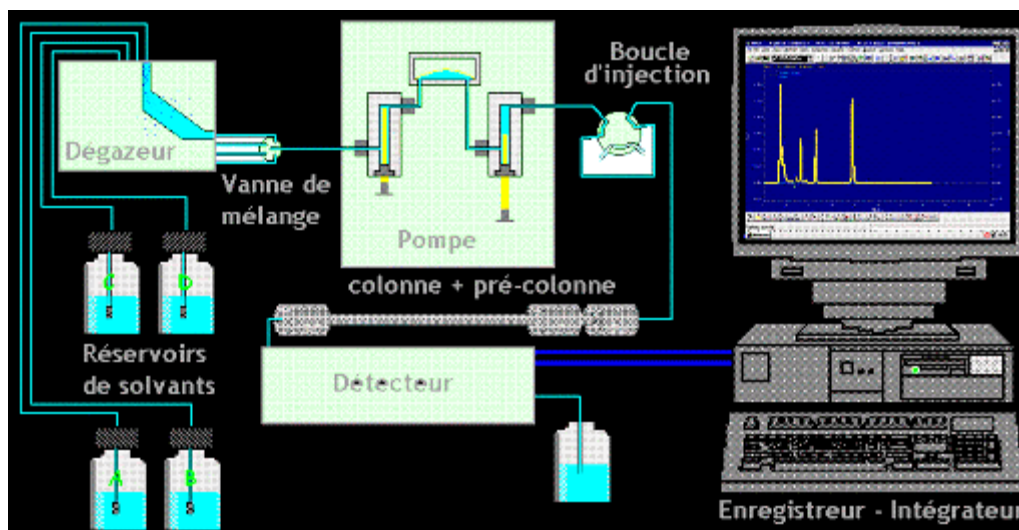


Figure VI.1: Schéma général d'un système HPLC

#### VI.1.1.1. Réservoirs de solvants (éluant)

Plusieurs flacons d'éluants (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'éluant (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe.

#### VI.1.1.2. 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.

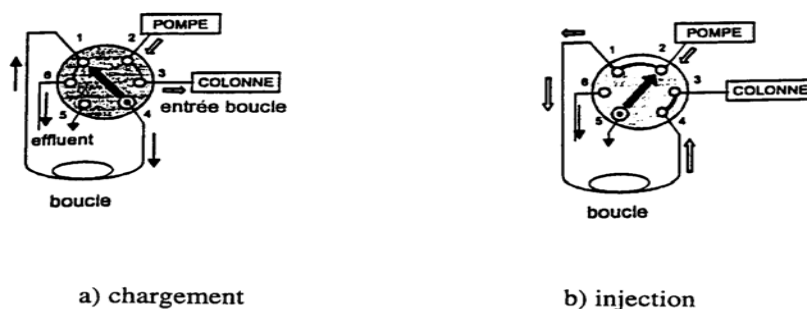
Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques  $\mu\text{L}$  à plusieurs  $\text{mL}/\text{min}$ .

#### VI.1.1.2. Vanne d'injection

C'est un injecteur à boucles d'échantillonnage. Il existe des boucles de différents volumes (10, 20, 50  $\mu\text{L}$ ...). 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. Elle



possède 2 positions. La première permet le remplissage (Figure VI.2.a) de la boucle d'injection de volume fixe (load), la seconde permet la mise en circulation de l'échantillon (Figure VI.2.b) dans le système chromatographique (inject). Le remplissage de la boucle d'injection se fait à l'aide d'une seringue.



**Figure VI.2:** Les deux phases de l'injection avec une boucle

### VI.1.1.3. Colonne

Une colonne est un tube construit dans un matériau le plus possible inerte aux produits chimiques, souvent en inox ou en verre (Figure VI.3). Le remplissage (en silice, silice greffée ou particules polymériques...) a une granulométrie de 3, 5, ou 10 $\mu$ m, de diamètre compris entre 4 et 20 mm pour des longueurs généralement de 15 à 30 cm. Au delà, les importantes pertes de charges exigeraient des pressions de liquide beaucoup trop élevées.



**Figure VI.3 :** Exemple des colonnes chromatographique en inox

#### VI.1.1.4. 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.

Il existe plusieurs détecteurs utilisés en HPLC :

- réfractomètre différentiel
- UV à barrette de diodes
- Electrochimique
- fluorimétrie...

Ainsi que différents types de couplage :

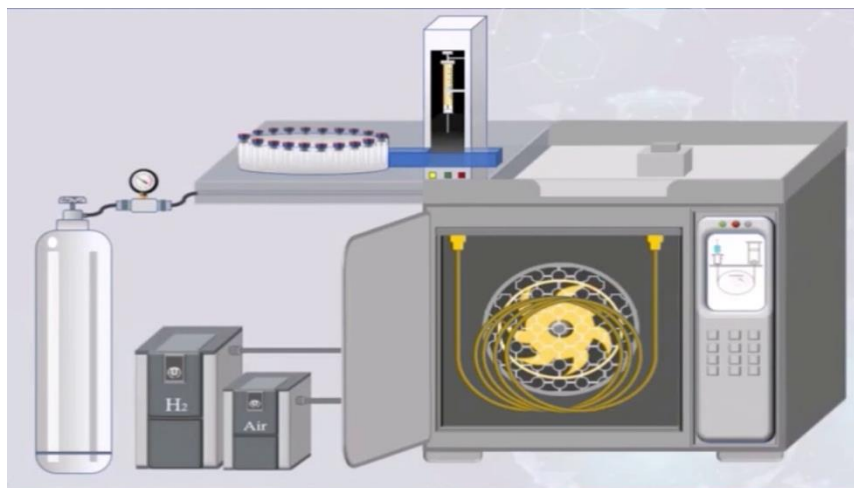
- Spectrométrie infrarouge
- Spectrométrie de masse
- Résonance Magnétique Nucléaire...

## VI.2. La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) (gas chromatography, GC, en anglais) est une technique de séparation d'un mélange de molécules volatiles, elle est utilisée dans des domaines très variés, tels que la parfumerie, l'œnologie, l'industrie pétrolière, la biologie, la chimie fine et l'industrie des matières plastiques.

### VI.2.1. Instrumentation

Un appareil de chromatographie en phase gazeuse *comporte trois parties* : *injecteur, colonne et détecteur* (figure VI.4) à travers lesquels un gaz vecteur entraîne les substances d'un mélange à séparer. *Le gaz vecteur le plus utilisé est l'hélium*, les autres sont l'hydrogène, l'azote ou l'argon. Il doit être très pur et surtout ne contenir ni oxygène, ni eau. Le débit du gaz est ajusté par un régulateur.



**Figure VI.4:** Schéma général d'un chromatographe CPG

#### VI.2.1.1. Le gaz vecteur (phase mobile)

Le gaz vecteur est le gaz qui circule à l'intérieur du chromatographe, entraînant les analytes à travers la colonne, depuis l'injecteur jusqu'au détecteur. Son choix dépend du type de détecteur utilisé ; cela peut être par exemple de l'hélium, de l'azote, de l'argon ou de l'hydrogène.

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

#### VI.2.1.2. Échantillons

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

- Lorsque les *solutés sont directement volatilisables*, les substances sont *solubilisées dans un solvant et chromatographiées*.

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

### VI.2.1.3. Injecteur

Il sert à l'introduction du mélange à analyser dans la colonne. Cette opération est faite :

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

En règle générale, la *chambre d'injection doit être à une température plus élevée que celle de la colonne pour faciliter l'évaporation des échantillons*. La température idéale est celle qui est 20° plus élevée que le point d'ébullition de la substance la moins volatile.

Le *choix de l'injecteur est dicté par le type de colonne* utilisée (remplie ou capillaire) *et* par la *nature des produits à séparer* (leur résistance à la décomposition lorsqu'ils sont soumis à de hautes températures).

Il y a essentiellement *deux techniques d'injection*, si on ne tient pas compte de la vanne à boucles : la *vaporisation directe « dans la colonne » et l'introduction dans la colonne d'une fraction de ce qui est injecté (split / splitless)*. Cette dernière technique est utilisée avec les colonnes capillaires.

#### VI.2.1.3.1. Injection à chaud avec vaporisation directe dans le corps de l'injecteur

Ce type d'injection présente l'inconvénient de favoriser la décomposition des substances fragiles car la température de l'injecteur est passablement plus élevée que celle de la colonne. Il est surtout utilisé avec les colonnes remplies.

#### VI.2.1.3.2. Injection à chaud « dans la colonne » avec vaporisation directe

Évite la décomposition des substances sensibles au niveau de l'injecteur mais présente deux inconvénients :

- L'obstruction de la seringue parce qu'elle risque de piquer dans la phase stationnaire.
- La perte de phase stationnaire dans la section de colonne qui se trouve dans l'injecteur.

#### VI.2.1.3.3. Injecteur split / splitless

La fonction « split » permet de ne pas injecter la totalité de l'échantillon ; cela peut être utile dans le cas d'échantillon en solution concentrée, pour éviter de surcharger la colonne.

Ce type d'injecteur ne laisse entrer dans la colonne qu'une petite partie du volume injecté. Cette fraction est ajustable et peut atteindre 1 / 200.

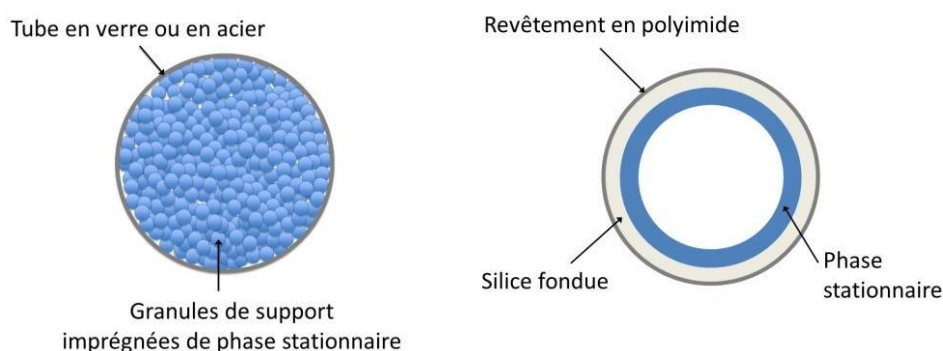
#### VI.2.1.3.4. Injection à froid suivie d'une brusque montée de la température

Cette méthode est utilisée lors de la séparation de *substances très fragiles*. Cette technique permet la condensation à l'entrée de la colonne de produits qui ne supportent pas les hautes températures des injecteurs conventionnels.

#### VI.2.1.4. Colonne (phase stationnaire)

Il existe deux types de colonnes (Figure VI.5) : les colonnes remplies et les colonnes capillaires.

- Les colonnes remplies ont un diamètre de quelques millimètres et une longueur de l'ordre du mètre. Elles sont remplies de granules de support inerte, généralement de la silice, dont la surface est imprégnée ou greffée avec la phase stationnaire. Elles sont aujourd'hui supplantées par les colonnes capillaires, dont le pouvoir de résolution est bien supérieur.



**Figure VI.5** : Schéma (en coupe) d'une colonne remplie (à gauche) et d'une colonne capillaire (à droite)

- Les colonnes capillaires sont de simples tubes d'acier inoxydable, de verre ou de silice fondue (matériau inerte vis-à-vis de la phase stationnaire et des échantillons) de diamètre intérieur compris entre 0,1 et 0,5 mm, et d'une longueur typique de plusieurs dizaines de mètres, pouvant aller jusqu'à 100 m. Pour tenir dans l'appareil, la colonne est enroulée, avec des spirales ayant 10 à 30 cm de diamètre. La surface interne de ce tube est recouverte d'un film de 0,1 à 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur constitué de la phase stationnaire. Ce film est mis en place par greffage ou simple déposition, le greffage étant généralement préféré pour des raisons de stabilité thermique. Par exemple, la Carbowax® est une colonne capillaire comportant un film polaire de

polyéthylène glycol greffé en surface, film qui constitue la phase stationnaire. La SE-30® est une colonne capillaire apolaire comportant un film de polydiméthylsiloxane qui constitue la phase stationnaire.

Dans le tableau suivant nous présentons quelques exemples des phases stationnaire utilisent en CPG.

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

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

#### VI.2.1.5. Four

La colonne est contenue dans un four de type chaleur tournante, dont la température est précisément ajustable (typiquement entre 20 °C et 350 °C) et programmable. Les températures utilisables en pratique dépendent des domaines de stabilité en température de la colonne utilisée, et de ceux des composés analysés.

Plus la température du four (et donc de la colonne) est élevée, plus les analytes se déplacent rapidement dans la colonne, mais moins ils interagissent avec la phase stationnaire, et donc moins les analytes sont séparés. Plus la température du four est basse, meilleure est la séparation des analytes mais plus longue est l'analyse. Le choix de la température est donc un compromis entre la durée de l'analyse et le niveau de séparation désiré.

Une méthode pour laquelle la température est gardée constante tout au long de l'analyse est appelée « *Isotherme* ». A l'inverse, on peut choisir d'augmenter la température du four au cours de l'analyse : cette méthode est appelée « *Gradient* ».

D'une manière générale, une méthode isotherme tend à donner des pics larges pour les espèces les plus retenues, et donc une moins bonne séparation. Ce phénomène est partiellement dû à la diffusion : plus une espèce chimique circule longuement dans la

colonne, plus elle a le temps de diffuser, élargissant ainsi le pic, et donc diminuant la hauteur des pics par la même occasion.

#### VI.2.1.6. Détecteur

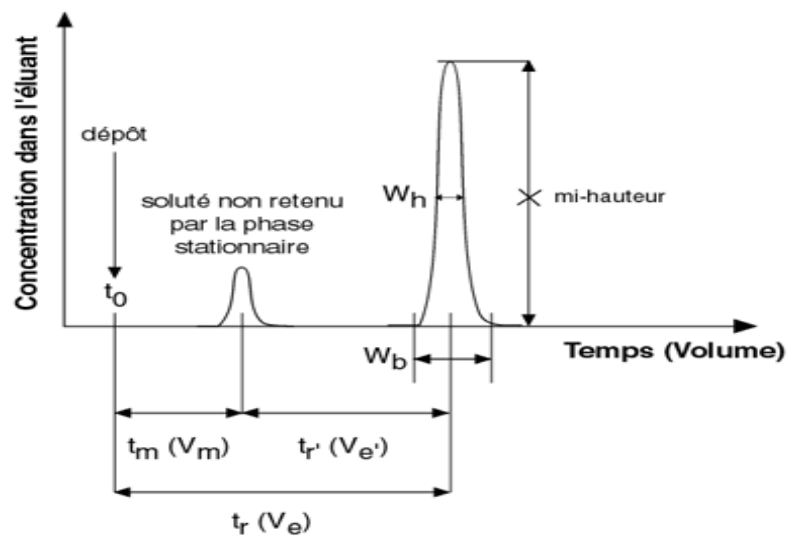
En sortie de colonne, les analytes rencontrent le détecteur, aujourd'hui généralement couplé à un enregistreur numérique du signal qui permet son traitement. Cet élément mesure en continu une grandeur proportionnelle à la quantité des différents analytes. Il en existe de nombreux modèles, dont

- Le FID (en anglais flame ionisation detector, en français détecteur à ionisation de flamme), qui est le plus utilisé. La sortie de colonne traverse une flamme maintenue à une tension d'une centaine de volts. La pyrolyse ionise les composants, provoquant l'apparition d'un courant électrique entre les électrodes, ensuite amplifié. Typiquement utilisé avec les gaz vecteurs azote, hélium et hydrogène.
- Le TCD (en anglais thermal conductivity detector, en français détecteur à conductivité thermique), ou catharomètre. La sortie de colonne arrive sur l'une des résistances d'un pont de Wheatstone ; le passage de composants fait varier la tension aux bornes du pont. Typiquement utilisé avec les gaz vecteurs hélium et hydrogène.
- Le MS (en anglais mass spectrometer, en français spectromètre de masse), généralement en mode EI (electron ionisation) ou CI (chemical ionisation), qui provoque l'ionisation des molécules organiques éluées et analyse ces ions. Ce couplage GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) permet, au-delà de la simple détection de présence d'espèces chimiques, d'avoir des informations concernant lesdits composants. Typiquement utilisé avec les gaz vecteurs azote, hélium et hydrogène.
- Performances des détecteurs
  - Catharomètre 1 à 10 ng (tous composés)
  - Détecteur à ionisation de flamme 20 à 100 pg (composés organiques)
  - Détecteur à capture d'électrons 0,1 pg (composés halogénés)

## VI.3. Grandeurs et facteurs caractérisant la séparation en HPLC et CPG

### VI.3.1. Caractéristiques de l'élution

La représentation graphique de l'élution d'un composé (figure VI.6), exprimée en concentration en fonction du temps ou en fonction du volume de l'effluent est une courbe de *distribution typiquement gaussienne*. La mesure de la concentration peut s'effectuer par la mesure de l'absorbance, la fluorescence, etc...



**Figure VI.6.** : Représentation graphique de l'élution d'un composé (chromatogramme)

Avec :

- $t_0$  : correspond au début de l'injection,
- $V_m$  : volume mort de la colonne,
- $t_m$  : temps mort,
- $V_e$  : est le volume d'élution d'un composé (aussi appelé  $V_r$  pour volume de rétention),
- $t_r$  : est le temps de rétention (ou encore d'élution  $t_e$ ) d'un composé.
- $V_e'$  : est le volume d'élution réduit,
- $t_r'$  : est le temps de rétention réduit,
- $W_b$  ( $\omega$ ): largeur du pic à la base
- $W_h$  ( $\delta$ ): largeur du pic à mi-hauteur.



Il est important de noter qu'il est possible de déterminer les volumes en fonction du débit et du temps, en effet,  $V = d.t$ , avec  $d = \text{débit}$  (ex. :  $V_e = d.t_r$ ). Dès lors dans la suite de notre discussion, on parlera indifféremment, par exemple, de temps de rétention et de volume d'élution, puisqu'à débit donné, l'un est directement proportionnel à l'autre.

Le temps de rétention  $t_r$  (le volume d'élution  $V_e$ ) est le temps (le volume) que met la substance, de l'injection jusqu'à la sortie de la colonne. Ce paramètre dépend beaucoup de l'éluant, autrement dit de la phase mobile. Ainsi, un constituant peut être beaucoup moins retenu par l'ajout d'un éluant d'une plus grande force. De plus, la rétention d'une substance dépend du choix de la phase stationnaire.

Les molécules du soluté ne passent pas tout le temps  $t_r$  dans la phase stationnaire. Elles consacrent le temps  $t_m$  à parcourir les vides et interstices de la colonne. En pratique, cette durée comporte également le temps de balayage des volumes de l'injecteur, du détecteur et des tuyaux de raccordement, volumes qu'il convient de réduire au maximum, mais qui ne peuvent être complètement éliminés. *Ce temps  $t_m$ , qui est en quelque sorte le temps de rétention d'un composé non retenu, est appelé temps mort.*

En soustrayant ce temps mort du temps de rétention, on obtient le temps de rétention relatif  $t_r'$ , appelé aussi temps de rétention réduit. *Ce temps de rétention réduit  $t_r'$  mesure le temps passé par la substance sur la phase stationnaire*, et il est donc lié au phénomène de rétention. De même, il est bien entendu possible de déterminer un volume d'élution réduit  $V_e'$  en soustrayant à au volume d'élution  $V_e$  le volume mort  $V_m$ .

$$V_e' = V_e - V_m \text{ et } t_r' = t_r - t_m$$

### VI.3.1.1. Coefficient de distribution

Soit  $K$ , le coefficient de distribution du composé entre la phase stationnaire et la phase mobile :

$$K = \frac{C_S}{C_M}$$

Avec  $C_S = \text{concentration à l'équilibre du soluté dans la phase stationnaire}$  et  $C_M = \text{concentration à l'équilibre du soluté dans la phase mobile}$ .

### VI.3.1.2. Facteur de capacité

Afin de pouvoir comparer les chromatogrammes de séparations obtenues sur des colonnes différentes, avec des conditions d'éluants différentes, on utilise une grandeur sans dimension appelée facteur de capacité, qui permet de s'affranchir des paramètres géométriques d'une colonne. Noté  $K'$ , le facteur de capacité est défini très simplement à l'aide de la relation, dans laquelle  $t_r'$  désigne le temps de rétention réduit, dont nous avons parlé plus haut et  $t_m$  le temps mort. Comme précédemment, au lieu d'utiliser le temps de rétention et le temps mort pour définir le facteur de capacité, il est possible d'utiliser le volume d'élution  $V_e$  d'un composé et le volume d'élution  $V_m$  d'une substance inerte (le solvant, par exemple).  $K'$  est alors obtenu par la relation :

$$K' = \frac{(V_e - V_m)}{V_m}$$
$$\Rightarrow K' = \frac{t_r'}{t_m}$$

Lorsque  $K' = 0$ , le composé n'est pas retenu sur la phase stationnaire. Lorsque  $K'$  est inférieur à 1 et d'une façon plus générale, pour les faibles valeurs de  $K'$ , cela signifie que les composés ne sont que très peu retenus sur la colonne. Les pics correspondants sortent très près du pic inerte.

*Le domaine optimal de séparation se situe généralement pour un  $K'$  variant de 1 à 15.* Cela correspond à un temps de rétention plus long et à un élargissement du pic.  $K'$  varie avec la force d'élution du solvant : quand elle augmente,  $K'$  diminue.

### VI.3.2. Notion de pression

A l'intérieur d'une colonne la phase mobile frotte sur les parois de la colonne mais aussi sur les particules de phase stationnaire. Ces frottements définissent la résistance à l'écoulement.

Les particules de phase stationnaire sont sphériques. Si l'on divise leur diamètre par 10, on diminue leur surface d'un facteur 100 et leur volume d'un facteur 1000. On peut donc placer dans la colonne 1000 fois plus de particules et donc augmenter de 10 fois la surface en contact avec la phase mobile. La résistance à l'écoulement est donc augmentée.

En conséquence, pour maintenir le débit constant dans la colonne il faut augmenter la pression plus la granulométrie de la phase stationnaire est faible.

En HPLC on travaille, en tête de colonne, à des pressions entre 20 et 150 bars. La perte de charge qui est la différence de pression entre l'entrée et la sortie de la colonne est donnée par la loi de Darcy :

$$\Delta P = \frac{\Phi \eta L u}{D^2}$$

$\Phi$  : (sans dimension) facteur de résistance à l'écoulement;

$D$ (m) : diamètre moyen des particules;

$\eta$  : (Pa.s) viscosité;

$L$ (m) : longueur de la colonne;

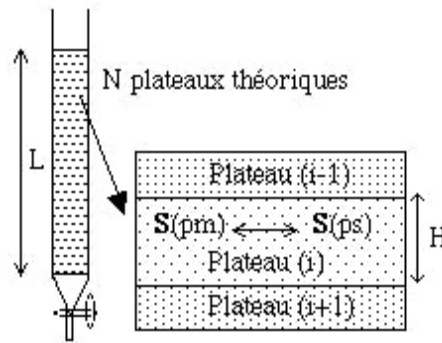
$u$ (m.s<sup>-1</sup>) : vitesse de la phase mobile.

### VI.3.3. Notion d'efficacité

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

#### VI.3.3.1. Model des plateaux théoriques

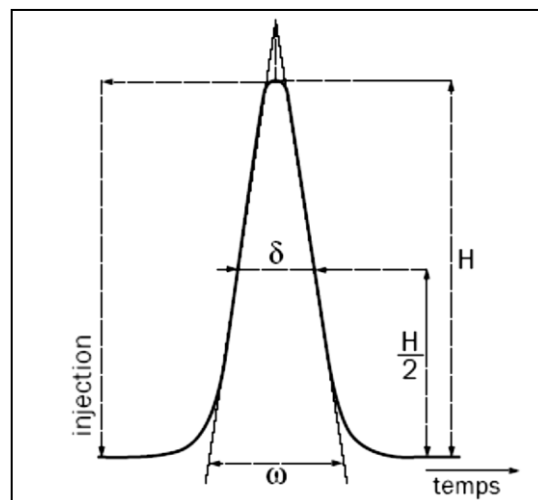
Sur le modèle de la distillation, on considère que la colonne de chromatographie est constituée par un empilement de plateaux appelés plateaux théoriques (figure VI.7). *Un plateau théorique est défini comme le plus petit volume de colonne où l'équilibre de distribution du soluté entre phases fixe et mobile est réalisé*, ou, en d'autres termes, un volume dans lequel la distribution du soluté entre les deux phases est toujours celle définie par  $K'$ .



**Figure VI.7 :** Model des plateaux théoriques

On définit  $V_h$  comme étant le volume équivalent de phase mobile dans le plateau théorique et  $N$  le nombre de plateaux théoriques dans la colonne. **Le volume d'élution  $V_e$  est alors égal à  $N.V_h$ .** On peut représenter la migration du soluté à travers la colonne, comme le déplacement dans la phase mobile (en équilibre avec la phase fixe) d'une couche très mince de soluté le long de la colonne.

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



**Figure VI.8 :** Représentation graphique d'un pic d'élution :

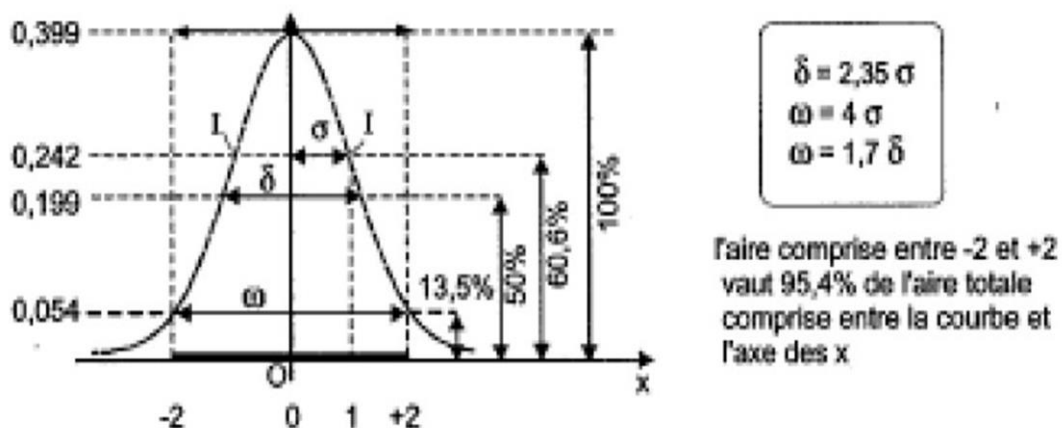
La forme du pic (figure VI.8) permet de déterminer certains paramètres tels que la largeur à mi hauteur ( $\delta$ ) ou la largeur à la base ( $\omega$ ). Ces paramètres permettent de calculer le nombre de plateaux d'une colonne, caractéristique qui reflète l'efficacité de cette colonne.

Il est possible de démontrer (mais nous le ferons pas) que  $W_b$  ( $\omega$ ), la largeur du pic à la base (Figure V.9), est égal à :

$$\omega = \frac{4 \cdot tr}{\sqrt{N}}$$

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

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



**Figure VI.9** : Caractéristique d'un pic idéale

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

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

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

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

### VI.3.3.2. Efficacité réelle (nombre de plateaux théoriques effectifs)

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

$$N_{eff} = 16 \left( \frac{tr'^2}{\omega^2} \right) = 5,54 \left( \frac{tr'^2}{\delta^2} \right)$$

### VI.3.3.3. Hauteur équivalent à un plateau théorique H

Connaissant la longueur L de la colonne et le nombre de plateaux théoriques N on définit une Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique (HEPT ou H).

$$HEPT = \frac{L}{N}$$

#### Remarque:

La HEPT permet de comparer entre elles des colonnes de différentes longueurs. Elle est fonction de différents paramètres qui eux-mêmes sont susceptibles de varier avec la vitesse de la phase mobile.

## VI.3.4. Qualité de la séparation

### VI.3.4.1. Coefficient de sélectivité ( $\alpha$ )

Pour caractériser la distance séparant les sommets de deux pics voisins on utilise le facteur de sélectivité  $\alpha$ , on a :

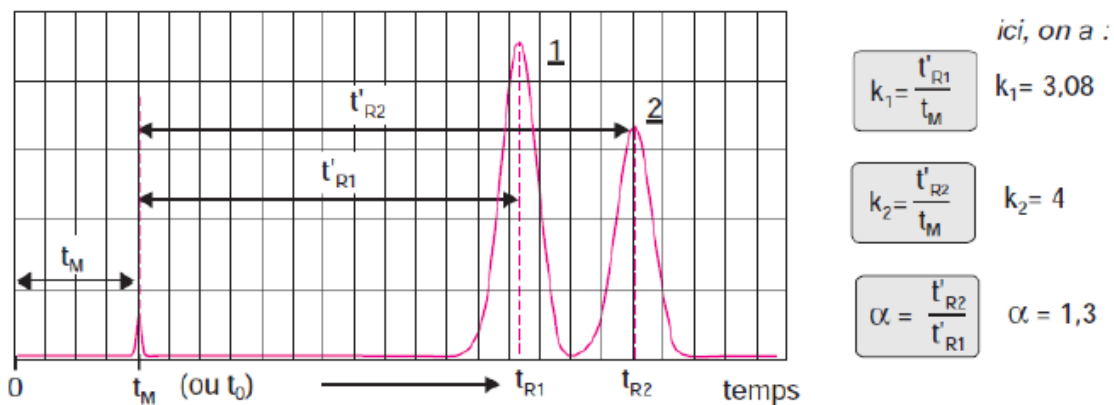
$$\alpha = \frac{V_{e2} - V_m}{V_{e1} - V_m} = \frac{t_{r2} - t_m}{t_{r1} - t_m}$$

$$\Rightarrow \alpha = \frac{t'_{r2}}{t'_{r1}} = \frac{K'_2}{K'_1}$$

### Remarque

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

La figure VI.10, résume les facteurs caractérisant deux pics adjacents



**Figure VI.10 :** Facteurs de rétention et de séparation entre deux composés adjacents

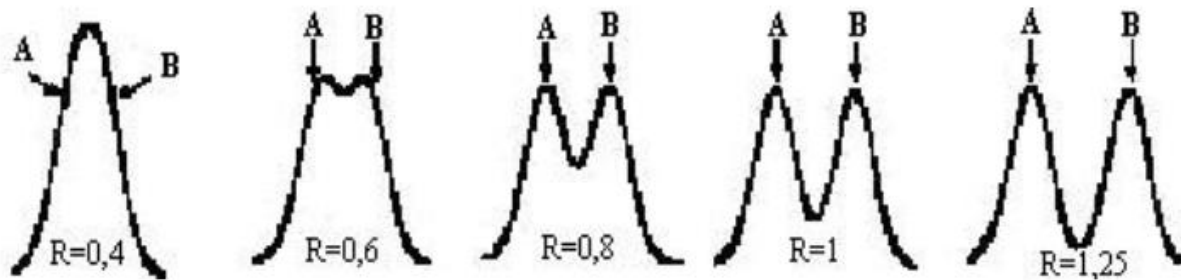
### VI.3.4.2. Coefficient de résolution (R)

Le but d'une analyse chromatographique est d'obtenir des pics séparés. En optimisant les conditions analytiques, il est possible d'améliorer l'allure du chromatogramme. Le paramètre de résolution R quantifie la qualité de cette séparation. Bien qu'on la mesure, en général, sur deux pics contigus, elle peut être calculée sur n'importe quel couple de pics.

$$\Rightarrow R = 2 \frac{tr_2 - tr_1}{\omega_1 + \omega_2}$$

La Figure VI.11 indique l'influence de valeur de R sur la séparation de deux pics d'intensité égale, et on peut dire en générale si :

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



**Figure VI.11:** Influence du terme r sur la séparation de deux pics d'intensité égale

### VI.3.5. Modèle cinétique de la chromatographie

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

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

Trois facteurs, représentés par les 3 termes, contribuent à l'élargissement des pics.

#### VI.3.5.1. Diffusion turbulente (Terme A)

Suivant la taille et la forme des particules, ils existent pour la phase mobile, plusieurs trajets possibles, cette particularité contribue à l'élargissement des pics d'où

$$A = 2L\lambda d_p$$

L : longueur de la colonne

$\lambda$ : facteur géométrique de remplissage



$d_p$  : diamètre des particules

Donc, plus les particules sont petites et plus le remplissage est homogène, plus l'efficacité de la colonne augmente.

Diffusion turbulente est appelé aussi la diffusion d'eddy, la figure VI.12 schématiser cette diffusion.

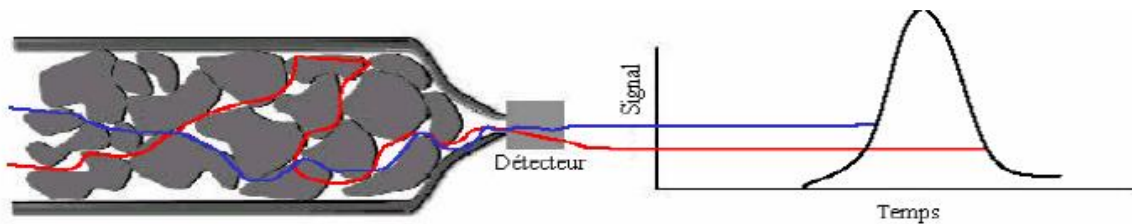


Figure VI.12 : schéma indique la diffusion d'eddy (chemins multiples)

### VI.3.5.2. Diffusion longitudinale (Terme B)

Le terme  $B/u$  traduit la dispersion du soluté à cause de la diffusion du soluté dans la colonne. Par exemple, dans un flux liquide, les molécules au centre du flux progressent plus vite que celles qui sont sur les bords au contact des particules; on a :

$$B = 2D_m L \gamma$$

Où

- $L$  est la longueur de la colonne
- $\gamma$ : facteur de tortuosité
- $D_m$  : est le coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile.

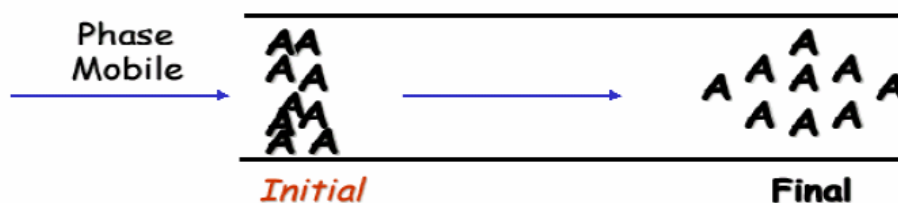


Figure VI.13 : Schéma représente la diffusion longitudinale

Le terme  $B/u$  est évidemment inversement proportionnel à  $u$ . L'efficacité d'une colonne augmente avec la vitesse de la phase mobile. Ceci peut expliquer les bonnes séparations obtenues en HPLC; de plus, comme le terme  $D_m$  est environ 5 fois plus grand en CPG qu'en CPL, il en résulte que la contribution de la diffusion longitudinale (Figure VI.13) est presque négligeable en HPLC.

### VI.3.5.3. Résistance au transfert de masse (Terme C)

Ce terme  $C^*u$  représente la résistance au transfert du soluté entre les phases mobiles et stationnaires (Figure VI.14), cette résistance empêche l'établissement de l'équilibre entre  $S(pm)$  et  $S(ps)$ . Ce phénomène est dû par exemple au fait que certaines molécules stagnent dans les pores de la phase stationnaire.

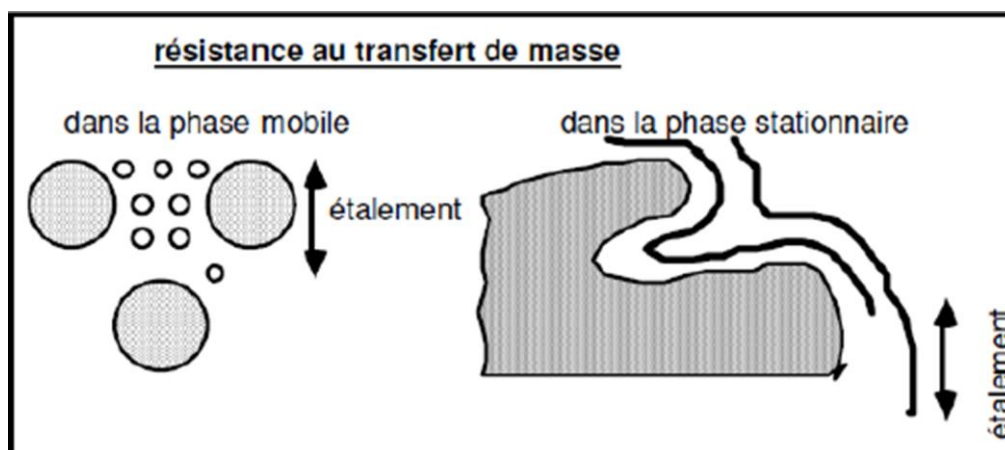


Figure VI.14 : Résistance au transfert de masse

Plus la vitesse ( $u$ ) de la phase mobile diminue, plus les molécules de soluté peuvent pénétrer dans la phase stationnaire, plus l'équilibre entre les deux phases est favorisé et plus la colonne est performante.

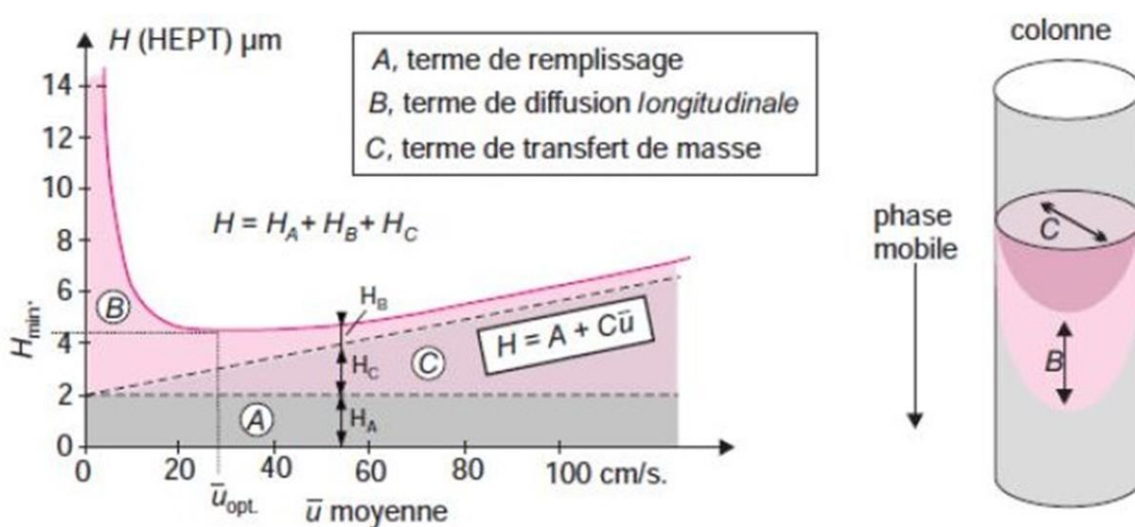
Le terme  $C$  est proportionnel à  $(d_p^2/D_m)$ , les colonnes les plus efficaces seront celles régulièrement remplies et bien tassées où le diamètre des particules est le plus faible possible. Il faut également utiliser des solvants de faible viscosité pour minimiser ce terme.

### VI.3.5.4. Courbe de Van Deemter

La représentation graphique de l'équation précédente est appelée courbe de Van Deemter (Figure VI.15). L'analyse de cette courbe montre l'existence d'un débit optimal de phase

mobile pour lequel l'efficacité de la colonne est maximum (HEPT minimum). Réduire le débit de la phase mobile en deçà de ce débit optimal peut diminuer fortement le pouvoir séparatif d'une colonne, surtout en CPG où la contribution du terme  $B/u$  est importante. Contrairement à la CPG, en HPLC au-dessus du débit optimal, l'efficacité de la colonne est pratiquement indépendante du débit de la phase mobile. Ceci permet de raccourcir les temps d'analyse, sans perdre trop de pouvoir de séparation.

Ils existent d'autres formulations de l'équation de Van Deemter plus adaptées à la HPLC



**Figure VI.15 :** Courbe de Van Deemter

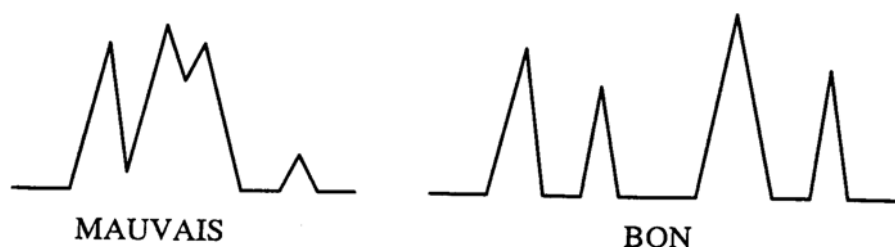
Les trois coefficients numériques expérimentaux A, B et C sont reliés à divers paramètres physico-chimiques, à la colonne et aux conditions opératoires. Si on choisit d'exprimer H en cm, A sera en cm, B en  $\text{cm}^2/\text{s}$  et C en s (la vitesse étant en  $\text{cm/s}$ ).

En conclusion l'efficacité calculée d'une chromatographie, représentée par la HEPT, est fonction de la vitesse de la phase mobile donc du débit, et de la qualité (régularité, remplissage) de la phase stationnaire.

## VI.3.6. Application de la chromatographie à l'analyse

### VI.3.6.1 Analyse des chromatogrammes

Une bonne séparation se traduira par une séparation distincte des pics correspondant à chacun des produits (Figure VI.16).



**Figure VI.16** : La différence entre la bonne et la mauvaise séparation

Un chromatogramme doit être parfaitement reproductible. La composition de la phase mobile est un paramètre particulier à la HPLC. Il faut donc préciser pour chaque analyse :

- le type de colonne : marque, nature, diamètre, longueur, support...
- la nature de l'éluant : solvant, si c'est un mélange préciser sa composition, débit, mode de détection  $\lambda$  en nm.

La quantité injectée, le début de l'injection sur le chromatogramme, la sensibilité du détecteur, etc...

### VI.3.6.2. Analyse quantitative

Cette analyse est basée sur le fait que l'aire des pics chromatographiques est proportionnelle à la concentration ou à la quantité de produit analysé.

#### VI.3.6.2.1. Méthode de l'étalonnage externe

Il est nécessaire de disposer d'une quantité suffisante du produit afin de faire une courbe d'étalonnage  $Aire = f(\text{masse ou concentration du produit})$ , pour un volume injecté constant  $V$ .

L'injection ultérieure du même volume  $V$  de l'échantillon à doser permet, à l'aide de la mesure de l'aire du pic reportée sur la courbe d'étalonnage (Figure VI.17), de connaître la

masse ou la concentration recherchée. Cette méthode est plus précise que celle qui consiste à ne faire **qu'une mesure** avec l'étalon et à utiliser une règle de trois :

$$A_e/M_e = A_{et}/m_{et}$$

A: Aire des pics e : échantillon et : étalon

m : masse du produit remplaçable par la concentration

### VI.3.6.2.2. Méthode des ajouts

Comme la précédente, cette méthode nécessite de posséder le produit à analyser pur; après avoir analysé l'échantillon, on ajoute à celui-ci des quantités connues  $\Delta m$  du produit avant de la chromatographie à nouveau (faire au minimum deux ajouts), ce qui entraîne une variation de l'aire du pic  $\Delta A$ . Si  $m$  est la masse contenue dans l'échantillon à analyser.

$$(\Delta A/\Delta m) = a/m \text{ soit } m = A^*(\Delta m/\Delta A)$$

Si le produit ajouté est en solution, il faut tenir compte des effets de dilution.

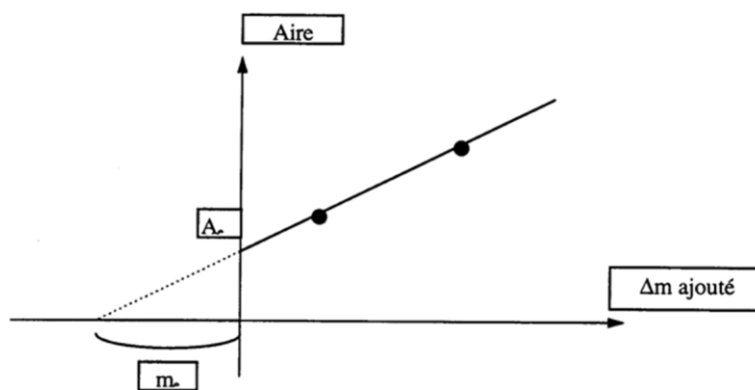


Figure VI.17 : Courbe d'étalonnage

### VI.3.7.3. Méthode de l'étalon interne (utilisée essentiellement en CPG)

On compare la réponse du ou des produits à analyser à celle d'un étalon interne, donc introduit dans le mélange à doser et convenablement choisi.

Une solution étalon est préparée avec le ou les produits que l'on veut doser. Les masses sont connues  $m'_1$ ,  $m'_2$ , et ...  $m_e$  pur l'étalon ; à ces masses correspondent les aires  $A'_1$ ,  $A'_2$ , ...,  $A'_e$ , sur le chromatogramme.

Dans l'échantillon contenant les masses  $m_1, m_2, \dots$  de solutés on ajoute  $m_e$  de l'étalon, ce qui donne les aires  $A_1, A_2, A_e$ .

On obtient :

$$m'_1 = \alpha_1 A'_1$$

$$m'_2 = \alpha_2 A'_2$$

$$m_e = \alpha_e A'_e$$

Avec  $\alpha$  coefficient de proportionnalité et  $k_1 = (\alpha_1/\alpha_e) = (m'_1 A'_e/m_e A'_1)$ .

D'où la valeur  $k_1$  puisque toutes les données sont connues. Dans l'échantillon inconnu on aura :

$$m_1 = \alpha_1 A_1$$

$$m_e = \alpha_e A_e$$

$$(m_1/m_e) = (\alpha_1 A_1 / \alpha_e A_e) = k_1(A_1/A_e) \quad m_e, k_1, A_1, A_e \text{ sont connus.}$$

## Références bibliographiques

1. A. BASLI. *Procédés de Séparation des Biomolécules*, Université Abderrahmane Mira, Bejaia , Faculté de Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Biologie Physico-chimie, [https://elearning.univ-bejaia.dz/pluginfile.php/258613/mod\\_resource/content/0/Cours\\_BASLI%20Abdelkader\\_Proc%C3%A9d%C3%A9s%20de%20S%C3%A9paration%20des%20Biomol%C3%A9cules.pdf](https://elearning.univ-bejaia.dz/pluginfile.php/258613/mod_resource/content/0/Cours_BASLI%20Abdelkader_Proc%C3%A9d%C3%A9s%20de%20S%C3%A9paration%20des%20Biomol%C3%A9cules.pdf).
2. A. DARI. *Techniques Chromatographiques*, Département de Chimie , université de Hassan II Casablanca, Maroc , A.U: 2015-2016, <http://lpagrocasa.e-monsite.com/medias/files/module-m-53.pdf>.
3. B. FOSSET, C. LEFROU, A. MASSON, C. MINGOTAUD. *Chimie physique expérimentale*. Hermann, (2000).
4. D. A. SKOOG , S. R. CROUCH , F. J. HOLLER , D. M. WEST. *Chimie Analytique*. 3<sup>ème</sup> éd., De boeck, Bruxelles, (2015).
5. E. BOGDANI. *Étude expérimentale et optimisation du procédé de lyophilisation de l'ibuprofène en mi-lieu organique. Médecine humaine et pathologie*. Université Claude Bernard - Lyon I, (2011). Français.NNT: 2011LYO10225.
6. F. ROUESSAC, A. ROUESSAC. *Analyse Chimique*. 6ème édition Masson Paris (2004).
7. G. MAHUZIER, M. HAMON. *Abrégé de chimie analytique : Méthodes de séparation*, tome 2 ; Ed. Masson, Paris, New York, Barcelone, Milan, (1978).
8. G.GUICHON, C. POMMIER. *La chromatographie en phase gazeuse*. Ed. Gauthier-Villars, (1971).
9. J.-P. BAYLE. *400 manipulations commentées de chimie organique volume 1*. Ellipses. (2006).
10. J. DROUIN. *Manipulations commentées de chimie organique*, De Boeck Université, (1999).
11. J. TRANCHANT. *Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse*. 3<sup>ème</sup> Ed. Masson ; Paris, New York, Barcelone, Milan, (1982).
12. J. SPELTZ , N. FANTINI. *Matière, corps purs et mélanges*. (2010). [http://physik.diekirch.org/5e/cours\\_5e\\_v05\\_chimie\\_physique\\_Chap1.pdf](http://physik.diekirch.org/5e/cours_5e_v05_chimie_physique_Chap1.pdf).
13. *Les méthodes de séparation*. polycopie de laboratoire de la chimie Analytique, département de pharmacie, Faculté de la médecine, Université d'Alger.

[http://univ.ency-education.com/uploads/1/3/1/0/13102001/pharm2an16\\_ch\\_anal-methodes\\_separation.pdf](http://univ.ency-education.com/uploads/1/3/1/0/13102001/pharm2an16_ch_anal-methodes_separation.pdf)

14. N. BOURFIS. *Techniques d'analyses*, <http://fsnv.univ-bouira.dz/wp-content/uploads/2020/03/L3-TAA-Techniques-danalydes-Bourfis.pdf>
15. R. E. Kirk, D. F. Othmer; J. I. Kroschwitz; M. Howe-Grant. *Encyclopedia of Chemical Technology*. 4<sup>th</sup> ed. Wiley, New York, (1991).
16. 1<sup>ère</sup> STL-SPCL Chimie et développement durable Fiche technique – Distillation, [https://spcl.ac-montpellier.fr/moodle/pluginfile.php/3364/mod\\_resource/content/8/Fiche%20distillation.pdf](https://spcl.ac-montpellier.fr/moodle/pluginfile.php/3364/mod_resource/content/8/Fiche%20distillation.pdf).

### Site internet

1. [file:///C:/Users/hp/Downloads/HPLC-Principe-et-appareillage\\_a9.pdf](file:///C:/Users/hp/Downloads/HPLC-Principe-et-appareillage_a9.pdf)
2. <http://biotech.spip.ac-rouen.fr/spip.php?article9>
3. [https://www4.ac-nancy-metz.fr/physique/liens/Jumber/pdf\\_chimie/HPLC.pdf](https://www4.ac-nancy-metz.fr/physique/liens/Jumber/pdf_chimie/HPLC.pdf),
4. <https://culturesciences.chimie.ens.fr/thematiques/chimie-analytique/chromatographie/la-chromatographie-en-phase-gazeuse-principe>.
5. <http://webphysique.fr/changement-etat/>
6. <https://www.alloprof.qc.ca/fr/eleves/bv/sciences/la-separation-des-melanges-s1049>
7. <http://culturesciences.chimie.ens.fr/print/1851?print=yes&nid=1851>
8. <http://webphysique.fr/precipitation/>
9. <https://www.pedagogie.ac-nantes.fr/physique-chimie/mutualisation/travail-collaboratif/distillations-simple-et-fractionnee-682937.kjsp>