

Ultracentrifugation

Première partie : ultracentrifugation dynamique (sédimentation)

Définition du coefficient de sédimentation s

- 1) La vitesse de rotation du rotor étant très importante, il est primordial qu'il soit équilibré statiquement et dynamiquement. Les cavités doivent être identiques et disposées régulièrement autour de l'axe pour que le centre d'inertie du rotor soit sur l'axe, et que l'axe soit un axe principal d'inertie. Pourquoi un nombre pair de cavités ? Pour des raisons techniques de fabrication ?
- 2) Un élément du solvant décrit, dans le référentiel du laboratoire, un mouvement circulaire uniforme. Son accélération a_s s'en déduit :

$$\vec{a}_s = -r\omega^2 \vec{u}_r \quad \text{et} \quad a_s = 1,4 \cdot 10^6 \text{ m.s}^{-2}$$

Elle correspond à l'accélération d'entraînement d'une particule de soluté dans le référentiel tournant, on la compare aux autres accélérations subies par la particule : $g = 9,8 \text{ m.s}^{-2}$ et $a_c = 2\omega v$. Or la vitesse d'une particule par rapport au solvant est sûrement très inférieure à celle du solvant dans le référentiel du laboratoire : $v \ll r\omega = 262 \text{ m.s}^{-1}$. On a donc bien : $a_s \gg g$ et $a_s \gg a_c$.

- 3) La statique du solvant dans le référentiel tournant fournit le gradient de pression :

$$\overrightarrow{\text{grad}} P = \rho_0 r \omega^2 \vec{u}_r$$

Et l'opposé de ce gradient, densité volumique des forces de pression, peut être considéré uniforme sur l'échelle d'une particule de soluté de volume bm . La poussée d'Archimède vaut donc :

$$\vec{\Pi} = -b m \rho_0 r \omega^2 \vec{u}_r$$

- 4) La projection selon un rayon du principe fondamental appliqué à une particule de soluté dans le référentiel tournant donne :

$$m \ddot{r} = m r \omega^2 - b m \rho_0 r \omega^2 - f \dot{r} \Rightarrow \ddot{r} = r \omega^2 (1 - b \rho_0) - \frac{f \dot{r}}{m} \quad \text{pour } \ddot{r} = 0: \quad v_{\text{lim}} = \frac{m(1 - b \rho_0) \omega^2 r}{f}$$

Les particules sont accélérées jusqu'à ce que la force de frottement compense la force motrice due à la rotation. Si $\rho_0 < 1/b$ les particules « coulent » et $v_{\text{lim}} > 0$ ($m^* > 0$), sinon elles « flottent » et $v_{\text{lim}} < 0$ ($m^* < 0$).

- 5) $[f] = \text{N.m}^{-1} \cdot \text{s} = \text{kg.s}^{-1}$ d'où $[s] = [m] / [f] = \text{s}$.
- 6) L'accélération motrice est de l'ordre de $r \omega^2 (1 - b \rho_0)$ et la vitesse à atteindre est v_{lim} ; on en déduit la durée caractéristique du régime transitoire : $t \approx v_{\text{lim}} / a \approx m / f \approx s$ si m^* est de l'ordre de m ($b \rho_0 \neq 1$). La valeur numérique du *svedberg*, unité adaptée au phénomène, montre que la vitesse limite est atteinte quasi-instantanément à l'échelle macroscopique. Cette vitesse peut d'ailleurs être estimée : $v_{\text{lim}} \approx 10^{-7} \text{ m.s}^{-1}$.

Équation de sédimentation (Lamm, 1929)

- 7) Le vecteur densité de courant convectif de particules vaut : $\vec{J}_C = c(r, t) v_{\text{lim}}(r) \vec{u}_r = s \omega^2 r c(r, t) \vec{u}_r$.
- 8) Soit N le nombre de particules de soluté dans un volume V quelconque fixe de surface S d'orientation sortante. La conservation du nombre total de particules s'écrit :

$$\frac{dN}{dt} = \frac{d}{dt} \iiint_V c(r, t) dt = - \oiint_S \vec{J} \cdot d\vec{S} \quad \text{où} \quad \vec{J} = \vec{J}_C + \vec{J}_D \quad \text{est le vecteur densité de courant total de particules.}$$

Le théorème d'Ostrogradski permet d'écrire alors :

$$\iiint_V \left(\frac{\partial c}{\partial t} + \text{div } \vec{J} \right) dt = 0 \quad \text{qui doit être valable quel que soit } V, \text{ d'où : } \frac{\partial c}{\partial t} + \text{div } \vec{J} = 0.$$

- 9) $\frac{\partial c}{\partial t} + \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(s \omega^2 c r^2 - D \frac{\partial c}{\partial r} r \right) = 0.$

Solution de l'équation de sédimentation en l'absence de diffusion

- 10) En l'absence de diffusion, $D = 0$, les particules se déplacent sous l'effet de la force centrifuge. En supposant de plus la concentration homogène dans un domaine de l'espace, l'équation de sédimentation devient :

$$\frac{\partial c}{\partial t} + 2s\omega^2 c = 0 \Rightarrow c = A \exp(-t/\tau) \text{ avec } \tau = \frac{1}{2s\omega^2}.$$

La solution proposée est bien de cette forme, par morceaux, et vérifie la condition initiale $c(r, t = 0) = c_0$, elle constitue donc une solution acceptable.

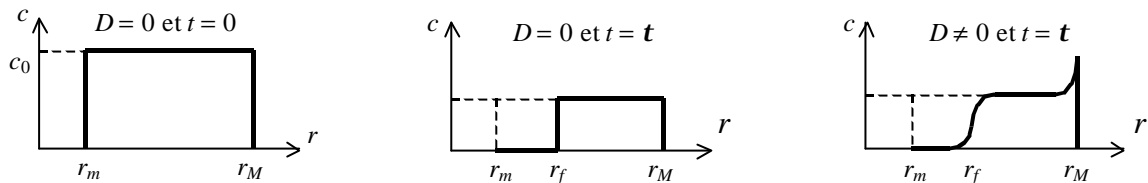
Plus précisément, la solution proposée correspond à l'approximation où les particules ont toutes leur vitesse limite dès le départ. L'équation de sédimentation peut s'écrire alors en faisant apparaître la variation de la concentration en suivant les particules :

$$\frac{Dc}{Dt} + c \operatorname{div} \vec{v}_{\text{lim}} = 0 \Rightarrow \frac{Dc}{Dt} = -2s\omega^2 c \Rightarrow c = c_0 \exp(-t/\tau)$$

On montre ainsi que la concentration reste bien homogène là où il y a des particules. Le front arrière du soluté, $r_f(t)$, se déplaçant à la vitesse limite, vérifie :

$$\dot{r}_f = v_{\text{lim}}(r_f) = r_f/2\tau \Rightarrow r_f(t) = r_m \exp(t/2\tau).$$

- 11) La durée caractéristique de la sédimentation est : $\tau = 5$ heures (due à la très faible vitesse des particules).



Négliger la diffusion est une approximation grossière en r_f , où il y aurait discontinuité de concentration, et en r_M où il y a accumulation de matière ; mais elle permet une description correcte en dehors. Par contre, l'approximation $v = v_{\text{lim}}$ est parfaitement justifiée car $s \ll \tau$.

- 12) Le profil de la concentration dans la zone de transition est gouverné par la diffusion ($D \neq 0$). La solution étant probablement transparente, une image géométrique de cette zone ne donnerait rien. Par contre, au gradient de concentration correspond un gradient d'indice. Un tel objet de phase peut être imagé en strioscopie. Autrement, en plaçant la solution devant un des deux miroirs d'un Michelson, on observerait un décalage des franges du coin d'air proportionnel à la concentration.

Relation d'Einstein (1905)

- 13) En régime stationnaire, négliger la diffusion donnerait une concentration infinie de particules en r_M . La répartition $c(r)$ résulte donc forcément d'un équilibre entre diffusion et convection.
- 14) En régime stationnaire l'équation de sédimentation donne $J = c \text{ste} = 0$ avec les conditions aux limites, d'où :

$$J(r) = s\omega^2 c r - D \frac{\partial c}{\partial r} = 0 \Rightarrow \frac{dc}{c} = \frac{r}{2D\tau} dr \Rightarrow c(r) = c(r_m) \exp\left(\frac{r^2 - r_m^2}{4D\tau}\right).$$

- 15) La probabilité de trouver une particule dans un état d'énergie E est proportionnelle au facteur de Boltzmann $\exp(-E/kT)$; ici il s'agit de la trouver à une distance r de l'axe. Dans l'énergie, il n'est pas utile de tenir compte de l'énergie cinétique car elle prend la même valeur en tout point de la cavité (intervient dans le facteur de proportionnalité). En effet, puisque la diffusion compense la convection, il n'y a plus de déplacement macroscopique en régime stationnaire, et la température étant uniforme, les distributions des vitesses microscopiques sont les mêmes en tout point. Seule l'énergie potentielle centrifuge (en tenant compte de la poussée d'Archimède) distingue les différents points de la cavité, avec la référence $Ep(r_m) = 0$:

$$Ep = -\frac{m^* \omega^2 (r^2 - r_m^2)}{2} \Rightarrow c(r) = A \exp\left(\frac{m^* \omega^2 (r^2 - r_m^2)}{2kT}\right) \Rightarrow c(r) = c(r_m) \exp\left(\frac{m^* \omega^2 (r^2 - r_m^2)}{2kT}\right)$$

- 16) On en déduit, par identification, la relation d'Einstein pour une diffusion dans un champ de force extérieur :

$$4D\tau = \frac{2kT}{m^* \omega^2} \Rightarrow D = \frac{kT}{f}.$$

Seconde partie : ultracentrifugation d'équilibre

Le seul soluté est le chlorure de Césium

17) Pour un volume V de solution :

$$d = \frac{m_{\text{solution}}}{m_{\text{eau}}} = \frac{m_{\text{CsCl}} + m_{\text{eau}}}{r_0 V} = \frac{V c_0 M + r_0 (V - \mathbf{b}_{\text{CsCl}} V c_0 M)}{r_0 V} \Rightarrow \mathbf{b}_{\text{CsCl}} = \frac{1}{r_0} - \frac{d-1}{M c_0} = 3,6 \cdot 10^{-4} \text{ m}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$$

18) La détermination de la constante s'effectue par normalisation, connaissant le nombre total de particules présentes initialement dans une cavité de taille angulaire \mathbf{a} , et en supposant s constant :

$$\int_{r_m}^{r_M} c_{\text{CsCl}}(r) \cdot \mathbf{a} r dr = c_0 \mathbf{a} \frac{r_M^2 - r_m^2}{2} \Rightarrow E = c_0 \frac{\frac{\mathbf{w}^2 s}{2D} (r_M^2 - r_m^2)}{\exp\left(\frac{\mathbf{w}^2 s}{2D} (r_M^2 - r_m^2)\right)}$$

Le volume massique $\mathbf{b}(r)$ doit maintenant être calculé localement. En considérant un volume dV :

$$\mathbf{b}(r) = \frac{dV}{\mathbf{d}m_{\text{CsCl}} + \mathbf{d}m_{\text{eau}}} = \frac{dV}{c(r)M dV + r_0 (dV - \mathbf{b}_{\text{CsCl}} c(r)M dV)} = \frac{1}{r_0 [1 + (d-1)c(r)/c_0]}$$

Et finalement, avec la valeur de E : $\mathbf{b}(r) = \frac{1}{r_0 \left[1 + (d-1) \frac{\mathbf{w}^2 s}{2D} (r_M^2 - r_m^2) \exp\left(\frac{\mathbf{w}^2 s}{2D} (r^2 + r_m^2 - r_M^2)\right) \right]}$.

Ajout à la solution de chlorure de Césium d'une petite quantité de soluté à analyser

19) Les macromolécules subissent la force centrifuge et la poussée d'Archimède. Si ces deux forces se compensent en un point, les macromolécules se concentrent dans cette région d'équilibre, à la diffusion près. Puisqu'en régime permanent la vitesse des macromolécules s'écrit :

$$v_{\text{limmacro}} = \frac{\mathbf{w}^2 r}{f} m_{\text{macro}} \left(1 - \frac{\mathbf{b}_{\text{macro}}}{\mathbf{b}(r)} \right),$$

ceci est le cas pour $m_{\text{macro}}^* = 0$, c'est à dire pour $\mathbf{b}_{\text{macro}} = 1 / r_{\text{solution}} = \mathbf{b}(r_0)$, réalisé si $\mathbf{b}(r_M) < \mathbf{b}_{\text{macro}} < \mathbf{b}(r_m)$.

20) La diffusion particulière étale la distribution des macromolécules autour de la valeur r_0 d'équilibre. Un développement limité au premier ordre de $\mathbf{b}(r)$ autour de r_0 donne :

$$\mathbf{b}(r) = \mathbf{b}_{\text{macro}} + (r - r_0) \frac{d\mathbf{b}}{dr}(r_0) = \frac{1}{\mathbf{r}(r)}$$

Par ailleurs, en régime stationnaire :

$$J_{\text{macro}} = v_{\text{limmacro}} c_{\text{macro}} - D \frac{\partial c_{\text{macro}}}{\partial r} = 0 \Rightarrow \frac{dc_{\text{macro}}}{c_{\text{macro}}} = \frac{\mathbf{w}^2}{D} s_{\text{macro}}(r) r dr = \frac{\mathbf{w}^2 m_{\text{macro}}}{Df} (1 - \mathbf{r}(r) \mathbf{b}_{\text{macro}}) r dr$$

En utilisant l'expression de $\mathbf{b}(r)$ et la relation d'Einstein, un calcul au premier ordre autour de r_0 donne :

$$\frac{dc_{\text{macro}}}{c_{\text{macro}}} = \frac{\mathbf{w}^2 m_{\text{macro}}}{kT} \frac{d\mathbf{b}}{dr}(r_0) \frac{(r - r_0) r_0}{\mathbf{b}(r_0)} dr = - \frac{\mathbf{w}^2 m_{\text{macro}}}{kT} \left| \frac{d\mathbf{b}}{dr}(r_0) \right| \frac{(r - r_0) r_0}{\mathbf{b}_{\text{macro}}} dr \text{ car } \mathbf{b}(r) \text{ est décroissante.}$$

$$c_{\text{macro}}(r) = c_{\text{macro}}(r_0) \exp\left[-\frac{(r - r_0)^2}{2\mathbf{s}^2}\right] \text{ avec } \mathbf{s} = \sqrt{\frac{kT \mathbf{b}_{\text{macro}}}{\mathbf{w}^2 m_{\text{macro}} r_0} \left| \frac{d\mathbf{b}}{dr}(r_0) \right|^{-1}}$$

21) En ultracentrifugation d'équilibre, les macromolécules se concentrent autour d'une position d'équilibre fonction de leur volume massique $\mathbf{b}_{\text{macro}}$. La largeur de cette distribution, \mathbf{s} , dépend par contre également de la masse moléculaire m_{macro} .

Deux substituants isotopiques se distribueront donc autour de la même position d'équilibre. Ils ne pourront être séparés que si leurs masses molaires sont suffisamment différentes, l'une des deux distributions sera alors plus étalée ; un prélèvement central ou dans la queue de la distribution permettra alors de récupérer l'un ou l'autre de façon majoritaire.

Dans le cas où les volumes massiques sont différents, la séparation est plus aisée. En effet, les distributions sont disjointes, et la séparation est quasi parfaite si les deux distributions ne se recouvrent pas. Il faut pour cela que l'écart entre les deux positions d'équilibre soit supérieur aux largeurs \mathbf{s} des deux distributions.

FIN