

Université de M'sila

Faculté des sciences

Département SNV

Intitulé du master : Biotechnologie végétale

Semestre : 01

Intitulé de l'UE : UE Méthodologie 1

Intitulé de matière : Techniques de valorisation des ressources végétales

Crédits : 4

Coefficients : 2

Enseignante : SAOUDI Ouarda

E-mail: ouarda.saoudi@univ-m'sila.dz

Objectifs de l'enseignement :

- Acquisition des connaissances nécessaires à la maîtrise des techniques de séparation , d'extraction et d'analyse des substances naturelles.

Références

- Chimie des substances odorantes (Teisseire) – Edition Lavoisier Tec et Doc
- Génie industriel alimentaire, Les procédés physiques de conservation, Ed. Lavoisier
- Génie industriel alimentaire tome 2 : Techniques séparatives, Edition Lavoisier Tec et Doc
- Identification spectrométrique de composés organiques, Ed. De Boeck Université
- La chimie analytique : mesure et société, Ed. Lavoisier Tec et Doc
- Le génie chimique à l'usage des chimistes, Edition Lavoisier Tec et Doc
- Biologie Cellulaire Et Moléculaire (Eduardo D. P, Robertis, E. M. F. De Robertis – 1983),
- Biologie moléculaire de la cellule(Harvey Lodish, Arnold Berk, Paul Matsudaira – 2005)
- Principes des techniques de biologie moléculaire (Denis Tagu – 1999)

Evaluation des informations précédentes

Cochez-la ou les bonne(s) réponse(s) :

1- C'est une phase solide ou liquide qui est maintenue en place :

- La phase stationnaire
- La phase mobile
- L'éluion

COURS1

Techniques séparatives des molécules (Chromatographie)

Généralité sur la chromatographie

I.1.1 DEFINITION

La chromatographie est une technique dans laquelle les constituants d'un mélange se séparent en fonction des vitesses auxquelles ils sont entraînés à travers une phase stationnaire (reste en place soit dans une colonne soit sur une surface plane) par une phase mobile (se déplace sur ou à travers la phase stationnaire, en entraînant avec elle le mélange d'analytes) gazeuse ou liquide.

I.1.2 HISTORIQUE

- 1903 : mise en évidence par Mikhail TSWETT, botaniste russe
- 1931 (KUHN et LEDERER) : chromatographie sur colonne (chromatographie liquide solide CLS).
- 1938 (IZMAILOV et SCRAIBER) : chromatographie sur couche mince (CCM ou TLC), TAYLOR et UREY : chromatographie par échange d'ions.
- 1941 (MARTIN et SYNGE, Nobel en 1952) : concept de chromatographie gaz-liquide, chromatographie de partage liquide-liquide .
- 1952 : développement pratique de la chromatographie gaz-liquide.
- 1955 : 1er chromatographe gaz-liquide sur le marché (chromatographie en phase gazeuse : CPG ou GC).
- 1965 (HALASZ, HORVATH) : Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP ou HPLC).

I.1.3 TERMES TECHNIQUES PROPRES à LA CHROMATOGRAPHIE

➤ ELUTION

L'élution est un processus au cours duquel des solutés sont entraînés à travers une phase stationnaire par le mouvement d'une phase mobile (Fig.1). La phase mobile qui sort de la colonne est appelée l'éluant.

➤ ELUANT

Un éluant est un solvant utilisé pour entraîner les constituants d'un mélange à travers une phase stationnaire.

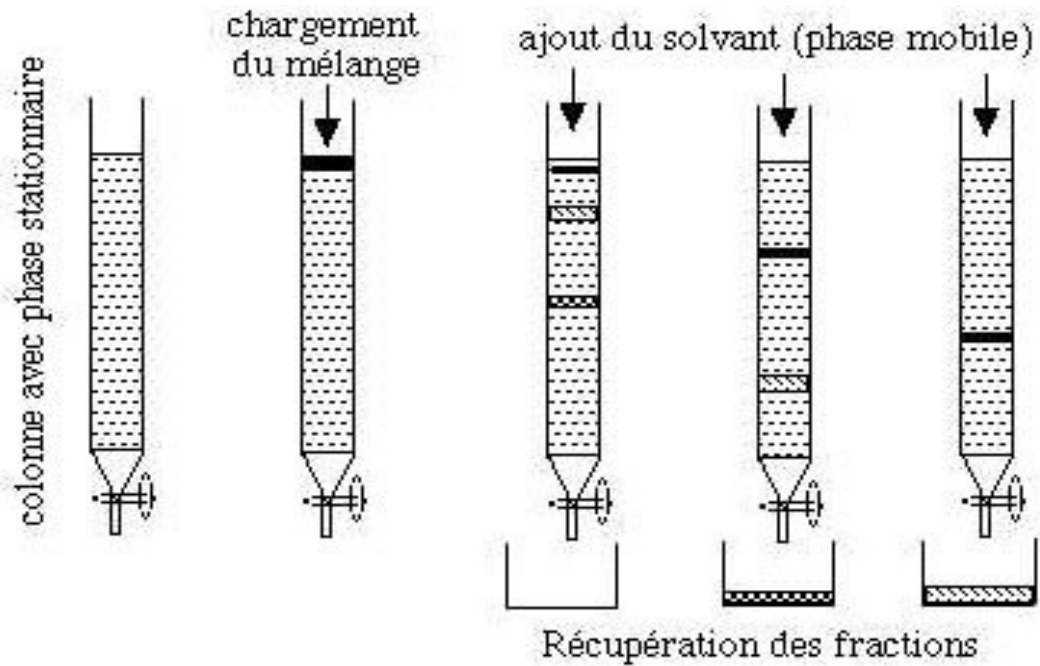


Figure.1. La séparation d'un mélange des constituants A et B par chromatographie d'éluion sur colonne.

➤ CHROMATOGRAMME

Un chromatogramme est un graphique d'une fonction de la concentration en soluté en fonction du temps d'éluion ou du volume d'éluion.

I.1.4 CLASSIFICATION DES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

Les méthodes chromatographiques sont de deux types.

- En chromatographie planaire, la phase stationnaire est supportée par une plaque ou dans les pores d'une feuille de papier, et la phase mobile se déplace à travers la phase stationnaire par capillarité ou sous l'effet de la gravité.
- En chromatographie sur colonne, la phase stationnaire est maintenue dans un tube étroit et la phase mobile y progresse par gravité ou sous pression.

Les méthodes chromatographiques se classent en trois catégories selon la nature de la phase mobile (Tableau.1) :

- Liquide
- Gazeuse
- Fluide supercritique.

Tableau.1. Classification des méthodes chromatographiques sur colonne.

Classification générale	Méthode spécifique	Phase stationnaire	Type d'équilibre
1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	a. Gaz - liquide (CGL)	Liquide adsorbé sur ou lié à une surface solide.	Partage entre gaz et liquide.
	b. Gaz - solide (CGS)	Solide.	Adsorption.
2. Chromatographie en phase liquide (CPL)	a. Liquide - liquide (CLL) ou partage	Liquide adsorbé sur ou lié à une surface solide Solide.	Partage entre liquides non miscibles.
	b. Liquide - solide (CLS) ou adsorption	Résine échangeuse d'ions.	Adsorption.
	c. Echange d'ions	Liquide dans les interstices d'un solide polymérique.	Echange d'ions.
	d. Liquide - gel (CLG) ou perméation	Liquide spécifique à un groupe lié chimiquement à une surface solide.	Partage / tamisage.
	e. Affinité		Partage entre liquide et surface greffée.
3. Chromatographie en fluide supercritique (CFS) (phase mobile : fluide supercritique)		Espèce organique liée à une surface solide.	Partage entre fluide supercritique et surface greffée.

I.1.5 GRANDEURS CHROMATOGRAPHIQUES

- **Le rapport de distribution**, ou coefficient de distribution, d'un soluté est égal au rapport de sa concentration molaire dans la phase stationnaire à sa concentration molaire dans la phase mobile

$$K=C_s/C_M$$

- **Le temps mort (t_m)** est le temps nécessaire pour qu'une espèce non retenue traverse une colonne chromatographique. Tous les constituants passent au moins ce temps dans la phase mobile. Les séparations sont basées sur les différences de temps t_s que les composants passent dans la phase stationnaire.

- **Le temps de rétention t_R** est le temps qui s'écoule entre l'injection de l'échantillon et l'apparition d'un pic de soluté sur le détecteur d'une colonne chromatographique

$$t_R=t_s+t_m$$

- **Le facteur de rétention k_A** d'un soluté A est lié à sa vitesse de progression dans une colonne. C'est le rapport entre le temps que le soluté passe dans la phase stationnaire et le temps qu'il passe dans la phase mobile.

$$k_A=t_s/t_m$$

- **Le facteur de séparation α** pour des solutés A et B est défini par le rapport du coefficient de distribution de l'espèce qui est la plus retenue (B) sur le coefficient de distribution de l'espèce qui est la moins retenue (A)

$$\alpha=((t_R)_B-t_m)/((t_R)_A-t_m)$$

Question de cours

Définissez :

- **Le temps de rétention t_R :**
- **Le temps mort (t_m) :**
- **Elution :**

TP1 «préparation d'une solution»

I. Préparation d'une solution mère par dissolution d'un solide(NaOH et SDS):

- 1) Calculer la masse nécessaire pour préparer 100ml (1mol /L)
- 2) Choisir la fiole jaugée dont le volume convient
- 3) Verser un peu d'eau distillée dans la fiole jaugée (*ainsi on versera l'espèce chimique dans l'eau et non l'eau sur l'espèce chimique, ce qui permet d'éviter des projections dangereuses, en particulier quand on manipule des acides*).
- 4) Peser la quantité de solide nécessaire :
 - a) Allumer la balance et la régler si nécessaire sur « gramme »
 - b) Utiliser une capsule propre et sèche
 - c) La poser sur le plateau de la balance
 - d) Faire la tare, c-à-d remettre à « zéro »
 - e) À l'aide d'une spatule, verser la quantité nécessaire de solide dans la capsule.
- 3) Placer l'entonnoir sur la fiole et verser le solide dans la fiole
- 4) Rincer la capsule et l'entonnoir avec un peu d'eau distillée, et la rajouter à celle déjà versée dans la fiole jaugée (*cela permet de ne pas perdre de soluté*),
- 5) Ajouter de l'eau distillée jusqu'au $\frac{3}{4}$ environ de la fiole
- 6) Boucher la fiole avec un bouchon et bien mélanger en la retournant à plusieurs reprises (*on le fait avant d'ajuster le trait de jauge car on constate en effet que lorsque la poudre se dissout, le volume diminue légèrement et le niveau descend*) ; **il ne doit plus rester de grains visibles**
- 7) Ajuster le niveau au trait de jauge en ajoutant de l'eau avec précaution, à la pissette puis à la pipette simple
- 8) Mélanger bien une dernière fois (*la concentration en soluté doit être homogène*).

II. Préparation d'une solution à partir d'un liquide(HCl et H₂SO₄):

- 1) Calculer le volume nécessaire pour préparer 100ml (1mol /L)
- 2) Prélever la quantité nécessaire de liquide :
 - a) Transvaser d'abord environ 20 mL du liquide dans un bécher propre et sec (*il ne faut jamais prélever un liquide directement dans le flacon dans lequel il est fourni, on risque de polluer la totalité du flacon si la pipette est sale*)
 - b) Choisir la pipette du volume qui convient.
 - c) Adapter le pipetteur en haut de la pipette jaugée.
 - d) Placer la pipette bien verticale au-dessus du bécher et faire monter un peu de liquide dans celle-ci ; le faire circuler dans la pipette pour la rincer puis le jeter dans le récipient étiqueté « poubelle » (*cela s'appelle la « mise en milieu » et cela permet d'éliminer l'eau ou les autres produits qui pourraient se trouver encore dans la pipette*)
 - e) Placer la pipette bien verticale au-dessus du bécher et faire monter le liquide dans la pipette jusqu'au trait de jauge supérieur ; pour cela, vous tiendrez la pipette d'une main, le bécher de l'autre et vous élèverez l'ensemble de façon à avoir le trait de jauge à hauteur de vos yeux.
- 4) Transvaser le liquide dans la fiole : placer la pipette bien verticale au-dessus de la fiole jaugée et faire descendre le liquide dans la fiole jusqu'au trait de jauge inférieur. Le liquide qui reste dans la pipette sous le trait de jauge inférieur est jeté (si la pipette n'a pas de trait de jauge inférieur, il faut la vider complètement dans la fiole).
- 5) Finir de remplir la fiole jaugée avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge comme déjà décrit
- 6) Bien mélanger.