

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

Que savez-vous de la chromatographie par échange d'ions et d'exclusion.

COURS 4

I.4. LA CHROMATOGRAPHIE PAR ECHANGE D'IONS :

Cette technique de la chromatographie est orientée vers la séparation des ions et des composés polaires. Pour cela on utilise des colonnes contenant des phases stationnaires comportant des sites ioniques pour qu'il se crée des interactions dipolaires avec les analytes à séparer. Plus grande est la charge portée par un soluté, plus ce dernier est retenu par la phase stationnaires. Ce processus d'échange est lent. Comparé à ceux qui régissent les autres types de chromatographie. Pour les composés organiques, il se superpose au mécanisme précédant les effets déjà décrits en CLHP avec les colonnes à polarité inversée.

Parmi les composés séparables en CI on trouve les mono ou polysaccharide, les nucléosides et nucléotides, les acides carboxyliques les anions et cations organiques ou minéraux divers (métaux de transition, terres rares)

Les appareils sont constitués de modules identiques à ceux déjà rencontrés en CLHP. Les parties au contact de la phase mobile doivent être en matériaux inertes compte tenu de l'agressivité des solutions aqueuses acides ou basiques qui servent d'éluant.

La progression et la séparation des composés de l'échantillon reposent sur des phénomènes d'échanges ioniques. On distingue deux situations :

- 1- si on cherche à séparer des espèces cationiques (type M^+), on choisit une colonne, appelée *cationique*, dont la phase stationnaire comporte des sites aptes à échanger les cations.
- 2- si on cherche à séparer des anions (type A^-) en choisie une colonne dite *anionique*. Celle-ci est obtenue par exemple à partir d'un polymère comportant des groupements ammonium.

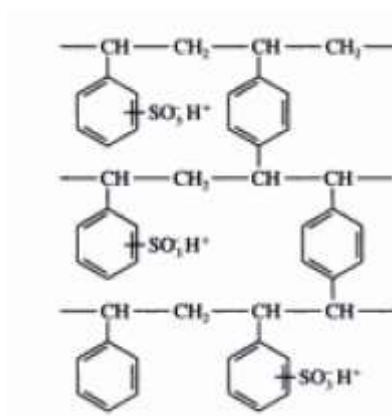
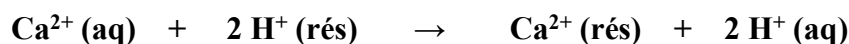


Figure 1: structure d'une résine échangeuse d'ion en polystyrène réticulé.

I.4.1. Les équilibres d'échange d'ions :

On peut traiter les équilibres d'échange d'ions par la loi d'action de masse. Ainsi, lorsqu'une solution diluée d'ions calcium est mise en contact avec une résine acide sulfonique, on observe l'équilibre suivant :



I.4.2. Application des résines échangeuses d'ions à la chromatographie :

En chromatographie par échange d'ion, les ions d'analyte sont introduits au sommet d'une colonne remplis d'une résine adéquate. L'élution est ensuite effectuée à l'aide d'une solution qui contient un ion qui a une plus grande affinité que les ions d'analyse vis-à-vis des groupements chargés de la résine. Par exemple, des anions tels que le chlorure, le thiocyanate, Le sulfate et le phosphate peuvent être séparés sur une résine échangeuse d'anions conditions sous sa forme OH^- .

Dans ce cas particulier, l'échantillon est d'abord introduit en tête de colonne, où les anions sont retenus



On effectue ensuite l'élution avec une solution diluée de base qui favorise la réaction inverse et libère les anions provoquant la séparation en cours d'élution.

Un des aspects positifs de la chromatographie par échange d'ions est qu'elle couple très aisément avec les mesures de conductivité afin de détecter et de déterminer la concentration des éluants. La chromatographie par échange d'ions avec détection conductimètres des ioniques, a été décrite pour la première fois en 1975 et est devenue actuellement une méthode très employée pour la détermination quantitative de diverses espèces chargées inorganiques.

Deux types de chromatographies basées sur les résines échangeuses d'ions sont couramment utilisés : la chromatographie ionique avec neutralisation et celle à colonne unique. Elles diffèrent par la technique mise en œuvre pour empêcher que la conductivité de l'électrolyte éluant ne complique la mesure de la conductivité des analyses.

I.4.3. Chromatographie ionique avec neutralisation :

Les détecteurs de conductivité possèdent un grand nombre des propriétés qui caractérisent le détecteur idéal. Ils peuvent être très sensibles, leur réponse aux espèces chargées est universelle et, en général, ils répondent de manière prévisible à la variation de concentration. De plus, le maniement de

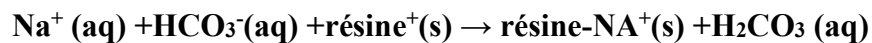
ces détecteurs est simple, ils sont peu coûteux à construire et à entretenir, faciles à miniaturiser et ils peuvent fonctionner longtemps et de manière fiable. La seule limitation à leur utilisation, qui a retardé leur application générale chromatographie ionique jusqu'au milieu des années 1970, est due aux concentrations élevées en électrolyte requises pour pouvoir mener l'élution en un temps raisonnable. La conductivité des constituants de la phase mobile masque ainsi celle des ions d'analyte, ce qui réduit considérablement la sensibilité du détecteur.

Ce problème a été résolu en 1975 par l'introduction d'une colonne de neutralisation de l'éluant placée à la sortie de la colonne échangeuse d'ions. Cette colonne de neutralisation est remplie d'une deuxième résine échangeuse d'ions qui transforme les ions de l'éluant en une espèce moléculaire peu dissociée, sans toutefois modifier la conductivité due aux ions d'analyte. Si par exemple, on choisit l'acide chlorhydrique comme éluant pour séparer et doser des cations, la colonne de neutralisation sera une résine échangeuse d'anions mise sous forme hydroxyde. Le produit de la réaction entre l'éluant et la colonne de neutralisation est de l'eau :



Les cations d'analyse ne sont évidemment pas retenus par les groupements cationiques de cette deuxième colonne.

Pour la séparation des anions, la colonne de neutralisation est une résine échangeuse de cations mise sous forme acide et l'éluant sera du carbonate ou de l'hydrogénocarbonates. La réaction dans la colonne de neutralisation s'écrit alors



L'acide carbonique, très peu dissocié, ne contribue pratiquement pas à la conductivité.

Un inconvénient des anciennes colonnes de neutralisation résultait de la nécessité de les régénérer périodiquement (en général, toutes les 8 à 10 heures) afin d'en rétablir le support sous sa forme acide ou basique initiale. On dispose maintenant depuis peu de systèmes à micro membranes qui opèrent en continu. S'il faut extraire du carbonate ou de l'hydrogénocarbonate de sodium, on fait passer l'éluant sur une série de membranes échangeuses de cations ultraminces qui le séparent d'une solution acide de régénération qui s'écoule à contre-courant. Les ions Na^+ de l'éluant s'échangent avec les ions H^+ à la surface interne de la membrane et diffusent ensuite vers l'autre surface où ils s'échangent avec les ions H^+ de la solution acide de régénération. Les ions H^+ de cette solution migrent dans le sens opposé afin de maintenir l'électro neutralité.

Les figures suivantes montrent des applications de la chromatographie ionique utilisant une colonne de neutralisation et un détecteur conductimétrique.

Dans les deux cas, la concentration des ions est de l'ordre de la ppm ; le volume d'échantillon est de 50µl dans l'autre. Cette méthode est particulièrement importante pour l'analyse des anions, car il n'en existe aucune autre assez rapide et commode qui puisse traiter ce type de mélange.

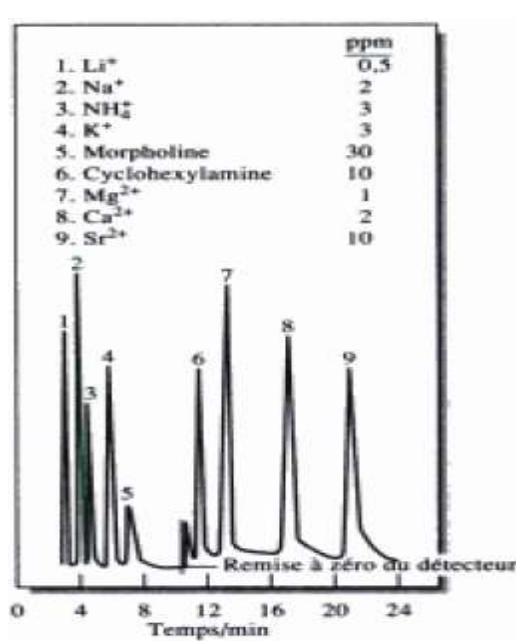


Figure 2: chromatographie ionique d'un mélange de cations (Document de Dionex, Sunnyvale, CA)

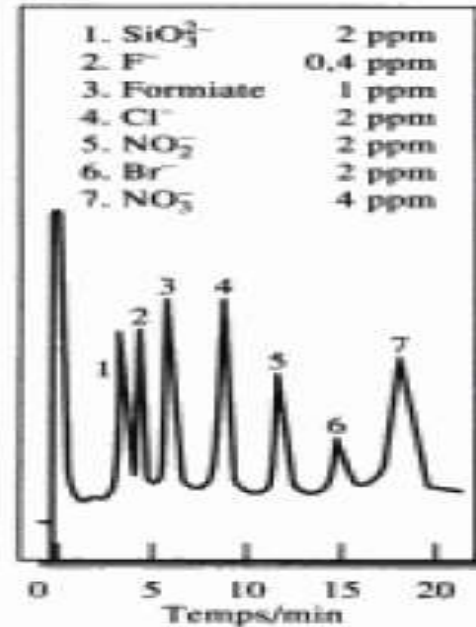


Figure 3: chromatographie ionique d'anion (Document de Dionex, Sunnyvale, CA)

I.4.4. La chromatographie ionique à colonne :

On a mis récemment sur le marché des appareils de chromatographie ionique dans lesquels on n'utilise pas de colonne de neutralisation. Leur fonctionnement est basé sur la mesure des petites différences de conductivité qui existent entre les ions élués et les ions prépondérants de l'éluant. Pour amplifier ces différences, on utilise des échangeurs à faible capacité, ce qui permet d'opérer avec des solutions dilués d'éluant. De plus, on choisit des éluants qui ont une faible conductivité équivalente.

La Chromatographie ionique à colonne unique offre l'avantage de ne pas nécessiter d'équipement spécial d'est neutralisation. Toutefois, dans le cas du dosage des anions, **cette** méthode est moins sensible que celle utilisant une colonne neutralisation.

Le détecteur idéal doit présenter les caractéristique suivants sensibilité appropriée (en général, les sensibilités des détecteurs actuels sont comprises entre 10^{-8} et 10^{-15} g/s); bonne stabilité et bonne reproductibilité ; réponse linéaire qui s'étende sur plusieurs puissances de dix ; domaine de température de fonctionnement compris entre la température ambiante et au moins 400°C : temps de réponse rapide qui soit indépendant de la vitesse d'écoulement ; grande fiabilité et facilité d'emploi (dans la mesure du possible, le détecteur doit être à l'épreuve des maladroites d'opérateurs inexpérimentés) ; réponse uniforme à tous les solutés ou, au contraire, réponse sélective limitée à une ou plusieurs classes de solutés et préservation de l'intégrité de l'échantillon Il est inutile de dire qu'aucun détecteur ne remplit à la fois toutes ces conditions, et qui' il est peu probable qu' on puisse jamais en concevoir un.

I.5. La Chromatographie d'exclusion :

La Chromatographie d'exclusion, ou la Chromatographie sur gel, est la plus récente des méthodes de chromatographie liquide. C'est une technique puissante qui est surtant utilisée pour les espèces de masse molaire élevée.

Les molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et sont donc éluées les premières, au niveau du volume mort (V_m ou V_0). Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car induites dans le gel, leur migration est freinée Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse de leurs masses moléculaires comme l'illustre la figure suivante.

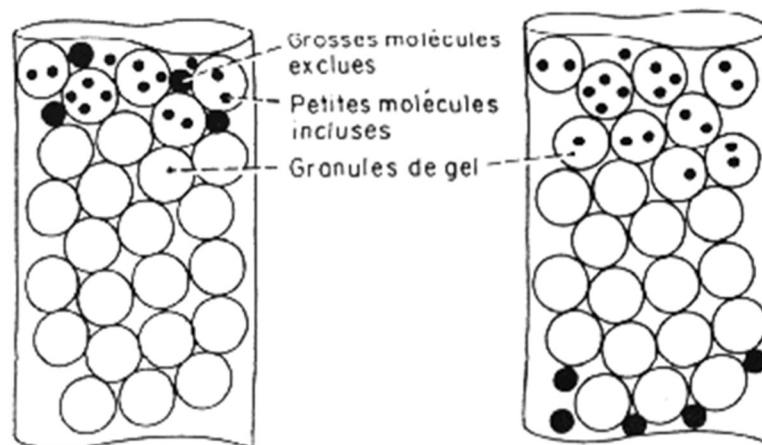


Figure 4 : la chromatographie d'exclusion

I.5.1. Les Supports :

Les Supports pour la chromatographie d'exclusion sont constitués de petites ($10\mu\text{m}$) Particules de silice ou de polymère contenant un réseau de chenaux de pores uniformes dans lesquels les molécules de soluté et de solvant peuvent diffuser. Lorsqu'elles s'aventurent dans les pores, les molécules sont littéralement piégées et extraites de la phase mobile. Le temps moyen de séjour des molécules d'analyte dans la colonne dépend de leur taille relative. Les molécules qui sont nettement plus grandes que taille moyenne des pores du support en sont exclues et ne sont donc pas retenues ; elles progressent dans la colonne pratiquement à la vitesse de la phase mobile. Les molécules qui sont nettement plus petites que les pores peuvent pénétrer dans leur labyrinthe et y rester piégées très longtemps, elles seront les dernières à être éluées. Entre ces deux extrêmes, se situent les molécules de taille intermédiaire dont le taux de pénétration dans les pores de la spore port dépend de leur diamètre. Le fractionnement de ce groupe dépend directement de la diversité des tailles et, dans une certaine mesure, de la forme. Notez que les séparations par exclusion diffèrent considérablement des autres méthodes chromatographiques, car elles ne font intervenir aucune interaction physique ou chimique entre l'analyse et la phase stationnaire. En fait, on essaie d'éviter ces interactions parce qu'elles réduiraient l'efficacité de la colonne.

Il existe de nombreux matériaux utilisables dans les colonnes d'exclusion. Les matériaux hydrophiles sont utilisés si la phase mobile est aqueuse, tandis que les hydrophobes s'emploient avec des solvants organiques non polaires. La chromatographie basée sur les supports hydrophiles est parfois appelée filtration de gel alors que pour techniques basée sur des supports hydrophobes, on parle de perméation de gel. Dans les deux cas, on dispose d'une large gamme de diamètres de pores. Un support donné permet habituellement de couvrir un domaine de masses molaires qui s'étend sur 2 à 2.5 puissances de dix. les masse molaires moyennes pour un support donné peuvent aller de quelques centaines à plusieurs millions .

I.5.2. Applications :

Les figures suivantes illustrent quelques applications de la chromatographie d'exclusion.

Dans le premier cas, on a utilisé un support hydrophile qui exclut les masses molaires supérieures à 1000. Le deuxième chromatogramme a été obtenu sur un support hydrophobe, avec le tétrahydrofurane comme éluant. L'échantillon est une résine époxy commerciale dont le monomère a une masse molaire de 280 (n étant le nombre d'unités de monomère).

Une autre application importante de la chromatographie d'exclusion est la détermination rapide des masses molaires, ou la distribution de masse molaire de hauts polymères ou de produits naturels.

Dans ce cas, on compare les volumes d'élution de l'échantillon avec les volumes d'élution d'une série de composés étalons qui ont des propriétés chimiques similaires.

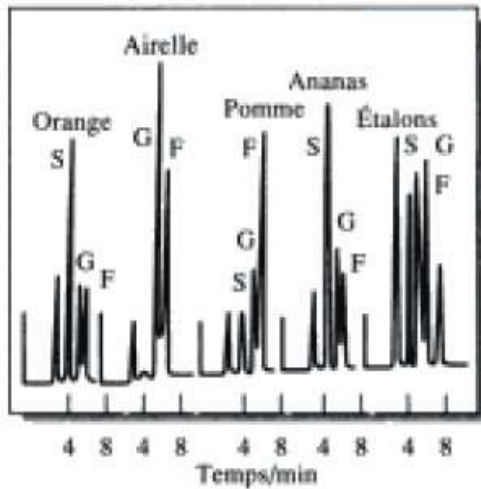


Figure 5 : Chromatogramme par filtration gel du glucose(G), du fructose(F) et de sucrose (S) présents dans des jus en boîte

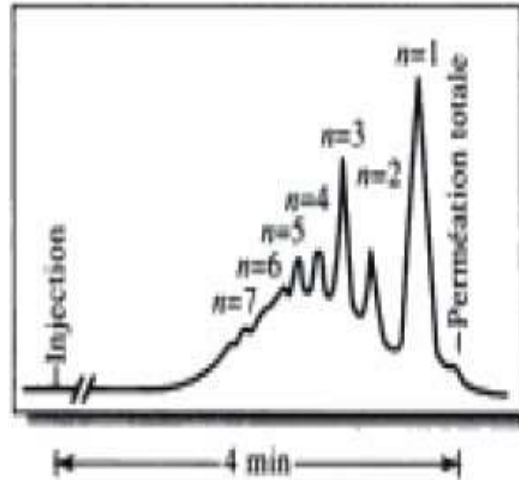


Figure 6 : Séparation par perméation de gel de constituants d'une résine époxy.

Plutôt que dans ses pores. Puisque C_{70} et les fullerènes d'ordre supérieur ont de plus grandes aires que C_{60} , ces molécules sont mieux retenues à la surface du gel et s'éluent donc après C_{60} . Le recours à l'automatisation a permis préparer en 24 h plusieurs grammes de C_{60} pur à 99,8% à partir de 5 à 10g d'un mélange de C_{60} et C_{70} . De telles quantités de C_{60} facilitent

L'étude de la chimie et de la physique de dérivés de cette forme exceptionnelle du carbone.

À titre d'exemple, C_{60} forme avec les métaux alcalins des composés stœchiométriques qui ont la formule globale M_3C_{60} , où M est le potassium le rubidium ou le césium. Des chercheurs ont trouvé que ces composés sont supraconducteurs à des températures inférieures à 30 K. Dans le futur, de mettre au point des supraconducteurs à haute température, ce qui pourrait révolutionner les industries électrique, électronique et des télécommunications et préserver les grandes quantités d'énergie actuellement dissipées par effets de Joule.

Question de cours :

Quelle est la différence entre la chromatographie par échange d'ions et d'exclusion.

TP2 « Chromatographie sur couche mince des pigments chlorophylliens »

Principe :

La chromatographie permet la séparation des constituants d'un mélange à analyser lors de leur cheminement sur un support appelé phase fixe ou adsorbant. Ces constituants sont entraînés par une phase mobile, appelée éluant, qui migre dans le support fixe. Cette migration constitue l'élution. Les constituants du mélange à analyser ont une affinité différente pour la phase fixe et la phase mobile, ils migrent donc à une vitesse différente et sont ainsi séparés.

Mode opératoire :

- Découper finement les feuilles de tomate dans un mortier contenant 1 pincée de sable et quelques mL d'éthanol dénaturé.
- Broyer à l'aide du pilon jusqu'à obtention d'un liquide vert dense.
- Mélanger 90 mL de cyclohexane et 10 mL d'acétone.
- Placer l'éluant dans le tube à essais, sur une hauteur de 1 cm
- Tracer un trait fin au crayon à papier à 1,5 cm d'une extrémité d'une bandelette de papier à chromatographie.
- Déposer au centre du trait 6 à 10 gouttes de solution alcoolique de pigments, veiller à déposer des gouttes fines et laisser sécher entre le dépôt de chaque goutte.
- La trace finale ne doit pas excéder un diamètre de 3 mm.
- L'introduire dans la cuve disposée sous la hotte (l'éluant ne doit pas recouvrir le dépôt).
- Laisser migrer, attendre que le front de l'éluant soit à 10 mm de la partie supérieure de la bande de papier à chromatographie. Arrêter la manipulation, sortir la bande de papier de l'éprouvette et sécher. (environ ½ heure dans l'obscurité ou entourer la cuve de papier noir).
- Indiquer le nombre et la couleur des pigments auxquels est due la coloration verte des feuilles.