

Méthodes Modernes d'Analyses et de Dosage

CUM

Dr. BELDI Hakima

Dr. BELDI Hakima

Centre Universitaire
Abdelhafid BOUSSOUF –
MILA-

Département de
Biotechnologie Végétale

Email : *h.beldi@centre-univ-
mila.dz*

3.7

Mai 2024

Table des matières

I - Objectifs spécifique de deuxième chapitre	4
II - Connaissances préalables recommandées	5
III - Chapitre II : Méthodes Chromatographiques	6
1. Exercice : avez vous maîtriser les techniques chromatographiques	6
2. Définition	6
3. Exercice : avez vous compris le principe de la chromatographie ?	7
4. Principe	7
5. Exercice : j'ai commencer à apprendre le principe de séparation en chromatographie ?	7
6. Classification des techniques chromatographiques	7
7. Exercice : avez vous apprenez les types de chromatographie ?	8
8. Choix de la technique	8
9. Exercice : Avez-vous appris à choisir la technique appropriée ?	8
10. Chromatographie En Phase Liquide (CPL)	9
10.1. Définition	9
10.2. Exercice : Avez-vous appris les types la CPL?	9
10.3. Chromatographie de Partage (CP) (Liquide/Liquide)	10
10.4. Chromatographie d'Adsorption (Liquide/Solide)	13
11. Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)	20
11.1. Exercice : avez vous maîtrisez la CPG ?	20
11.2. Principe	20
11.3. Exercice : j'ai commencer à maîtriser la CPG ?	20
11.4. Appareillage	20
11.5. Exercice : avez vous apprenez la CPG ?	21
12. Test final de deuxième chapitre	22
12.1. Exercice : avez vous compris la CPG ?	22
12.2. Exercice : avez vous compris la CCM ?	22
12.3. Exercice : toujours avec la CPG	22
12.4. Exercice : la chromatographie	22
12.5. Exercice : CPG	23
13. TEST DE SORTIE DE COUR	24

13.1. Exercice	24
13.2. Exercice	24
13.3. Exercice	24
13.4. Exercice	24
13.5. Exercice	24
13.6. Exercice	24
13.7. Exercice	24
13.8. fin de test	

Solutions des exercices	25
Glossaire	31
Abréviations	32
Références	33
Webographie	34
Crédits des ressources	35

I Objectifs spécifique de deuxième chapitre

- **Définir** le principe de la chromatographie (CPL et CPG),
- **Expliquer** le mode de fonctionnement des différents éléments du chromatographe,
- **Donner** les paramètres et les facteurs clés de la séparation,
- **Montrer** les facteurs qui influent sur la qualité de la séparation,
- **Appliquer** l'une des méthodes chromatographique.

II Connaissances préalables recommandées

Avoir des notions de base en chimie et en physique.

III Chapitre II : Méthodes Chromatographiques

La chromatographie, procédé d'analyse immédiate, sert à **séparer** des constituants d'un échantillon. Elle est utilisée en analyse pour **quantifier** et **identifier** des molécules dans un mélange. Le principe de base de tout système chromatographique est la répartition ou la distribution des composés d'un échantillon (analyte^{*}) entre deux phases non miscibles. L'une de ces phases, appelée **phase stationnaire immobile** (solide ou liquide), est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support, l'autre appelée **phase mobile** (liquide, gaz ou fluide supercritique) est en contact étroit avec la première.

*

1. Exercice : avez vous maîtriser les techniques chromatographiques [solution n°1 p.25]

Que signifie le mot chromatographie ?

2. Définition

La chromatographie est une technique permettant de séparer les constituants d'un mélange homogène en les faisant migrer, sur une phase immobile (Phase stationnaire), par une phase liquide ou gazeuse (Phase mobile).

*

⊕ Complément

C'est également une méthode analytique qui a pour but d'**identifier** et de **quantifier** les composés d'un mélange liquide ou gazeux. Nous avons à retenir avant tout que : **Chromatographie = Séparation**

*

3. Exercice : avez vous compris le principe de la chromatographie ? [solution n°2 p.25]

la séparation des composés en chromatographie est basé sur :

- Différences d'affinité
- La taille
- La densité

4. Principe

Elle est basée sur les différentes affinités d'un (des) composé(s) à l'égard de deux phases (stationnaire et mobile). Le principe repose sur **la migration différentielle** des divers solutés contenus dans un échantillon analysé. L'échantillon est **entraîné** par **la phase mobile** au travers de **la phase stationnaire** qui a tendance à **retenir** plus ou moins les composés de l'échantillon à l'aide d'interactions comme **les forces de Van der Waals** ou **les liaisons hydrogène**.

*

pour voir la vidéo cliquer *ici*

5. Exercice : j'ai commencer à apprendre le principe de séparation en chromatographie ?

[solution n°3 p.25]

parmi les forces intervenant dans la séparation des analytes en chromatographie on trouve :

- Forces électrostatiques
- liaisons d'Hydrogène

6. Classification des techniques chromatographiques

Il existe de très nombreux types de chromatographie en fonction de trois modalités différentes :

- ***Selon la nature physique des phases (mobile et stationnaire).***
- ***Selon la nature des interactions entre ces phases et les molécules à purifier (le phénomène mis en œuvre).***
- ***Selon le procédé opératoire (type du support qui porte la phase stationnaire)***

Exercice : avez vous apprenez les types de chromatographie ?

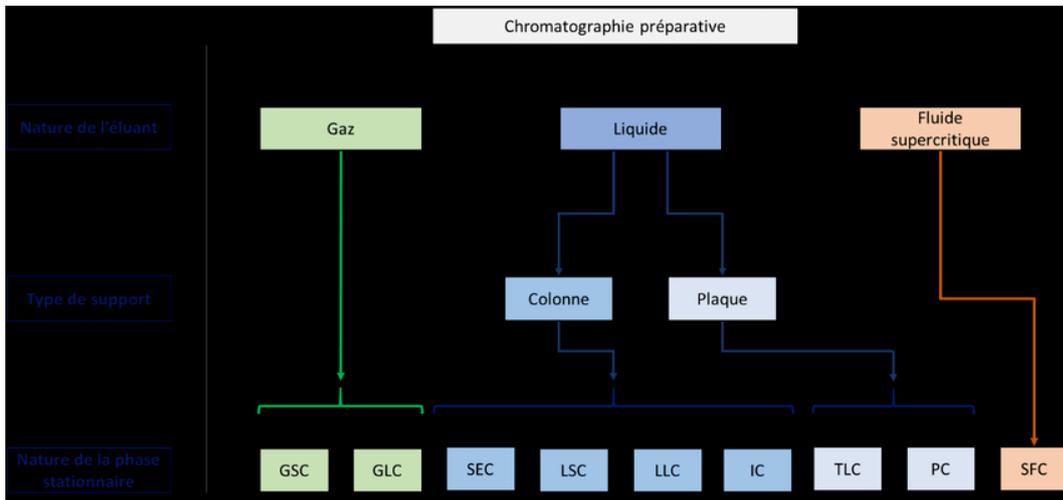


Figure 1. Schéma présentant les différentes techniques chromatographique.

7. Exercice : avez vous apprenez les types de chromatographie ?

[solution n°4 p.25]

La chromatographie se divise en plusieurs types selon

- La nature des phases
- Natures des molécules
- L'appareil utilisé

8. Choix de la technique

Les différentes techniques sont complémentaires plutôt que concurrentes. Le choix de l'une ou l'autre dépend :

- De la nature du soluté à séparer : Gaz, liquide volatil, liquide peu volatil, solide, macromolécule, espèce organique, polaire, ionique,...
- Du but de l'analyse : Identification de composants d'un mélange, nécessité ou non de "coupler" la chromatographie avec une méthode spectroscopique ou avec la spectrométrie de masse (GC/MS*), contrôle de pureté, purification de produits (colonnes préparatives), suivi de réaction en continu pour optimiser des paramètres, dosages (quantification).

9. Exercice : Avez-vous appris à choisir la technique appropriée ?

[solution n°5 p.25]

le choix de la technique chromatographique est basé sur :

- Le but de l'analyse
- la nature du soluté à séparer

10. Chromatographie En Phase Liquide (CPL)

10.1. Définition

La chromatographie liquide est un type de chromatographie, très répandu de séparation des molécules d'un d'échantillon (soluté). Cet échantillon est dilué dans un solvant que l'on appelle la phase mobile. La séparation a lieu sur la base des interactions moléculaires entre ses propres molécules et la phase stationnaire (substrat).

*

Chromatographie en phase liquide		
Liquide-Liquide	Liquide-Solide	
C. De partage	CCM	D'Affinité

Tableau 1. Méthodes de séparation en chromatographie en phase liquide.

10.2. Exercice : Avez-vous appris les types la CPL?

[solution n°6 p.26]

citez les types de chromatographie en phase liquide ?

10.3. Chromatographie de Partage (CP) (Liquide/Liquide)

10.3.1. Définition

La chromatographie de partage appelée aussi chromatographie sur papier, est une chromatographie liquide-liquide qui permet de **séparer et d'identifier** les espèces chimiques d'un mélange. Elle fonctionne par **partage de solutés entre deux phases liquides non miscibles** ; l'une mobile et l'autre stationnaire

*

Remarque

Actuellement, malgré l'apparition de la CCM* et la HPLC*, la CP conserve toute sa valeur pour séparer des substances très polaires (acides aminés, glucides et les composés polyfonctionnels).

*

10.3.2. Exercice : avez vous maîtriser la CP ?

[solution n°7 p.26]

La chromatographie de partage permet de :

- Quantifier les composants d'un échantillon
- Identifier les composants d'un échantillon

10.3.3. Principe

L'échantillon, mis en solution, est déposé en un point repère du papier filtre wattman humidifié (phase stationnaire), et le solvant qui se déplace par capillarité* (phase mobile) fait migrer les composants de l'échantillon à des vitesses variables selon leur solubilité (chromatographie ascendante) (la technique ressemble à celle de la CCM). Une fois le passage du solvant terminé, on va recueillir la feuille de papier ou chromatogramme, on va la sécher et on va la révéler. On va donc faire apparaître les différentes molécules qui ont été séparées sous forme de tache à l'aide d'un procédé approprié

*

pour voir la vidéo cliquer *ici*

Complément

On appelle **rapport frontal**, R_f^* (ou « référence front », « coefficient de migration »), le rapport Distance parcourue par le soluté / Distance parcourue par le solvant

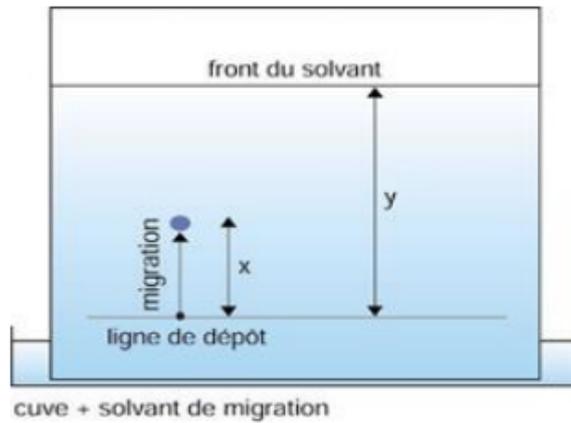


Figure 2. Schéma montrant comment calculer le rapport frontal d'une substance

🗨 **Conseil**

Un soluté très soluble dans la phase fixe aura un **Rf faible**, alors qu'un soluté très soluble dans la phase mobile aura un **Rf élevé** et proche de 1. ($0 < Rf < 1$).

10.3.4. Exercice : avez vous apprenez le principe de la CP ?

[solution n°8 p.26]

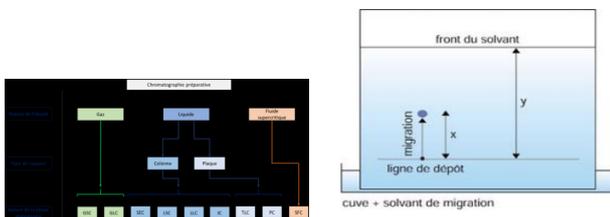
Quel est le principe de la chromatographie de partage ?

10.3.5. Appareillage

Elle se compose :

- **des analytes** (l'échantillon)
- **d'une phase stationnaire** (un liquide fixé sur un support inerte : papier filtre wattman, papier cellulosique, gel de silice).
- **d'une phase mobile** (l'éluant) (solvant ou un mélange des solvants)

Galerie 01



10.3.6. Exercice : avez vous apprenez tous qui concerne la CP ?

[solution n°9 p.26]

Citez les composants d'une chromatographie de partage?

10.3.7. Types de chromatographie de partage

Selon la polarité de la phase stationnaire et mobile on peut distinguer :

a) Chromatographie de partage sur phase normale

La phase stationnaire est **polaire**, de nature **hydrophile**, avec des groupements : amine : NH₂, nitrile : CN, dialcool : (CHOH) CH₂OH, greffés sur la silice. La phase mobile est un solvant **apolaire**, de nature **lipophile**, l'hexane ou l'éther isopropylique (CH₃)₂CHOCH(CH₃)₂. En chromatographie à phase normale, le constituant le moins polaire est élué le premier.

*

Rappel

« Si le soluté est **hydrophile**, alors la phase stationnaire sera **hydrophile*** et la phase mobile hydrophobe* ⇒ **Partage dit en phase normale** »

*

b) Chromatographie de partage sur phase inversée (RP)

La phase stationnaire, est constituée souvent d'un hydrocarbure qui est **apolaire**, de nature lipophile avec des chaînes alkyles de C₄ à C₃₀. La phase mobile est un solvant **polaire**, tel l'eau et le méthanol. Dans ces systèmes, le solvant le plus polaire (l'eau) est le moins éluant et la force éluante* de la phase mobile est augmentée par ajout d'un solvant organique (méthanol, acétonitrile), le constituant le plus polaire est élué le premier

*

Rappel

« Si le soluté est **hydrophobe**, alors la phase stationnaire sera **hydrophobe** et la phase mobile hydrophile ⇒ **(RP)*** **Partage dit en phase inverse** »

*

10.3.8. Exercice : avez vous maîtriser les types de la CP ?

[solution n° 10 p.26]

Dans la chromatographie de partage il existe deux types :

- Chromatographie de partage sur phase normale.
- Chromatographie de partage en phase inverser.

10.4. Chromatographie d'Adsorption (Liquide/Solide)

10.4.1. Définition et Principe

L'adsorption est un phénomène physico-chimique qui consiste en **la fixation** d'une substance à **l'état liquide** sur une **surface solide**. Ce phénomène fait intervenir des **forces complexes** entre **le soluté et l'adsorbant** : **forces électrostatiques, forces de liaison d'hydrogène et autre**. Chacun des solutés est soumis à **une force de rétention** (par adsorption) et à **une force d'entraînement** par la phase mobile. L'équilibre qui en résulte aboutit à une migration différentielle des solutés de l'échantillon à analyser, ce qui permet leur séparation.

*

pour voir la vidéo cliquer *ici*

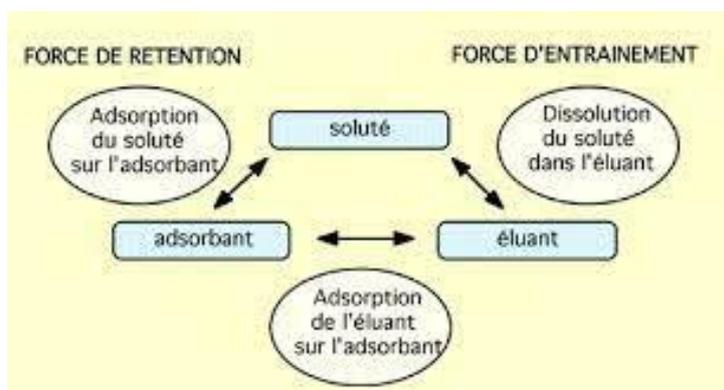


Figure 3. Interactions entre le soluté, l'adsorbant et l'éluant

10.4.2. Exercice : avez vous apprenez la notion des forces d'entraînement et de rétention ? question n° 11 p.26
une force de rétention :

- Force exercer par la phase stationnaire
- Force exercer par la phase mobile

10.4.3. Élément de la chromatographie d'adsorption

Elle se compose des phases suivantes :

a) Adsorbant (Phase stationnaire)

Il doit être poreux, finement broyé et réduit en particule de faible diamètre. Il existe plusieurs types d'adsorbants comme la cellulose, l'alumine et la silice (SiO₂).

*

b) Solvants (Eluant = phase mobile)

Il doit être inerte vis-à-vis la molécule adsorbée et l'adsorbant. Dans chaque système chromatographique, on choisit le solvant de fixation et celui d'élution en fonction de la nature des molécules à séparer (la polarité).

*

⚠ Attention

Lorsque l'adsorbant est **apolaire**, le solvant de fixation doit être le **plus polaire** possible. L'éluant est débutée avec un solvant **polaire** puis poursuivie avec des solvants de **plus en plus moins polaires** jusqu'au solvant **apolaire**.

*

10.4.4. Exercice : avez vous apprenez la notion de l'éluant ?

[solution n° 12 p.26]

une phase mobile c'est :

- Un Éluant
- Un Adsorbant

10.4.5. Chromatographie d'Adsorption sur Couche Mince (CCM)

Est une technique de Chromatographie **Planaire**. Repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille d'aluminium. La Chromatographie sur Couche Mince (CCM^{*}) est l'une des chromatographies les plus faciles à mettre en œuvre. Elle est utilisée en général dans un but analytique qualitatif.

*

pour voir la vidéo cliquer *ici*

a) Les principaux éléments d'une CCM

- **La cuve chromatographique** : un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle.*
- **La phase stationnaire** : une couche d'environ 0,25 mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant est fixée sur une plaque de verre.*
- **L'échantillon** : environ un microlitre (1µl) de solution diluée (2 à 5 %) de l'échantillon à analyser, déposé en un point repère situé au-dessus de la surface de l'éluant.*
- **L'éluant^{*} (phase mobile)** : un solvant unique ou un mélange : il migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon.*

pour voir la vidéo cliquer *ici*

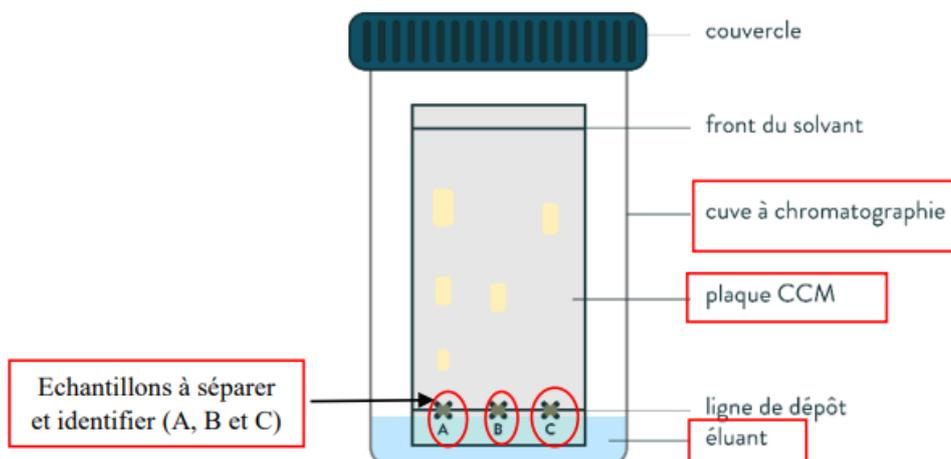


Figure 4. Les éléments d'une CCM.

b) Réalisation d'une CCM

i Activation de la plaque CCM

Avant chromatographie, il faut chauffer la plaque 30min à 100°C afin d'éliminer l'eau qui forme des liaisons avec la silice, dont le but est de renforcer le pouvoir adsorbant.

*

ii Dépôt de l'échantillon

L'échantillon est dissout dans un solvant volatil, peu polaire (les plus utilisés sont le MeOH et le chloroforme) et qui n'est pas forcément le même que l'éluant. Il doit être appliqué sur la plaque CCM avec un soin extrême soit manuellement via un tube capillaire, soit avec une micropipette ou une micro-seringue en verre calibrée de telle sorte que la goutte émergente touche juste la surface de la plaque (juste un point). On peut effectuer plusieurs dépôts successifs du même analyte* au même point pour le concentrer, mais chaque dépôt doit être séché avant l'application d'un autre

*

iii Développement de la plaque

La plaque préparée est introduite en position verticale dans la cuve et l'éluant qui en recouvre le fond (à une profondeur de 0,5 à 1 cm) monte par capillarité, entraînant à des vitesses différentes les constituants à séparer. Lorsque le niveau atteint par le solvant est d'environ 1 cm de l'extrémité supérieure (front de l'éluant), la plaque est retirée de la cuve. Le niveau atteint par le solvant est marqué par un trait fin, puis la plaque est séchée à l'air libre ou à l'aide d'un séchoir.

*

iv Révélation et analyse des spots

Lorsque les composants de l'échantillon à analyser sont colorés, leur séparation est facilement observable sur la plaque ; dans le cas contraire (spots incolores) on doit rendre les taches visibles par un procédé de révélation (physique ou chimique). Les méthodes usuelles de révélation sont les suivantes :

*

- Révélation à l'œil nu : si la tâche est colorée.*
- Révélation UV* (cas des échantillons incolores)*

🗨️ Conseil

Dans tous les cas, il faut noter les positions des taches colorées juste à la fin de la chromatographie en les cerclant car certains produits disparaissent avec le temps.

c) Application

La chromatographie est donc une technique qui permet :

- Vérifier qu'une substance est pure.*
- Analyser un mélange.*
- Reconnaître les constituants d'un mélange par comparaison du R_f **

10.4.6. Exercice : avez vous maîtriser la CCM ?

[solution n° 13 p.27]

La chromatographie sur couche mince renseigne sur :

- la composition quantitative d'un mélange
- la composition qualitative d'un mélange

10.4.7. Chromatographie d'Affinité (CAff)

C'est une méthode de séparation dont l'objectif principal est de séparer les molécules selon leur **capacité à se lier à un ligand*** (un effecteur) spécifique fixé sur un support macromoléculaire chimiquement inerte (la résine) directement ou indirectement à l'aide d'un bras fixateur (espaceur). Cet effecteur présente une **affinité biologique** (bioaffinité) pour un soluté de l'échantillon à analyser (affinité : **Enzyme-Substrat, Hormone-Récepteur, Antigène-Anticorps, Sucre-Lectine et Metal-Metalloproteine**).

*

pour voir la vidéo cliquer *ici*

⊕ Complément

Cette technique est basée sur les **interactions** entre **un effecteur**, lié par covalence à un support inerte qui constitue la phase stationnaire (fixe), et **son partenaire d'affinité** en solution (molécule à purifier)

*

a) Principe

La phase stationnaire de la chromatographie d'affinité (CAff*) consiste en un support (par exemple des billes de cellulose) auquel le ligand a été attaché de manière covalente, exposant les groupes réactifs nécessaires à la liaison enzymatique. Lorsque le mélange de protéines est passé à travers la colonne de chromatographie, les protéines qui contiennent un site de liaison pour le substrat immobilisé (ligand) se lieront à la phase stationnaire, tandis que toutes les autres protéines seront éluées dans le volume vide de la colonne.

*

pour voir la vidéo cliquer *ici*

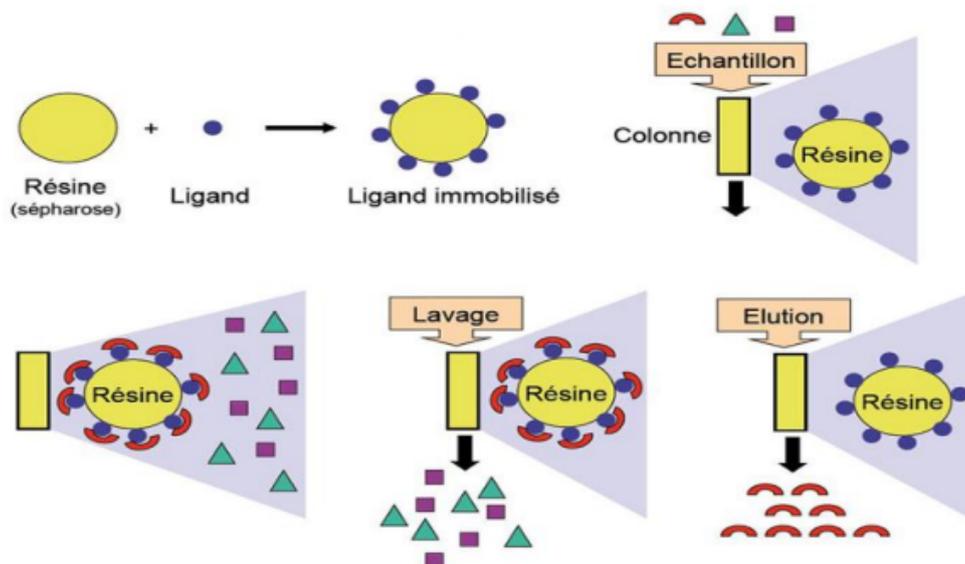


Figure 5. Principe de séparation de la chromatographie d'affinité

💡 Fondamental

Une fois que toutes les autres protéines liées ont été éluées, la ou les enzymes fixées peuvent être éluées de différentes manières :

*

- En augmentant la force ionique du tampon, comme avec un gradient de chlorure de sodium, affaiblissant ainsi les interactions entre l'enzyme et le substrat immobilisé ; *
- En modifiant le pH* du tampon ; *
- Et en ajoutant une forte concentration de substrat (ou un analogue de substrat) au tampon d'éluion, de sorte qu'il y ait compétition entre le substrat libre et immobilisé pour la protéine enzymatique *

b) Les Étapes d'une chromatographie d'affinité

Elle comporte généralement trois étapes :

i Étape de Fixation

La première étape consiste à fixer un ligand* biospécifique par liaison covalente à un support sans perdre son affinité pour le produit à analyser. Le mélange de molécules contenant le composé à purifier est chargé sur la colonne d'affinité. Seule la molécule présentant une affinité pour la colonne sera retenue par l'effecteur greffé sur la phase stationnaire.

*

ii Étape de Purification (de Lavage)

En continuant à faire passer du tampon dans la colonne, toutes les molécules qui ne sont pas fixées sur le ligand (les contaminants) sont éliminées et éluées.

*

iii Étape d'éluion

La molécule fixée (adsorbée) est finalement décrochée de la colonne et recueillie, on modifiant certains paramètres de la phase mobile tels que : le pH*, la force ionique (gradient NaCl) ou par l'ajout d'un compétiteur.

*

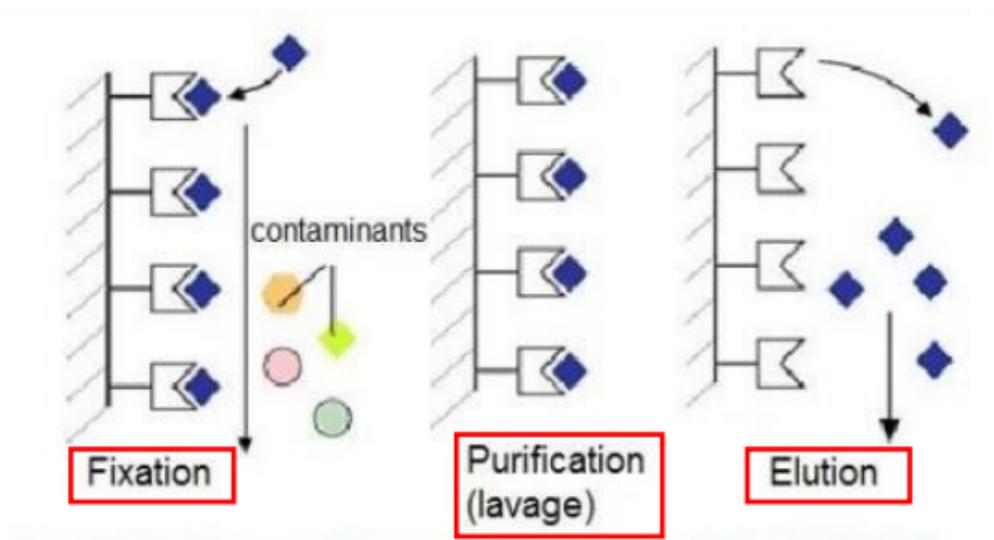


Figure 6. Les trois étapes d'une chromatographie d'affinité

c) Composants de la chromatographie d'affinité

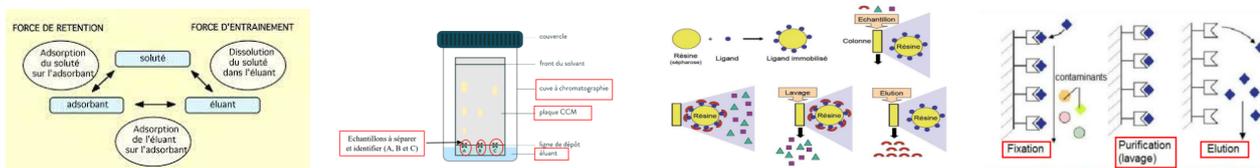
i Phase stationnaire (le gel)

Est un support macromoléculaire inerte portant un effecteur présentant une affinité biologique pour un soluté de l'échantillon. Les supports

doivent présenter les propriétés suivantes :

- Insolubles dans l'eau
- Poreux
- Chimiquement et mécaniquement stables
- Porter des groupements fonctionnels réactifs pour permettre la fixation de l'effecteur par liaison covalente.
- Les principaux supports utilisés sont : carboxyméthylcellulose, sepharose et le gel de polyacrylamide.

Galerie 02



ii Le bras fixateur

C'est une chaîne poly-carbonée (C6-C8) intercalée entre la matrice et le ligand

iii Le ligand

Toute substance capable de former des complexes stables avec les molécules à isoler et possédant, par surcroît un groupement réactif assez éloigné du site actif pour que celui-ci reste librement accessible après la fixation. C'est la molécule fonctionnelle, fixée directement ou indirectement sur la matrice.

iv Phase mobile

Tampon d'éluion variable (pH, NaCl...).

d) Applications

La chromatographie d'affinité a été utilisée en :

- Enzymologie, pour l'extraction d'enzymes et la purification d'extrait enzymatiques.
- Immunologie, pour la purification d'anticorps.
- Protéino-chimie, pour l'étude des protéines membranaires.

10.4.8. Exercice : j'ai commencer à apprendre la notion d'un ligand ?

[solution n° 14 p.27]

un ligand est un :

- Bras fixateur
- Une enzyme
- Un substrat

11. 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, appelées ici « **analytes**^{*} ». 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.

*

11.1. Exercice : avez vous maîtrisez la CPG ?

[solution n° 15 p.27]

Que signifie CPG ?

- Chromatographie en phase gazeuse
- Chromatographie en phase solide

11.2. Principe

La CPG repose sur l'**équilibre de partage** des analytes entre **une phase stationnaire** et une **phase mobile gazeuse**. Le mélange à analyser est vaporisé puis transporté à travers une colonne renfermant une substance liquide ou solide qui constitue la phase stationnaire. Le transport se fait à l'aide d'un gaz inerte, appelé « gaz vecteur », qui constitue la phase mobile

*

11.3. Exercice : j'ai commencer à maîtriser la CPG ?

[solution n° 16 p.27]

Comment fonctionne la chromatographie en phase gazeuse ?

11.4. Appareillage

L'appareil utilisé pour réaliser une analyse par chromatographie en phase vapeur est appelé chromatographe. Il comporte plusieurs éléments :

*

11.4.1. 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.

*

11.4.2. Le système d'injection

Ce système permet à la fois l'introduction de l'échantillon dans la colonne du chromatographe, ainsi que la volatilisation des analytes. La température de l'injecteur doit être réglée de manière à entraîner la vaporisation de tous les analytes de l'échantillon : elle est généralement maintenue à 50°C au-dessus de la température d'ébullition de l'analyte le moins volatil. L'introduction se fait à l'aide d'une microsiringue.

*

11.4.3. La colonne (phase stationnaire)

Il existe deux types de colonnes : 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.

*

11.4.4. Le 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.

*

11.4.5. L'enregistreur

Il s'agit d'un ordinateur qui récupère toutes les données issues des détecteurs, trace les chromatogrammes et intègre la surface des pics.

*

11.5. Exercice : avez vous apprenés la CPG ?

[solution n°17 p.27]

Parmi les éléments d'une CPG on trouve ?

- Le gaz vecteur
- La colonne
- Le détecteur

12. Test final de deuxième chapitre

12.1. Exercice : avez vous compris la CPG ?

[solution n° 18 p.28]

En CPG on utilise des analytes en forme :

- solide
- liquide

12.2. Exercice : avez vous compris la CCM ?

[solution n° 19 p.28]

La CCM permet :

- D'identifier les composants d'un échantillon
- De quantifier les composants d'un échantillon

12.3. Exercice : toujours avec la CPG

[solution n° 20 p.28]

Les résultats obtenus par une CPG, sont nommés :

- Chromatogrammes
- Spots

12.4. Exercice : la chromatographie

[solution n° 21 p.28]

La chromatographie est une méthode de séparation :

- Des constituants présents dans des mélanges variés
-

Le principe de base repose sur les équilibres de concentration en présence de deux phases non miscibles, stationnaire et mobile

- Les solvants organiques utilisés dans la séparation sont classés selon la polarité de moins faible au plus élevée
- Les solvants organiques utilisés dans la séparation sont classés selon la polarité de plus élevée au moins faible

12.5. Exercice : CPG*[solution n°22 p.28]*

Les méthodes chromatographiques peuvent être classées selon le support de la phase stationnaire et la nature de la phase mobile, citer les différentes méthodes chromatographiques :

- Chromatographie en phase gazeuse
- Chromatographie en phase liquide
- Chromatographie Sur couche mince
- Chr. Sur papier
- Chr. Liquide haute performance (HPLC)

13. TEST DE SORTIE DE COUR

13.1. Exercice

[solution n°23 p.29]

Les méthodes chromatographiques séparent les molécules grâce à une accélération centrifuge?

- vrais
- faux

13.2. Exercice

[solution n°24 p.29]

La chromatographie sur couche mince renseigne sur la composition quantitative d'un mélange ?

- vrais
- faux

13.3. Exercice

[solution n°25 p.29]

La centrifugation différentielle permet de séparer les constituants d'un mélange en culot et surnagent ?

- vrais
- faux

13.4. Exercice

[solution n°26 p.29]

quel est la définition d'une phase stationnaire ?

13.5. Exercice

[solution n°27 p.29]

définir le terme "force de rétention" ?

13.6. Exercice

[solution n°28 p.30]

Citez les principaux composants d'une centrifugeuse ?

13.7. Exercice

[solution n°29 p.30]

Quels sont les types d'un gradient utilisé en centrifugation ?

Solutions des exercices

> **Solution n° 1**

Exercice p. 6

Que signifie le mot chromatographie ?

Séparation

> **Solution n° 2**

Exercice p. 7

la séparation des composés en chromatographie est basé sur :

- Différences d'affinité
- La taille
- La densité

> **Solution n° 3**

Exercice p. 7

parmi les forces intervenant dans la séparation des analytes en chromatographie on trouve :

- Forces électrostatiques
- liaisons d'Hydrogène

> **Solution n° 4**

Exercice p. 8

La chromatographie se divise en plusieurs types selon

- La nature des phases
- Natures des molécules
- L'appareil utilisé

> **Solution n° 5**

Exercice p. 8

le choix de la technique chromatographique est basé sur :

- Le but de l'analyse
- la nature du soluté à séparer

> **Solution n° 6**

Exercice p. 9

citez les types de chromatographie en phase liquide ?

De partage (liquide-liquide) et D'adsorption (liquide-solide)

> **Solution n° 7**

Exercice p. 10

La chromatographie de partage permet de :

- Quantifier les composants d'un échantillon
- Identifier les composants d'un échantillon

> **Solution n° 8**

Exercice p. 11

Quel est le principe de la chromatographie de partage ?

Elle fonctionne par partage de solutés entre deux phases liquides non miscibles

> **Solution n° 9**

Exercice p. 11

Citez les composants d'une chromatographie de partage?

L'échantillon ; la phase mobile et la phase stationnaire.

> **Solution n° 10**

Exercice p. 12

Dans la chromatographie de partage il existe deux types :

- Chromatographie de partage sur phase normale.
- Chromatographie de partage en phase inverser.

> **Solution n° 11**

Exercice p. 13

une force de rétention :

- Force exercer par la phase stationnaire
- Force exercer par la phase mobile

> **Solution n° 12**

Exercice p. 14

une phase mobile c'est :

- Un Éluant
- Un Adsorbant

> **Solution n° 13**

Exercice p. 16

La chromatographie sur couche mince renseigne sur :

- la composition quantitative d'un mélange
- la composition qualitative d'un mélange

> **Solution n° 14**

Exercice p. 19

un ligand est un :

- Bras fixateur
- Une enzyme
- Un substrat

> **Solution n° 15**

Exercice p. 20

Que signifie CPG ?

- Chromatographie en phase gazeuse
- Chromatographie en phase solide

> **Solution n° 16**

Exercice p. 20

Comment fonctionne la chromatographie en phase gazeuse ?

Elle repose sur l'équilibre de partage des analytes entre une phase stationnaire et une phase mobile gazeuse.

> **Solution n° 17**

Exercice p. 21

Parmi les éléments d'une CPG on trouve ?

- Le gaz vecteur

- La colonne
- Le détecteur

> **Solution n° 18**

Exercice p. 22

En CPG on utilise des analytes en forme :

- solide
- liquide

> **Solution n° 19**

Exercice p. 22

La CCM permet :

- D'identifier les composants d'un échantillon
- De quantifier les composants d'un échantillon

> **Solution n° 20**

Exercice p. 22

Les résultats obtenus par une CPG, sont nommés :

- Chromatogrammes
- Spots

> **Solution n° 21**

Exercice p. 22

La chromatographie est une méthode de séparation :

- Des constituants présents dans des mélanges variés
-

Le principe de base repose sur les équilibres de concentration en présence de deux phases non miscibles, stationnaire et mobile

- Les solvants organiques utilisés dans la séparation sont classés selon la polarité de moins faible au plus élevée
- Les solvants organiques utilisés dans la séparation sont classés selon la polarité de plus élevée au moins faible

> **Solution n°22**

Exercice p. 23

Les méthodes chromatographiques peuvent être classées selon le support de la phase stationnaire et la nature de la phase mobile, citer les différentes méthodes chromatographiques :

- Chromatographie en phase gazeuse
- Chromatographie en phase liquide
- Chromatographie Sur couche mince
- Chr. Sur papier
- Chr. Liquide haute performance (HPLC)

> **Solution n°23**

Exercice p. 24

Les méthodes chromatographiques séparent les molécules grâce à une accélération centrifuge?

- vrais
- faux

> **Solution n°24**

Exercice p. 24

La chromatographie sur couche mince renseigne sur la composition quantitative d'un mélange ?

- vrais
- faux

> **Solution n°25**

Exercice p. 24

La centrifugation différentielle permet de séparer les constituants d'un mélange en culot et surnagent ?

- vrais
- faux

> **Solution n°26**

Exercice p. 24

quel est la définition d'une phase stationnaire ?

Une phase stationnaire représente l'une des composantes essentielles de la chromatographie. Elle est composée d'une phase solide ou d'une couche d'un liquide adsorbée à la surface d'un support solide

> **Solution n°27**

Exercice p. 24

définir le terme "force de rétention" ?

Est une force exercée par la phase stationnaire qui minimise la vitesse de déplacement des solutés avec la phase mobile (adsorption ou partage)

> **Solution n°28**

Exercice p. 24

Citez les principaux composants d'une centrifugeuse ?

L'enceinte, le motor, tubes à centrifuger, le rotor et l'axe de rotation

> **Solution n°29**

Exercice p. 24

Quels sont les types d'un gradient utilisé en centrifugation ?

Continue et discontinue

Glossaire

Analyte

Espèce chimique recherchée, détectée et éventuellement dosée selon un protocole analytique.

capillarité

est le phénomène d'interaction qui se produit aux interfaces entre deux liquides non miscibles, entre un liquide et l'air ou entre un liquide et une surface. Elle est due aux forces de tension superficielle entre les différentes phases en présence.

Eluant

Solvant utilisé pour la séparation de substances adsorbées sur un support dans la chromatographie sur couche mince.

Hydrophile

Un composé hydrophile peut être soluble dans l'eau (hydrosoluble) ou les solvants polaires

Hydrophobe

est une substance, ou une partie de molécule organique, qui ne se dissout pas dans l'eau et qui n'a pas d'affinité polaire avec elle. Au contraire, l'hydrophile attire l'eau.

Ligand

Molécule capable de se lier à une macromolécule, un enzyme, un récepteur ou un acide nucléique. La fixation d'un ligand sur le récepteur est en principe spécifique, à haute affinité et réversible. La fixation peut être directe ou nécessiter un intermédiaire

Abréviations

CAff : Chromatographie d'Affinité

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

CPL : Chromatographie En Phase Liquide

GC/MS : Gaz Chromatographie couplée à la Spectrométrie de Masse

HPLC : High Performance Liquide Chromatographie

pH : potentiel hydrogène

RF : Rapport Frontal

RP : Reverse Phase

UV : Ultra Violet

Références

07 Cours des Techniques d'extraction, de purification et de conservation.

08 Cours d'Analyse et Contrôle.

09 Cours Méthodes d'Analyse Chromatographique.

10 Cours des Méthodes Chrommatographique

Webographie

<https://fr.airliquide.com/solutions/calibration-et-analyse/chromatographie/quelles-sont-les-differentes-phases-en-chromatographie>

<https://www.studysmarter.fr/resumes/physique-chimie/chimie/chromatographie/>

<https://tice.ac-montpellier.fr/ABCDORGA/Famille/chromato.htm>

<https://www.lolivrescolaire.fr/page/6226010>

<https://www.masterchimie1.universite-paris-saclay.fr/Chromatoweb/CPG.html>

<https://chimieanalytique.com/chromatographie-en-phase-gazeuse-cpg/>

Crédits des ressources

Figure 1. Schéma présentant les différentes techniques chromatographique. p. 7

<http://creativecommons.org/licenses/publicdomain/4.0/fr/>

Figure 3. Interactions entre le soluté, l'adsorbant et l'éluant p. 13

<http://creativecommons.org/licenses/publicdomain/4.0/fr/>