

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



Université de Ghardaïa

N° d'ordre :
N° de série :

Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre
Département de Biologie

Projet de fin d'étude présenté en vue de l'obtention du diplôme de

LICENCE

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Biologie

Spécialité : Biochimie

Thème

*Etude et mise en marche d'un appareil de
mesure spectroscopique par HPLC*

Par :

Meriem Hanichi

Marwa Hamel

Jury :

M.A.k.Hadj said

Maître Assistant A

Univ. Ghardaïa **Encadreur**

M. S.Agoune

Maître Assistant A

Univ. Ghardaïa **Examineur**

Année universitaire 2012/2013

Dédicace

Je dédie ce mémoire à :

Ma très chère mère pour tout son amour et son dévouement, à mon père qui a toujours été là pour moi et qui m'a donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance,

Mes frères pour son encouragement indéfectible: Kamal, Mohamed, Saïf, Nadir

Mes adorables sœurs : Halima, Imane, Aïcha pour leurs sacrifices tout au long de ma formation,

Mon fiancé : Karim pour leur soutien moral

Et les enfants de ma sœur et mon frère: Houssame, Djalilo, Amina, Tasnime

Mon promoteur Mr hadj Saïd,

Toute ma famille, et ma tante Djawida

Mon chère collègue « Marwa » et à leurs familles,

Tous mes amis et spécialement : Imane, Hamida, Sabrine, Hayate, Souad, Amel, Majda, Asma, Nana, Lamia, Fatima, ...et tous ceux qui me sont chers et que j'ai omis de citer,

J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.

Meriem

Dédicace

Je dédie ce mémoire à :

Ma très chère mère pour tout son amour et son dévouement, à mon père qui a toujours été là pour moi et qui m'a donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance,

Mes frères pour son encouragement indéfectible: Ahmed, Djamel, Zakaria

Pour l'ange A qui est entré dans ma vie et ma soutenue moralement

Et leur famille

Mon promoteur Mr hadj Saïd,

Toute ma famille

Mon chère collègue « Merième » et à leurs familles,

Tous mes amis et spécialement : Imène, Hamida, Randa, Sabrine, aïcha, aïcha, Amel, Yasmina , omo zayed, Safaa, Nana, Lamia, Sara, fatima, Khadîdja, Fatima, Nawal ...et tous ceux qui me sont chers et que j'ai omis de citer.

J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.

Marwa

Remerciement

*Je remercié Dieu le tout puissant,
De nous avoir donné le privilège et la chance de suivre le chemin de
la science qu'il me soit permis de témoigner ma reconnaissance.
Avant de présenter ce travail, je tiens à remercier ma promotrice M^r
Hadj Saïd Abk , maître assistant et chargé de cours au département
science de la nature et de la vie , il a toujours été disponible pour
m'accompagner dans la réalisation de ce travail.*

Mes remerciements également à

Agoune .S

Abdelouhabe cheddade

Omar boulaakoud

Souad cheraa.

Son oublié le chef département de la biologie

M^r Faouzi ben brahim

*Je remercie aussi toutes les personnes que je ne suis pas nommée
ici, bien qu'elles me soient chères et qui ont contribué de près ou de
loin à l'accomplissement de ce travail.*

Sommaire

Introduction	2
Première partie	
Chapitre I	
I-1 Historique	4
I-2 Aspects généraux	5
I-3 Généralités sur la chromatographie analytique	5
I-4 Chromatogramme	8
I-5 Définition de la chromatographie.....	10
I-6 Chromatographie d'adsorption	11
I-7 Chromatographie de partage	12
I-8 Chromatographie par échangeuse d'ion.....	12
I-9 Chromatographie d'exclusion et diffusion.....	13
I-9-1 principes de séparation	13
I-10 Chromatographie sur couche min CCM.....	14
I-10-1 Définition et appareillage	14
I-10-2 Application et technique	15
I-10-3 Adsorbant et plaque chromatographique	15
I-10-4 Choix de l'éluant	16
I-10-5 Dépôt de l'échantillon	16
I-10-6 Développement de la plaque	16
I-10-7 Révélation	17
I-10-8 Calcul de RF (rapport frontal).....	17
I-10-9 description d'une analyse CCM selon l'ordre chromatographique...	18
I-11 Chromatographie d'affinité	18
I-12 Chromatographie sur papier	19

I-12-1 Principe de la technique et application	19
I-12-2 Papier	20
I-12-3 Protocol	20
I-13 Chromatographie sur colonne.....	20
I-13-1description et principe.....	20
I-13-2 Paramètre fondamentaux de la chromatographie d'élution en colonne	21
I-13-3 Remplissage de la colonne.....	26
I-13-4 Efficacité de la colonne	26
Chapitre II	
Initiation a la spectroscopie	
II-1 définition de la spectroscopie	29
II-2 principes de la spectroscopie	29
II-3 spectre, spectroscopie, et spectrométrie	29
II-4 rayonnement électromagnétiques.....	30
II-5 la spectroscopie d'émission	32
II-6 principe de fonctionnement	32
II-6- 1 fondements des méthodes de mesure par absorption atomique...	32
II-6- 2principe d'une spectroscopie a réseaux.....	33
II-7 spectroscopie infrarouge	33
II-7- 1 rayonnement infrarouge	33
II-7-2 l'analyse de donnée IR.....	34
II-8 application de la spectroscopie U.V. visible	34
II-9 loi d'absorption de la lumière –loi de beer-Lambert	35
II-9-1 validité de lois de beer –Lambert	36
II-10 concepts généraux de la spectroscopie aux lasers	36
II-11 spectre et donnée spectrales	37
II-12 la notion de spectre	37

II-13 les différents types de mesure spectrale.....	37
---	----

Chapitre III

Chromatographie liquide à haut performance HPLC

III-1 introduction	40
III-2 origine de HPLC	40
III-3 conception générale d'un appareil de HPLC.....	40
III-4 pompe et gradient d'éluant	41
III-4-1 pompe pour éluant	41
III-4-2 gradients basse- pression ou haute pression	42
III-5 injecteur	42
III-6 colonne	43
III-7 phase stationnaires	44
III-7-1 le gel de silices, matière de base des phases actuelles.....	44
III-7-2 les silices greffées.....	45
III-7-3 autres phases polarité variable.....	46
III-8 chromatographie chirale	46
III-9 phase mobile	47
III-10 chromatographie d'appariement d'ions	47
III-11 chromatographie d'interaction hydrophobe	48
III-12 détecteur	48

Partie expérimentale

Chapitre IV

Conception d'un appareil de HPLC YL9100

IV-1 dégazeur à vide type YL9100 en HPLC	53
IV-1-1 dégazage de solvant de phase mobile.....	53
IV-1-2 caractéristique du dégazeur	53
IV-1-3 dégazage du solvant	53
IV-2 les pompes quaternaires YL9110.....	54

IV2-1 les caractéristiques de la pompe	54
IV2-2 configuration de la pompe quaternaire.....	55
IV-2-2-1 cycle de fonctionnement d'écoulement d'un mélange de solvant	55
IV-3 compartiment de la colonne YL9131.....	55
IV-3-1 caractéristiques de la colonne	56
IV-4 détecteur UV/VIS YL9120.....	57
IV-4-1 les caractéristiques de détecteur	57
Chapitre V	
Séparation des principaux composés	
V-1 introduction	60
V-2 matériels et méthode.....	60
V-3 Résultats et discussions	60
Conclusion	62

Liste de figure

Figure. I.1: le montage de Michel Tswett 1900 début d'apparition de l'HPLC.....	4
Figure. I.2: l'expérience de base en chromatographie.....	6
Figure. I.3 : principe d'analyse chromatographie	7
Figure. I.4: pic chromatographie.....	9
Figure. I.5 : différent types de chromatographie	11
Figure. I.6 : phénomène d'adsorption et partage	12
Figure. I.7 : principe de séparation chromatographie d'exclusion	14
Figure. I.8 : principe de séparation en chromatographie CCM.....	15
Figure. I.9: chromatogramme typique	22
Figure. I.10 : facteur de résolution	23
Figure. I.11 : séparation idéal est réalisée	24
Figure. II.1 : les spectres combinés.....	30
Figure. II.2 : domaine particulière du rayonnement électromagnétique	31
Figure. II.3 : domaines de l'IR dans le spectre électromagnétiques	34
Figure. II.4 : partie rayonnement sera absorbée par l'échantillon et partie sera transmise.....	35
Figure. III.1: principe de fonctionnement de l'HPLC.....	41
Figure. III.2: les deux phases de l'injection avec une boucle.....	42
Figure. III.3: colonne standard et précolonne de HPLC.....	44
Figure. III.4: trajet optiques détecteur de l'IR	50
Figure. IV.1: diagramme de fonctionnement de la pompe YL9110.....	55
Figure. V.1 : chromatogramme de la séparation	60

Liste des tableaux

Tableau 01: les types colonne de la chromatographie.....43

Tableau 02: résultats de la séparation.....61

Résumé :

Le but de notre travail est la mise en marche et l'essai de fonctionnement de l'appareil d'analyse par chromatographie liquide à haute performance HPLC YL 9100. Les caractéristiques techniques de l'appareil, ces différents constituants ainsi que son mode de fonctionnement ont été mis en exergue dans notre étude, puis un essai pratique consistant en la séparation d'un mélange d'une solution constituée de benzène, toluène et naphthalène. L'analyse du chromatogramme obtenu montre bien que la séparation a été réalisée avec succès, en effet, les pics obtenus à des temps de rétention différents et avec des amplitudes différentes caractérisent bien les trois constituants susmentionnés.

Abstract:

The aim of our work is starting and functional testing of the analyzer liquid chromatography high performance HPLC YL9100. The technical characteristics of the apparatus, these various constituents and its operation have been highlighted In our study, a practical test and the separation consisting of a mixture of a solution consisting of benzene, toluene and naphthalene. The analysis shows the chromatogram obtained that separation has been performed successfully, in effect; the peaks obtained with retention times and different amplitudes with different well characterize the three aforementioned components.

التلخيص :

الهدف من عملنا هذا بداية تجارب تقنية الفصل العالي الأداء (HPLC YL9100), والخصائص التقنية للجهاز وإبراز مختلف مكوناته وعملها في دراسة التجارب عملية وفصل في مكونات الخليط الذي يحتوي على البنزين والتولوين و النفثالين المبين الجيد للتحليل اللوني, وقد حققت هذه التجارب في الفصل نجاحا في الواقع , والمستويات التي تم الحصول عليها عدة مرات مع مختلف المكونات الثلاثة السابقة.

Liste des Abréviation

CCM: chromatographie sur couche mince.

CLS: chromatographie liquide /solide.

CLL: chromatographie liquide /liquide.

BPL: bounded face chromatographie.

CP: chromatographie sur papier.

SEC: size exclusion chromatographie.

GFC: gel filtration chromatographie.

GPC: gel perméation chromatographie.

CPG: chromatographie phase gazeuse.

HPLC: chromatographie liquide haute performance.

SEA: spectroscopie d'émission atomique.

SAA: spectroscopie d'absorption atomique.

IR: infra rouge.

PEEP: polyéther-etherketone.

PS: phase stationnaire.

PM: phase mobile.

PIC: paire d'ion chromatographie.

ACN: acétonétil.

DI: distance par courue par composé.

DS: distance par courue par le front de solvant.

UV: ultraviolet.

TM: temps mort.

TR: temps de rétention.

T'R: temps de rétention réduit.

Vh: volume hydrodynamiques.

Rh: rayon hydrodynamiques.

RF: rapport frontal.

RS: résolution.

N: nombre de plateaux théoriques.

RX: rayon X.

α : facteur de sélectivité.

K': facteur de capacité.

D: débit.

Vm: volume mort.

h: hauteur du pic.

W: largeur de pic a la base.

I: intensité.

K: constante caractéristique.

T: transmutante.

Lc: longueur de la colonne.

L: longueur de chemin optique.

V: volume.

C: concentration.

ϵ : absorptivité.

λ : longueur d'onde.

μm : micromètre.

μl : microlitre.

cm: centimètre.

nm: nanomètre.

mv: microvolte.

s: seconde.

min: minute.

ppm: partie par million.

kpa: kilo pascalle.

C°: température Celsius.

ZrO₂: l'oxyde de zirconium.

TiO₂: l'oxyde de titane.

Al₂O₃: alumine.

SiO₂: silice.

H₂O: eau.

Introduction

Introduction :

La chromatographie liquide à haute performance HPLC est l'une des techniques les plus utilisées au laboratoire de chimie et de biologie dont le but est l'analyse et la séparation des constituants d'un mélange liquide. Notre travail consiste à la mise en marche et l'essai de fonctionnement de l'appareil d'analyse par chromatographie liquide à haute performance YL9100 récemment acquis au laboratoire de chimie de l'université de Ghardaïa. A cet effet, notre travail a été divisé en deux parties, la première partie consistant en une analyse bibliographique succincte comprenant 3 chapitres : Dans le premier chapitre, on a défini la chromatographie et ses différents types. Le deuxième chapitre a été consacré pour les analyses spectrales et le troisième pour la chromatographie liquide à haute performance HPLC.

La deuxième partie de ce mémoire est une partie pratique dans laquelle on a effectué une analyse pratique consistant en la séparation des constituants d'une solution composée d'un mélange de benzène, toluène et naphthalène à différentes proportions.

Elle a été répartie en deux chapitres, un chapitre consacré au matériel utilisé, dans lequel nous avons défini en détail l'appareillage utilisé dans l'analyse chromatographique par HPLC YL9100 et nous avons mis en évidence ses différents constituants et son mode de fonctionnement.

Le chapitre suivant a porté sur l'essai pratique de séparation du mélange liquide benzène-toluène et naphthalène suivi de la discussion des résultats obtenus, notamment celles inhérentes à l'analyse du chromatogramme obtenu.

L'étude a été terminée par une conclusion et d'éventuelles recommandations jugées utiles à valoriser ce travail.

Première Partie

Synthèse bibliographique

I-1 Historique:

On a coutume d'attribuer à Michel Tswett l'invention, peu après 1900, de la chromatographie actuelle. Au travers de ses publications successives, on peut en effet reconstituer sa démarche intellectuelle qui en fait un pionnier, si ce n'est l'inventeur, de cette importante méthode séparative. Son domaine de recherche était lié à la biochimie des plantes. À son époque on savait extraire avec de l'éthanol la chlorophylle et les autres pigments des plantes vertes, souvent des feuilles. En évaporant ce solvant, il restait un extrait noirâtre qui pouvait être redissous dans bon nombre d'autres solvants et en particulier dans l'éther de pétrole (on dirait maintenant des solvants polaires ou non polaires). Cependant on ne comprenait pas bien pourquoi ce dernier solvant était incapable d'extraire directement la chlorophylle des plantes. Tswett émit l'hypothèse que dans les plantes la chlorophylle devait être retenue par des forces qui la fixait sur la cellulose, empêchant ainsi l'éther de pétrole de l'extraire. Il entrevoyait ici le principe de l'adsorption. Pour tester cette hypothèse il eut l'idée de dissoudre l'extrait de pigments dans l'éther de pétrole et d'ajouter du papier filtre (cellulose), comme succédané du tissu des feuilles. Il s'aperçut alors que le papier captait la teinte et qu'en ajoutant de l'éthanol au mélange on pouvait ré-extraire ces mêmes pigments. En prolongement de ce travail, il décida de faire des essais systématiques avec toutes sortes de poudres dont il pouvait disposer. Pour gagner du temps, il avait réalisé un montage qui lui permettait de faire plusieurs essais simultanément.

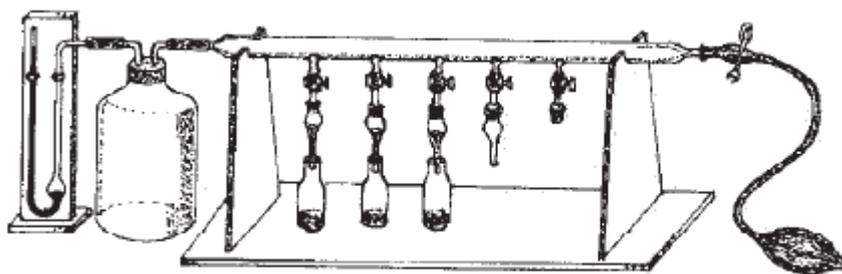


Fig. I.1 : le montage de Michel Tswett 1900 début d'apparition de l'HPLC.

Il plaçait les poudres à tester dans les tubes et il ajoutait à chacun d'eux une solution des pigments dans l'éther de pétrole. Cela lui permit d'observer que dans certains tubes les poudres laissaient apparaître des anneaux superposés aux couleurs différentes, ce qui témoignait que la force de rétention variait avec la nature des pigments présents. En rinçant les colonnes avec des solvants différents, il put recueillir séparément certains de ces constituants. La chromatographie moderne était née. C'est un peu plus tard, en 1906, qu'il rédigea la publication (parue dans Ber. Dtsch.

Botan., Ges.), dans laquelle il écrivit le paragraphe le plus souvent cité : « Comme les radiations lumineuses dans le spectre, les différents composants d'un mélange de pigments, obéissant à une loi, se trouvent séparés sur la colonne de carbonate de calcium et peuvent ensuite être déterminés qualitativement et quantitativement. J'appelle une telle préparation un chromatogramme et la méthode correspondante la méthode chromatographique ». (Francis et Annick ,2004)

I-2 Aspects généraux:

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants présents dans des mélanges variés. Elle sert en analyse pour identifier et quantifier des composés au sein d'échantillons divers. Le principe de base repose sur les équilibres de concentration qui apparaissent lorsqu'un composé est mis en présence de deux phases non miscibles. En chromatographie, l'une, dite stationnaire, est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support et l'autre, dite mobile, se déplace au contact de la première. Si plusieurs composés sont présents, ils se trouvent entraînés à des vitesses différentes, provoquant leur séparation. ce procédé hydrodynamique a donné naissance à une méthode analytique instrumentale qui a un très grand domaine d'applicabilité et par suite se trouve très répandue. Aucun laboratoire analysant des composés moléculaires ne peut ignorer la chromatographie.

I -3 Généralités sur la chromatographie analytique :

La chromatographie est un procédé physico-chimique de séparation, au même titre que la distillation, la cristallisation ou l'extraction fractionnée, des constituants d'un mélange homogène liquide ou gazeux. Les applications de ce procédé sont donc potentiellement très nombreuses, d'autant plus que beaucoup de mélanges hétérogènes ou sous forme solide Peuvent être mis en solution par emploi d'un solvant (celui-ci apparaissant comme un composé supplémentaire). L'expérience de base en chromatographie peut être décrite comme suit (fig. I.2) :

1. On immobilise dans une colonne un solide finement divisé appelé phase stationnaire.
2. On place au sommet de cette colonne un petit volume de l'échantillon à séparer.
3. On force cet échantillon à traverser la colonne de haut en bas au moyen de la phase mobile afin d'entraîner ses divers constituants. Si les composés présents migrent à des vitesses différentes, ils pourront être recueillis séparément, chacun en solution dans la phase mobile. En dehors de cette exploitation de la chromatographie qui perdure depuis son origine, ce procédé est devenu en soi une méthode d'analyse lorsqu'on eut l'idée de mesurer les temps de migration des composés dans la colonne pour les identifier. Pour cela il devenait indispensable de maîtriser certains paramètres

(débits, température...) et il fallait placer en sortie de colonne un détecteur pour repérer les changements de composition de la phase mobile. Cette application de la chromatographie, dont le but n'est plus de récupérer les composés séparés mais de mesurer leurs temps de passage dans la colonne s'est développée lentement.

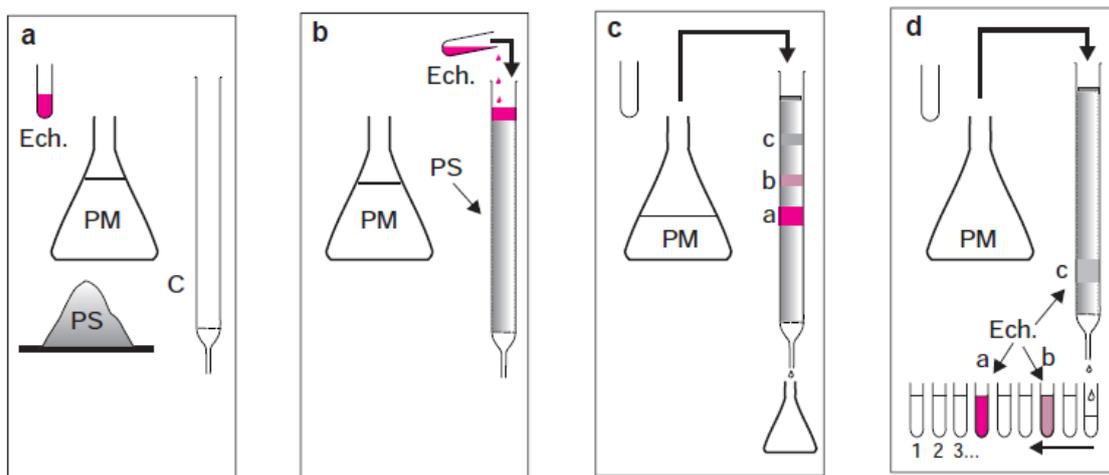


Fig.I.2 : L'expérience de base en chromatographie. a) Les ingrédients nécessaires C, colonne, PS, phase stationnaire, PM, phase mobile et E, échantillon ; b), le dépôt de l'échantillon ; c) le début de l'élution ; d) la récupération des produits après séparation.

L'identification d'un composé par chromatographie correspond à une méthode comparative. Pour identifier un composé, dont on ne sait s'il s'agit de A ou de B, par la méthode chromatographique, on compare son temps de migration à ceux des deux composés de référence A et B, ceci, sans changer d'appareillage et en se plaçant dans les mêmes conditions expérimentales. Dans une telle expérience de chromatographie analytique, on n'a pas effectué des séparations (il s'agit de produits purs) mais simplement repéré des temps de migration. Cependant il apparaît trois points faibles à cette méthode : le procédé est assez long de mise en oeuvre, l'identification n'est pas absolue, et le contact physique entre l'échantillon et la phase stationnaire peut modifier ses propriétés à demeure, en particulier les temps de rétention. Ce procédé particulier de fractionnement est né, sous sa forme moderne, au début du siècle dernier des travaux du botaniste Michaël Tswett à qui on attribue également l'invention des termes de chromatographie et de chromatogramme.

La technique s'est considérablement améliorée depuis ses débuts. On dispose actuellement de chromatographes pilotés par des logiciels qui rassemblent autour d'une colonne performante et miniaturisée pour pouvoir séparer des microquantités d'échantillon tout un ensemble d'accessoires destinés à assurer la répétabilité des expériences successives par la maîtrise parfaite des différents paramètres de séparation. Pour des analyses successives d'un même échantillon, réalisé dans des

conditions identiques à plusieurs heures d'intervalle, les temps de rétention sont reproductibles à la seconde près (fig. I.3).

Chaque séparation effectuée donne lieu à un enregistrement particulier appelé chromatogramme, qui correspond au tracé des variations de composition de la phase éluée au cours du temps. Pour obtenir ce document particulier, il faut placer à l'extrémité aval de la colonne un capteur dont il existe un grand nombre de variantes.

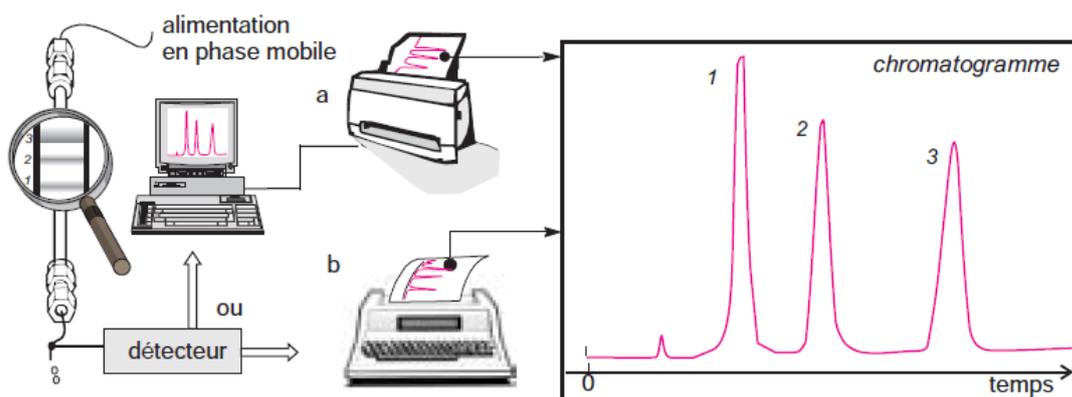


Fig. I.3 : Principe de l'analyse par chromatographie.

Le chromatogramme, passage obligé de toute analyse chromatographique, est obtenu à partir des variations en fonction du temps d'un signal électrique envoyé par le détecteur. Il est soit présenté en temps réel soit en différé à partir des valeurs instantanées mises en mémoire dans un micro-ordinateur. Les logiciels de chromatographie recalculent ces valeurs pour être mises au format désiré (a, imprimante). Pendant longtemps il a été obtenu avec un simple enregistreur graphique ou un enregistreur-intégrateur (b). Chromatogramme illustrant la séparation d'un mélange de 3 constituants principaux. Noter l'ordre d'apparition des pics en correspondance avec la position de chaque Constituant dans la colonne.

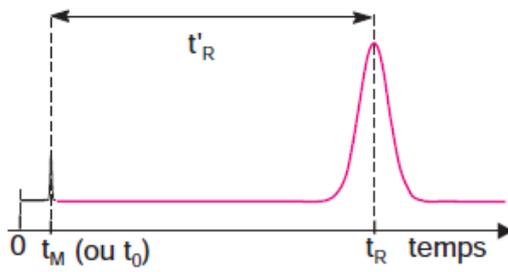
L'identification d'un composé moléculaire, à partir du chromatogramme, est quelquefois aléatoire. Une manière plus sûre consiste à associer deux techniques complémentaires. On réunit, par exemple, un chromatographe et un second appareil « en ligne », tel un spectromètre de masse ou un spectromètre infrarouge. Ces méthodes couplées, du second ordre (ou bidimensionnelles) permettent de récupérer deux types d'informations indépendantes (temps de migration et « spectre »). On peut alors déterminer avec certitude la composition de mélanges complexes ou la concentration de certains composés à partir de quantités de l'ordre du nanogramme (analyses de confirmation).

I-4 Le chromatogramme :

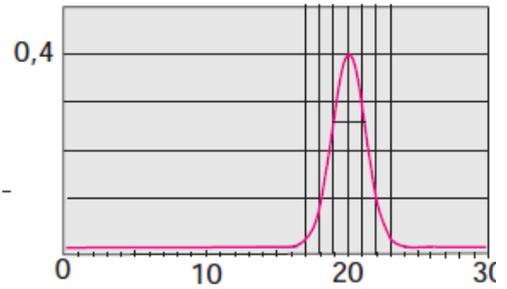
Le chromatogramme est une courbe qui traduit la variation au cours du temps d'un paramètre relié à la concentration instantanée du soluté en sortie de colonne (fig.I.4). Le temps (ou très rarement le volume d'élution) est porté en abscisse et l'intensité du signal de détection en ordonnée. La ligne de base correspond au tracé obtenu en l'absence de composé élué. La séparation est complète quand le chromatogramme présente autant de pics chromatographiques revenant à la ligne de base qu'il y a de composés dans le mélange à analyser. Un constituant est caractérisé par son temps de rétention T_R , qui représente le temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui qui correspond sur le chromatogramme au maximum du pic qui lui est lié. Dans le cas idéal t_R est indépendant de la quantité injectée. Un constituant non retenu sort de la colonne au temps T_M , appelé temps mort (1) (désigné également par t_0).

La différence entre le temps de rétention et le temps mort est désignée par le temps de rétention réduit du composé $T'R$. En analyse quantitative on se contente le plus souvent de bien séparer du mélange le ou les constituants à doser. Si le signal envoyé par le capteur varie linéairement avec la concentration d'un composé, il en sera de même de l'aire du pic correspondant sur le chromatogramme.

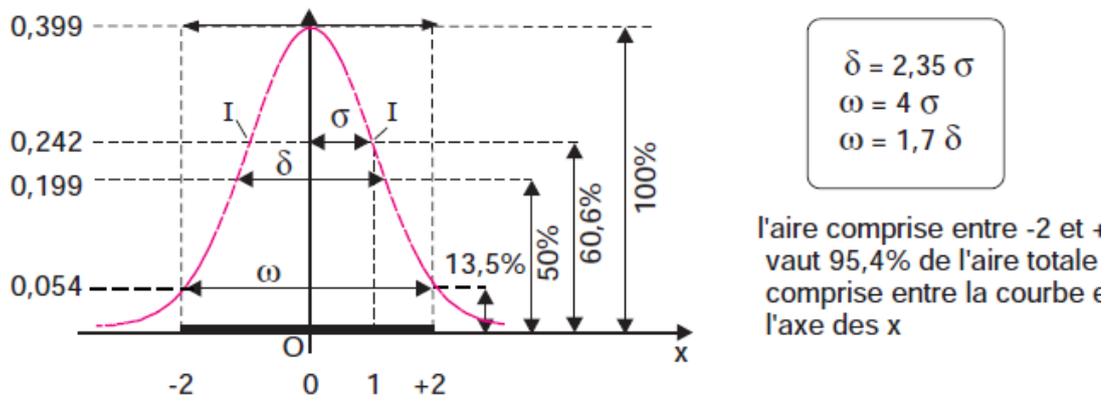
a) temps de rétention



b) courbe de Gauss avec $\mu = 20$ et $\sigma = 1$



c) caractéristiques du pic idéal



d) comparaison entre un chromatogramme réel et des courbes gaussiennes

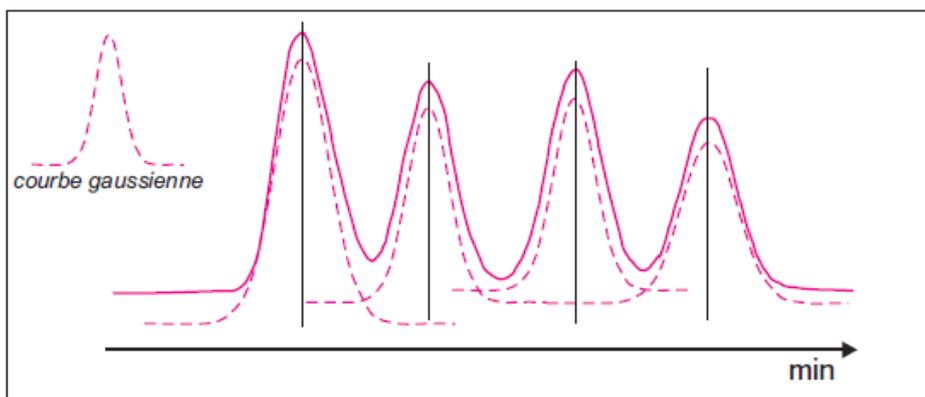


Fig. I.4 : Pics chromatographiques. a) Notion de temps de rétention ; b) exemple de tracé de la fonction 1.2 ; c) signification des trois paramètres classiques et résumé des caractéristiques d'une courbe de Gauss ; d) un exemple de chromatogramme réel qui montre que l'éluion des composés peut conduire à des pics qui ressemblent vraiment à des courbes gaussiennes.

I- 5 Définition de la chromatographie

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leur adsorption et de leur désorption successives sur la phase stationnaire, soit de leur solubilité différente dans chaque phase.

On distingue quatre types de phénomènes que nous allons étudier successivement:

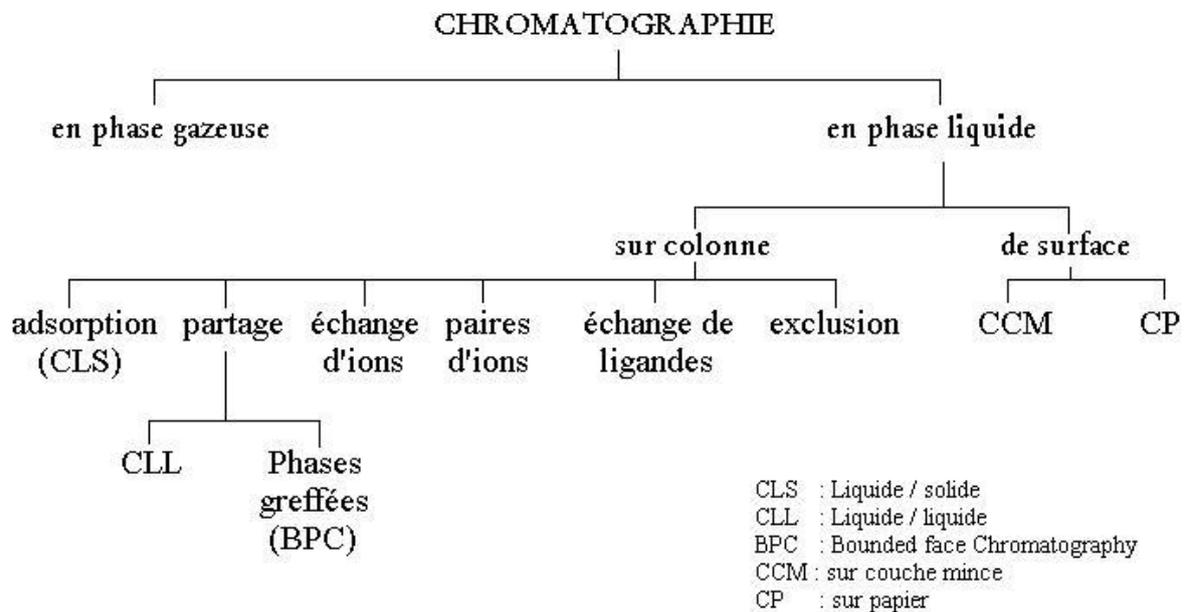
- Chromatographie d'adsorption
- Chromatographie de partage
- Chromatographie ionique
- Chromatographie d'exclusion

Les méthodes chromatographiques diffèrent selon la nature des phases :

Phase stationnaire : dans une colonne au travers de laquelle progresse la phase mobile par gravité ou sous l'action d'une différence de pression chromatographie sur colonne
- sur une surface plane chromatographie sur couche mince (CCM)

Phase mobile : phase qui se déplace sur ou à travers la phase stationnaire, entraînant avec elle l'analyte. Le processus d'entraînement de cet analyte est appelé élution. La phase mobile peut être un liquide ou un gaz.

Le schéma ci-dessous récapitule les différents types de chromatographie utilisées en laboratoire

Chromatographie :**Fig. I.5** : Différents types de chromatographie**I-6 chromatographies d'adsorption :**

- La chromatographie liquide-solide (CLS) ou d'adsorption la (plus ancienne et la plus générale) : la phase stationnaire est un adsorbant solide polaire (silice ou alumine) : chromatographie sur colonne ou CCM. L'analyte adhère à la phase stationnaire par physisorption et chimisorption ce qui fait intervenir une grandeur physique importante : le coefficient d'adsorption. La phase stationnaire peut être modifiée pour être apolaire : chromatographie d'adsorption en phase inverse.

- La chromatographie par échange d'ions ou chromatographie ionique : la phase stationnaire est une résine échangeuse d'ions (polymère porteur de groupements Ionisés, négativement pour séparer des cations, positivement pour séparer des anions) : interactions électrostatiques.

- La chromatographie d'affinité : la phase stationnaire est ici un substrat inerte sur lequel est greffé un "effecteur" qui présente une affinité pour un soluté de l'échantillon à analyser (affinité enzyme-substrat, ligand-récepteur, antigène-anticorps). (Franck, 2004)

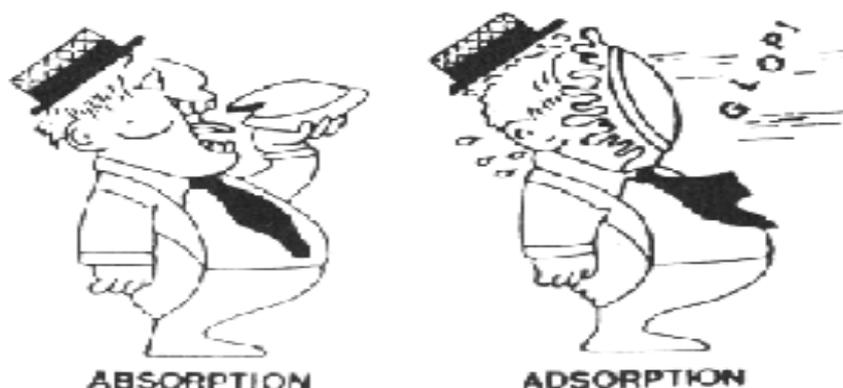


Fig. I.6 : Phénomènes d'adsorption et de partage.
L'adsorption est un phénomène d'interface à la différence de l'absorption

I- 7 chromatographies de partage :

- La chromatographie liquide-liquide (CLL) ou chromatographie de partage dans laquelle la phase stationnaire est un liquide immobilisé sur un support solide inerte : soit imprégnée dans un solide poreux (risques de lessivage), soit greffée sur le solide (phase greffée).

La séparation repose sur le coefficient de partage du soluté dans les deux phases liquides.

- La chromatographie d'exclusion, ou perméation de gel, ou tamisage moléculaire : la phase stationnaire est un solide poreux: les grosses particules sont exclues de la phase fixe, les petites particules incluses diffusent dans les pores du gel et sont donc retardés. (Franck, 2004)

I-8 Chromatographie par échange d'ions :

La chromatographie ionique est la méthode de choix pour la séparation d'espèces ioniques par chromatographie en phase liquide. Elle a été introduite comme méthode-HPLC au milieu des années soixante-dix par la technique à deux colonnes et a ensuite été utilisée au début des années quatre-vingt sous forme de technique à colonne unique. (Ndiye ,1998)

La phase stationnaire est formée de groupements fonctionnels acides ou basiques qui permettent l'échange de contre ions avec des ions de même signe de l'échantillon. La séparation repose sur les coefficients de distribution ionique.

I-9 Chromatographie d'exclusion et diffusion :

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC : size exclusion chromatographie) Est une technique de séparation de molécules selon leurs volumes hydrodynamiques en solution. Selon l'application et les milieux utilisés, cette technique est appelée Différemment :

- milieux aqueux : filtration de gel (GFC : gel filtration chromatographie)
- milieux organiques : perméation de gel (GPC : gel perméation chromatographie)

Nous utiliserons le terme SEC dans cette étude.

Cette technique est très largement utilisée pour déterminer les poids moléculaires et les distributions massiques de polymères naturels ou synthétiques, de protéines, de Nanoparticules. Elle est facile de mise en œuvre et l'élue gramme (chromatogramme) peut Être, en principe, directement corrélé avec les poids moléculaires des macromolécules.

I-9-1 Principe de séparation :

La séparation des molécules est basée sur leurs volumes hydrodynamiques (V_h) Ou leur rayon (R_h) et non sur leurs poids moléculaires. La séparation est réalisée en solution sur une colonne remplie d'une phase stationnaire poreuse (gel de polystyrène réticulé par du di vinylbenzène, gel de silice,...). Les molécules de tailles importantes ne pouvant pas entré dans les pores de la phase stationnaire sont éluées plus rapidement que les molécules de tailles plus petites. (Chantal, 2010)

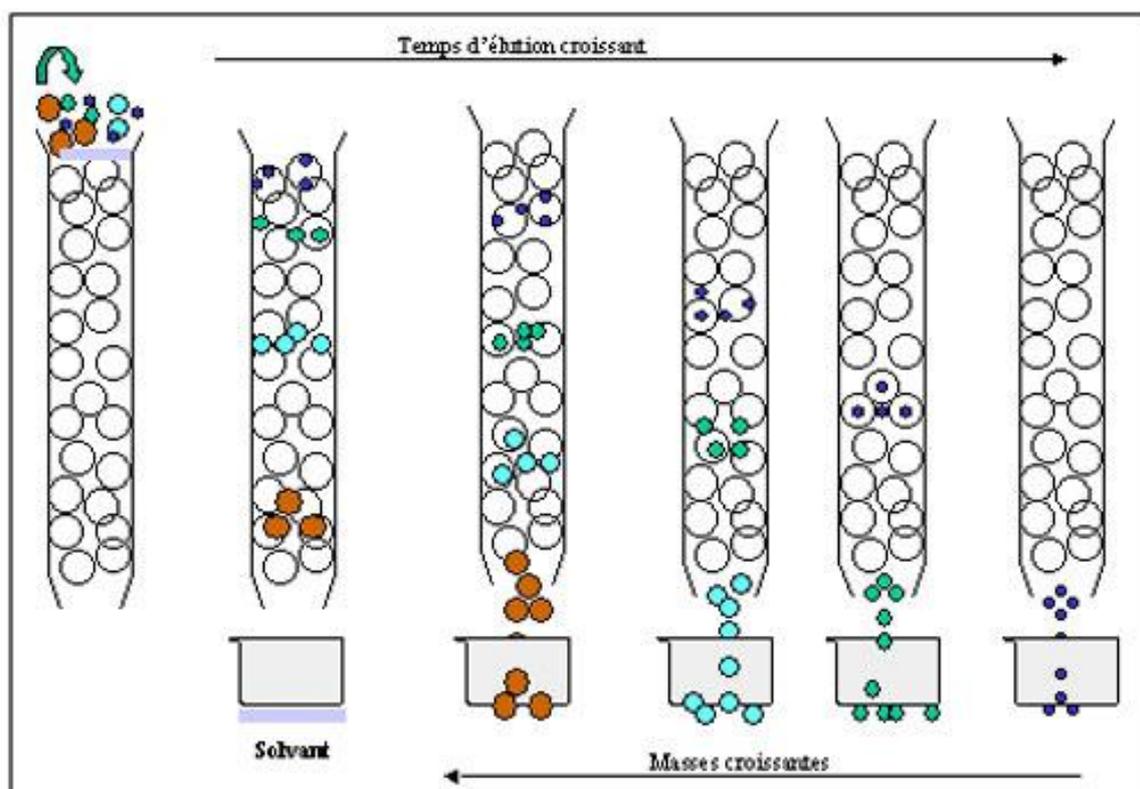


Fig. I.7 : Principe de séparation en chromatographie d'exclusion

I-10 Chromatographie sur couche mince (CCM) :

I-10-1 Définition et appareillage :

La chromatographie sur couche mince (C.C.M) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption ; la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants qui progressent le long d'une phase stationnaire (gel de silice, polyamide, cellulose...) fixée sur une plaque de verre (20x20 cm) ou sur feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Cette technique prise dans sa forme préparative est souvent utilisée en dernier lieu. En effet, lorsque le système de solvant ou l'éluant est bien choisi, cette technique utilisée sous sa forme préparative, est souvent très avantageuse car la transposition à partir de C.C.M analytiques est facile. Le procédé est rapide et permet d'isoler des quantités de substances suffisantes pour des analyses de structures. Cette méthode permet la plupart du temps d'obtenir des produits purs.

L'application de ces techniques chromatographiques, d'une manière systématique ou sélective permet à coup sûr d'obtenir des produits purs. A ce stade, le degré de pureté est apprécié par les résultats de différents contrôles chromatographiques effectués sur les produits isolés. Ces contrôles doivent nécessairement être effectués dans au moins deux ou trois systèmes de solvants différents. Ce n'est qu'à ce moment que les produits isolés seront enfin prêts purs et propres) pour l'opération d'identification structurale. (Boutti, 2000)

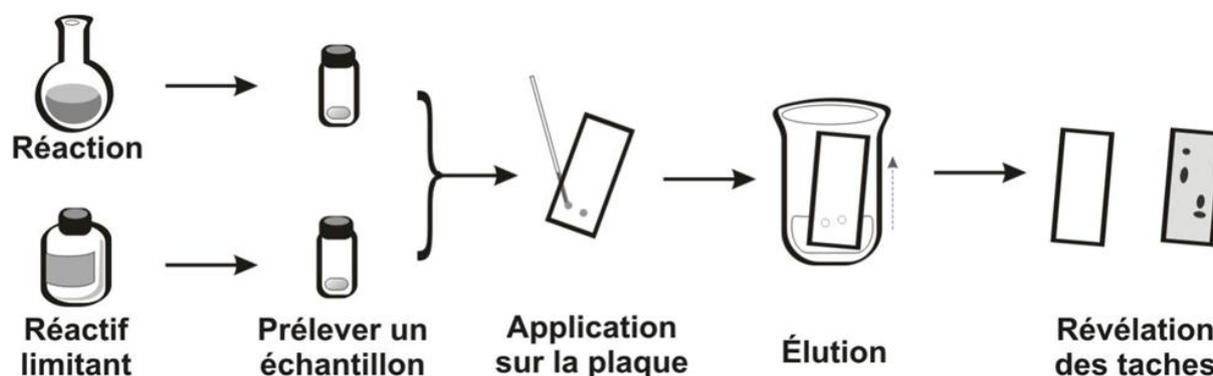


Fig. I.8 : principe de séparation par chromatographie CCM

Les principaux éléments d'une séparation chromatographique sur couche mince sont:

- la cuve chromatographique : un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche.
- 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 à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté (plâtre de Paris) l'amidon ou un polymère organique.
- l'échantillon : environ un microlitre (μl) de solution diluée (2 à 5 %) du mélange à analyser, déposé en un point repère situé au-dessus de la surface de l'éluant.
- l'éluant : un solvant pur ou un mélange : il migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon.

I-10-2 Application et technique :

Lorsque les conditions opératoires sont connues, elle permet un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé organique. Si l'analyse, réalisée avec divers solvants et différents adsorbants, révèle la présence d'une seule substance, on peut alors considérer que cet échantillon est probablement pur. De plus, étant donné que la chromatographie sur couche mince indique le nombre de composants d'un mélange, on peut l'employer pour suivre la progression d'une réaction. La chromatographie sur couche mince est également la technique habituellement employée pour rechercher le meilleur solvant, avant d'entreprendre une séparation par chromatographie sur colonne.

I-10-3 Adsorbants et plaques chromatographiques :

Par ordre d'importance décroissante, les adsorbants employés en CCM sont : le gel de silice, l'alumine, le kieselguhr et la cellulose. Les plaques vous seront fournies prêtes à l'emploi.

I-10-4 Choix de l'éluant.

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

I-10-5 Dépôt de l'échantillon.

L'échantillon est mis en solution (2 à 5 %) dans un solvant volatil, qui n'est pas forcément le même que l'éluant : on emploie fréquemment le trichlorométhane (chloroforme), la propanone ou le dichlorométhane. La solution est déposée en un point de la plaque situé à environ 1 cm de la partie inférieure.

Il est important que le diamètre de la tache produite au moment du dépôt soit faible; idéalement, il ne devrait pas dépasser 3 mm. Ce sont généralement les dépôts les moins étalés qui permettent les meilleures séparations. Pour augmenter la quantité déposée, il est toujours préférable d'effectuer plusieurs dépôts au même point, en séchant rapidement entre chaque application plutôt que de déposer en une seule fois un grand volume d'échantillon qui produirait une tache plus large.

L'échantillon est déposé à l'aide d'une micropipette ou d'un tube capillaire en appuyant on vérifie l'identité des composants présumés d'un échantillon, en procédant à un dépôt Séparé d'une solution de chacun d'eux puis à celui de leur mélange. Ces solutions témoins permettent de comparer la migration de chaque composé avec celle de l'échantillon à Analyser.

I-10-7 Développement de la plaque.

Le développement consiste à faire migrer le solvant sur la plaque. Dans les analyses usuelles de laboratoire, le principal type de développement est la chromatographie

Ascendante : la plaque est placée en position verticale dans une cuve et le solvant qui en recouvre le fond monte par capillarité.

Le niveau de liquide est ajusté à environ 0,5 cm du fond de la cuve; on place souvent du papier filtre contre les parois de la cuve pour saturer plus rapidement la cuve en vapeurs d'éluant et éviter les effets de bords. Pendant le développement du chromatogramme, la cuve doit demeurer fermée et ne pas être déplacée.

Lorsque la position du front du solvant arrive à environ 1 cm de l'extrémité supérieure, 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.

I-10-8 Révélation.

L'identification des substances isolées se fait selon différentes méthodes (valable également pour la chromatographie sur papier):

- directement si les substances sont colorées
- à l'aide de révélateurs si elles sont incolores afin de les transformer en taches colorées; les produits sont souvent décelés par leurs réactions fonctionnelles classiques:

les acides aminés par la ninhydrine qui donne avec la plupart une couleur bleu-violet, les acides organiques par des indicateurs colorés, les sucres par le réactif de Molisch qui utilise le pouvoir réducteur des sucres. Quelques réactifs Comme l'iode ou le permanganate donnent des colorations non spécifiques avec la plupart des composés organiques.

- toutes les substances ayant une absorption dans la région au-dessus de 230 nm sont étudiées sur des supports additionnés de corps fluorescents par irradiation de lumière UV à ondes courtes ($\lambda_{\max} < 254$ nm). L'emploi de couches non additionnées de produits fluorescents permet aussi la mise en évidence de beaucoup de substances dans l'UV à ondes courtes ($\lambda_{\max} < 254$ nm) ou à ondes longues ($\lambda_{\max} > 366$ nm) par suite de la fluorescence propre des composés.

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.

I-10-9 Calcul de Rf (rapport frontal ou retarding factor) :

Le rapport frontal Rf est une caractéristique de chaque soluté à la température de l'expérience. il est toujours indépendant de la longueur de la bande utilisée. il peut être déterminé à partir de l'équation ci-dessous :

Formule :

$$Rf = \frac{DI}{DS}$$

Di : distance parcourue par le composé (mesure au centre de la tache)

Ds : distance parcourue par le front du solvant Pour un couple éluant et support déterminé,

I -10-10 Description d'une analyse par CCM selon l'ordre chronologique :

a-Préparation de la cuve chromatographique :

- Introduire l'éluant ou le mélange de solvants.
- Ajuster le niveau à environ 0,5 cm du fond de la cuve.
- Fermer le récipient (la cuve doit être saturée de vapeur de solvant). Pour que la saturation et l'élution soient plus rapides, on peut placer une bande de papier filtre contre les parois de la cuve chromatographique.

b-Dépôt de l'échantillon sur la plaque :

- Procéder au nettoyage de la plaque si nécessaire.
- Dissoudre l'échantillon dans un solvant approprié en solution de 2 à 5 %.
- Déposer environ 0, 5 μ l de la solution en un point situé à 1 cm de l'extrémité Inférieure de la plaque; le diamètre de la tache doit être d'environ 2 mm pour la disposition de plusieurs produits.
- Sécher à l'aide d'un séchoir; éventuellement faire de nouvelles applications

c-Développement du chromatogramme :

- Placer la plaque dans la cuve en position verticale.
- Refermer le récipient.
- Lorsque le front du solvant se trouve à environ 1 cm de l'extrémité supérieure de la plaque, la retirer et marquer cette position. (Le trait peut être tracé à l'avance et servir de repère pour arrêter l'élution).

d-Révélation et calcul de Rf :

- Sécher la plaque à l'aide d'un séchoir
- Révéler les taches sous une lampe U V ou à l'aide d'un révélateur
- Cercler les taches et pointer leur centre.
- Calculer les Rf

I -11 Chromatographie d'affinité :

Très utilisée par les biochimistes, elle consiste à fixer par exemple une enzyme sur la phase stationnaire de façon à complexer sélectivement les substrats correspondants (ou vice versa). Il s'agit là d'une association entre une molécule polyfonctionnelle et une phase stationnaire

comportant des sites stériquement définis et de capacité d'échange multiple. Il s'agit souvent d'un système coopératif d'interactions différentes (ioniques, hydrophobe, Van der Waals, hydrogène), liaisons parfaitement positionnées dans l'espace. Il est bon de rappeler qu'il ne peut pas exister de phase stationnaire « inerte ». Quelle que soit sa structure elle sera toujours capable de donner des interactions d'un type donné. Dans la mesure où le système requiert un niveau d'interaction le plus faible possible, c'est par les choix judicieux des phases mobiles et stationnaires qu'il sera possible d'y parvenir. (Jean, 1999)

I -12 Chromatographie sur papier :

I -12-1 Principe de la technique et applications:

Pour connaître les colorants contenus dans un mélange, on dépose une goutte de ce mélange sur un papier à chromatographie dont l'extrémité trempe dans de l'eau faiblement salée.

L'eau salée monte le long du papier, on dit qu'elle migre, entraînant les colorants qui se séparent les uns des autres. On peut ensuite comparer la migration des colorants de ce mélange à celle de colorants connus.

La chromatographie sur papier est une méthode de séparation dont le principe repose surtout sur des phénomènes de partage. La phase mobile est le plus souvent un solvant organique et

L'eau ; la phase stationnaire est constituée par l'eau elle-même, adsorbée par la cellulose du papier ou liée chimiquement à elle. Comme en chromatographie sur couche mince, l'échantillon, mis en solution, est déposé en un point repère du papier et le solvant qui se déplace par capillarité fait migrer les composants de l'échantillon à des vitesses variables Selon leur solubilité. Généralement, les composés les plus solubles dans l'eau ou ceux qui forment facilement des associations par liaisons hydrogène sont fortement retenus par la phase stationnaire et migrent donc lentement.

Lorsque l'eau est un des solvants de la phase mobile, le ou les solvants organiques doivent y être assez solubles. C'est pourquoi, des produits comme l'acide éthanoïque, le propanol, le phénol, ou la pyridine sont les solvants les plus fréquemment mélangés avec l'eau pour développer un chromatogramme.

La chromatographie sur papier est employée principalement pour l'analyse de composés très polaires, tels que les acides aminés, les sucres et les composés polyfonctionnels. Ses plus Grands inconvénients par rapport à la chromatographie sur couche mince sont :

- une durée de développement beaucoup plus longue

- une séparation généralement moins bonne.

I -12-2 Papier

On peut employer du papier filtre ordinaire, mais il est préférable de se procurer du papier conçu pour cet usage, ayant un faible taux d'impuretés et dont les caractéristiques physiques sont uniformes.

Les marques principales sont Whatman, Schleider et Schüll, Durieux, Arches. Il existe huit catégories de papier Whatman, classés selon leur épaisseur, la texture de leur surface et la vitesse avec laquelle l'eau y diffuse. Par exemple, le papier Whatman n°1 est le plus utilisé, mais si on désire une grande vitesse d'écoulement, on emploiera le n°4 ; le papier n°20 est très lent, mais il permet une meilleure séparation, donnant les taches très denses et uniformes.

I -12-3 Protocole :

La fraction est déposée sous forme de bande fine sur le papier, qui sera placée par la suite dans une cuve muni d'un support, contenant la phase mobile. Le système de solvants utilisé est choisi après plusieurs essais. après le développement et le séchage du chromatogramme, les bandes séparées sont marquées et délimitées dans une chambre sous la lumière UV, suivie d'une révélation chimique (vapeurs de NH₃) puis encore sous la lumière UV à 254 et 366 nm pour noter les Changements de couleurs. Ces bandes sont découpées et plongées dans du méthanol pour Solubiliser le produit séparé, qui est destiné pour d'autres analyses. (Mahdiar, 2013)

I -13 Chromatographie sur colonne :

I -13-1 descriptions et principe :

La chromatographie sur colonne est une méthode importante pour la séparation d'un produit contenant des impuretés difficiles à enlever par distillation ou cristallisation. Cette technique sert également à séparer des produits organiques d'un mélange. Il existe deux types de chromatographie

- la première est celle avec l'oxyde d'aluminium, tandis que la deuxième est celle avec le gel de silice (c'est la plus moderne des deux). Les deux ont le même principe d'utilisation, cependant la première se fait avec plusieurs solvants allant du moins polaire au plus polaire. Je vais utiliser

- la deuxième méthode pour faire cette expérience. Cette dernière me permettra de travailler avec un seul mélange de solvant, ce qui est plus pratique ; avec cette méthode le rendement final est en général assez bon.

Les diverses substances introduites au sommet de la colonne de gel de silice sont plus ou moins retenues à la surface du support, suivant leur polarité. Elles sont donc plus ou moins facilement entraînées par le solvant qui migre dans la colonne. Le plus polaire passera en premier et ainsi de suite.

Son principe :

Des billes (ou perles) microscopiques qui contiennent de minuscules trous sont rassemblées dans une colonne. Le mélange de molécules est dissous dans un liquide et ensuite mis dans une colonne qui contient ces billes poreuses. Les plus grosses molécules passent plus vite à travers les perles, alors que les plus petites entrent et sont freinées par les pores des billes, et descendent dans la colonne plus lentement. Selon les molécules, les protéines peuvent être séparées, en se basant seulement sur leur taille. Les éléments plus rapides sont collectés en premier et mis de côté, puis les autres éléments sont à leurs tours collectés. On obtient ainsi les éléments séparés les uns des autres.

I-13-2 Paramètre fondamentaux de la chromatographie d'éluion en colonne :

a- Le volume ou le temps de rétention :

Soit la séparation de deux composés par chromatographie de partage. Un des paramètres les plus importants en chromatographie sur colonne est le volume de rétention qui s'exprime comme

$$V_m \text{ (ml)} = Tr \text{ (sec)} D \left(\frac{\text{ml}}{\text{sec}} \right)$$

Ou Tr = temps de rétention

D = débit de la phase mobile

Et pour un soluté non retenu, ce volume devient:

$$V_m \text{ (ml)} = t_m \text{ (sec)} D \left(\frac{\text{ml}}{\text{sec}} \right)$$

Ou V_m = volume mort

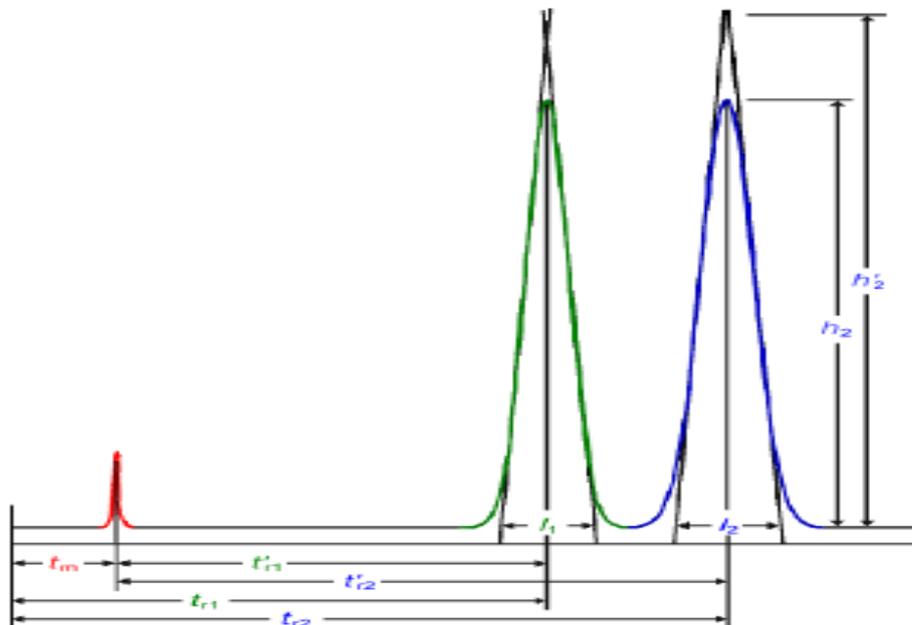
t_m = temps mort

D =débit de la phase mobile

Le temps de rétention est habituellement utilisé à la place du volume de rétention et sa grandeur dépend:

- de la nature de la phase stationnaire
- de la nature de la phase mobile
- du débit de la phase mobile
- de la longueur de la colonne

b- Le facteur de capacité k' :



T_m = temps de rétention d'une substance non retenue sur la colonne
 T_r = temps de rétention
 L = largeur du pic à la base
 h = hauteur du pic

Fig. I.9 Chromatogramme typique montrant la séparation de deux constituants d'un mélange et les différents paramètres mesurables.

Ce facteur s'apparente au coefficient de partage puisqu'il exprime le rapport de la quantité de Soluté dans la phase stationnaire à la quantité de soluté de la quantité de soluté dans la phase stationnaire à la quantité de soluté de la quantité de soluté dans la phase stationnaire à la quantité de

soluté rétention. Il a l'avantage de ne dépendre ni du débit ni de la longueur de la colonne. Il est facilement calculé pour une substance dont le temps de rétention est t_r par l'expression:

$$K' = \left(\frac{t_r - t_m}{t_m} \right)$$

e- Le facteur de sélectivité α :

Ce facteur de sélectivité ou de séparation, sans dimension, est égal au rapport des facteurs de capacité de deux solutés dont on veut réaliser la séparation. Il s'exprime comme ceci :

$$\alpha = \left(\frac{K'_2}{K'_1} \right) = \left(\frac{t_{r2} - t_m}{t_{r1} - t_m} \right)$$

Ou k'_1 =facteur de capacité du composé 1

K'_2 = facteur de capacité du composé 2

Tr_1 =temps de rétention du composé1

Tr_2 = temps de rétention du composé 2

T_m =temps de rétention d'une substance non retenue

f- La résolution R_s :

La résolution est une mesure de la qualité d'une séparation. Deux caractéristiques déterminent le degré de recouvrement des pics: a) la distance séparant les sommets de deux pics mesurée par $t_{r2} - t_{r1}$; b) la largeur des pics à la base I_1 et I_2 . La résolution R d'une colonne donne la mesure quantitative de son aptitude à séparer deux Solutés. (Robert, 1998)

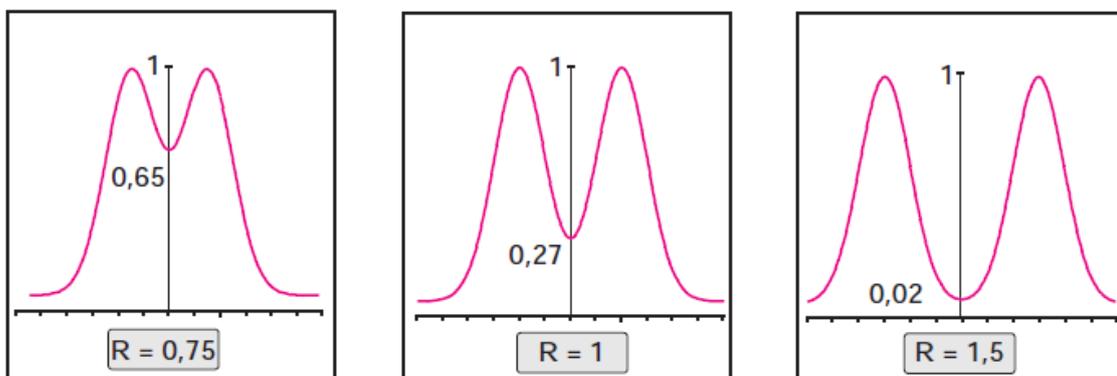


Fig I.10: Facteur de résolution.

Simulation de pics chromatographiques par juxtaposition plus ou moins rapprochée de 2 courbes gaussiennes identiques. Aspect visuel correspondant aux valeurs de R indiquées sur les diagrammes. À partir de $R = 1,5$ on considère que les pics sont résolus, la vallée entre les pics étant d'environ 2 %.

Une résolution de 1,5 permet la séparation pratiquement complète de 1 et 2, ce qui n'est pas le cas pour une résolution de 0,75. Pour une résolution de 1 le pic de 1 contient environ 4% de 2 et le pic de 2 environ 4% de 1. Pour une résolution de 1,5 le chevauchement est d'environ 0.3%. Pour améliorer la résolution, il faut soit allonger la longueur de la colonne pour avoir un nombre de plateaux théoriques plus grand, soit changer les conditions opératoires de l'analyse (Température, phase mobile...).

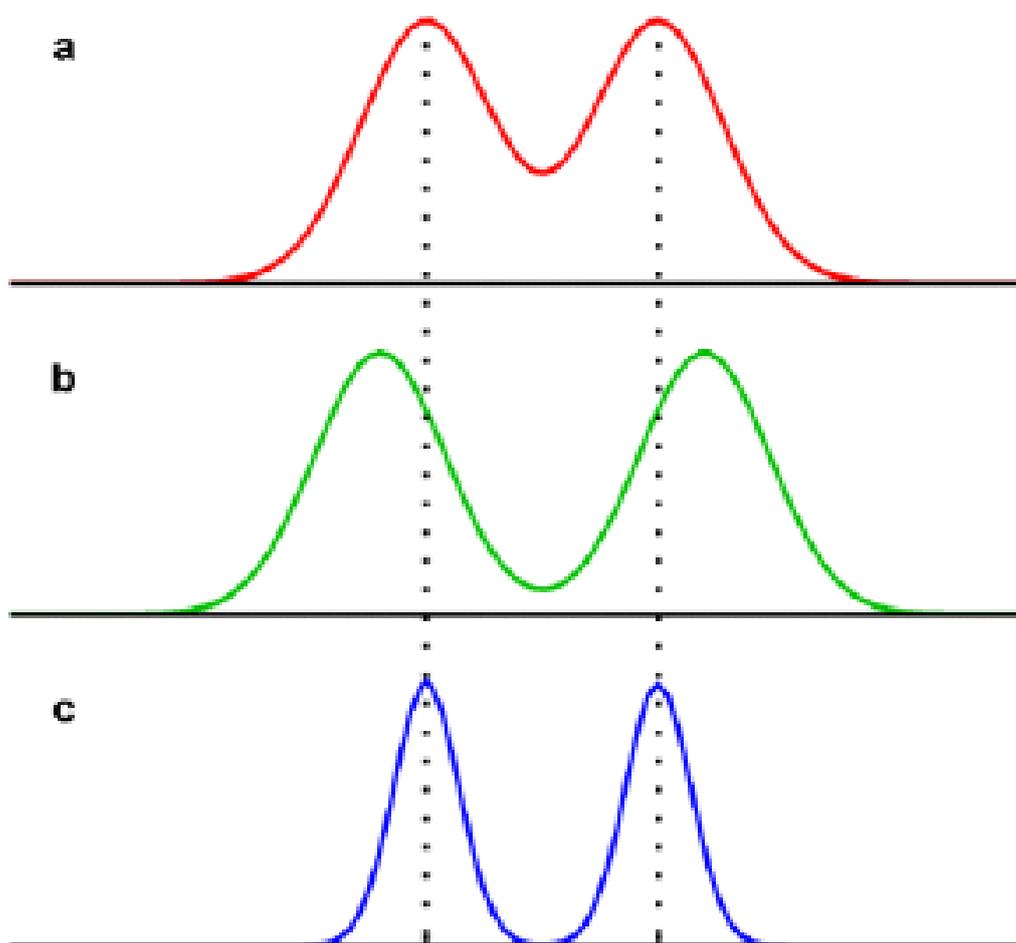


Fig. I.11 : ci-dessus, la séparation idéale est réalisée en c) où la valeur de R_s est un peu plus grande

que 1. **Rs** Exprimée en termes de volume de rétention, la résolution est égale à

$$R=2\left(\frac{Vr2-Vr1}{I2-I1}\right)$$

Exprimée en termes de temps de rétention, la résolution est égale à

$$R = 2\left(\frac{tr2-tr1}{I2-I1}\right)$$

g- Le nombre de plateaux théoriques N :

C'est un paramètre qui sert à mesurer la performance d'une colonne à distillation fractionnée. Autant il est souhaitable dans une distillation fractionnée d'avoir le plus de distillations simples possibles pour obtenir la meilleure séparation des constituants d'un mélange autant il est souhaitable que le passage d'une substance de la phase mobile à la phase stationnaire et inversement se fasse sur la distance la plus courte possible. Le nombre de fois que ce phénomène se passe correspond à un plateau théorique.

$$N=16\left(\frac{tr2-tm}{I}\right)^2$$

I= largeur du pic à la base

$$N=5.54\left(\frac{tr -tm}{W}\right)^2$$

W=Largeur du pic à mi hauteur

La hauteur équivalente à un plateau théorique h est :

$$h=\frac{LC}{N}$$

LC = longueur de la colonne

N = nombre de plateaux théoriques

L'équation de la résolution **Rs** vue plus haut est très utile pour mesurer le degré de séparation mais ne relie pas les paramètres fondamentaux de la chromatographie, sélectivité, facteur de capacité et nombre de plateaux théoriques à la résolution. C'est pourquoi on utilise:

$$R=\frac{1}{4}\sqrt{N2}\frac{\alpha-1}{\alpha}\frac{K'2}{1+K'2}$$

I -13-3 Remplissage de la colonne:

C'est l'opération la plus délicate car le remplissage doit être le plus homogène possible et exempt de bulle d'air. Les surfaces inférieure et supérieure de l'adsorbant doivent être parfaitement horizontales. La colonne étant verticale, le remplissage peut être réalisé selon deux méthodes au choix.

a-Remplissage par voie humide:

On prépare dans un bécher un mélange homogénéisé de l'adsorbant et du moins polaire des solvants utilisé pour le développement en ajoutant par petites quantités l'adsorbant dans le solvant pour obtenir une bouillie suffisamment fluide pour couler facilement. A l'aide d'un entonnoir, on verse suffisamment de bouillie pour que l'adsorbant qui se dépose progressivement forme une couche d'environ 2 cm. On tapote les parois de la colonne pour favoriser le tassement de l'adsorbant. On ouvre alors le robinet pour que le solvant s'écoule lentement et on poursuit l'addition de la bouillie homogénéisée par portions successives. Quand tout l'adsorbant est introduit, on laisse décanter jusqu'à ce que le liquide qui surnage soit limpide. Pendant l'opération, on doit veiller à ce que le niveau de solvant soit toujours supérieur à celui de l'adsorbant.

b-Remplissage par voie sèche:

La colonne est remplie au deux tiers par le moins polaire des deux solvants et l'adsorbant en poudre est ajouté en portions successives dans la colonne à l'aide d'un entonnoir; pendant l'addition, on frappe continuellement sur les parois pour obtenir un tassement maximal. Quand la première portion forme une couche d'environ 2 cm, on ouvre le robinet pour faire couler lentement le solvant. On termine comme précédemment.

I -13-4-Efficacité d'une colonne :

Les pics étant supposés Gaussiens, on peut caractériser l'élargissement des pics, d'autant plus important que l'efficacité de la séparation est faible, par un nombre de Plateaux théoriques n , semblable à celui rencontré pour la distillation fractionnée.

Pour une gaussienne vraie, n s'exprime des trois manières suivantes:

$$N = \left(\frac{t_r}{\sigma} \right)^2 \quad \text{Où } \sigma \text{ est l'écart-type de la gaussienne exprimé en unité de temps,}$$

$N=16 \left(\frac{t_r}{\omega\sigma} \right)^2$ Où ω est la largeur du pic à la base exprimée en unité de temps, déterminée Par l'intersection des tangentes aux points d'inflexion à la courbe gaussienne et de la Ligne de base, et
 $N=5.54 \left(\frac{t_r}{\omega\delta\sigma} \right)^2$ Où δ est la largeur du pic à mi - hauteur, exprimée en unité de temps.

En pratique, on mesure directement t_r , δ et ω sur le chromatogramme. Pour pouvoir comparer entre elles des colonnes de différentes longueurs, on définit la Hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT), de la manière suivante: $H = L/N$ où L est la longueur de la colonne. Une colonne efficace présente souvent une HEPT de Quelques microns (colonnes capillaires en CPG).

Chapitre II
Initiation à La spectroscopie

II-1 Définition :

La spectroscopie est l'étude des rayonnements électromagnétiques émis, absorbés ou diffusés par la matière. Celle-ci effectue une transition d'un état quantique à un autre état quantique. L'analyse des rayonnements en leurs différentes fréquences s'effectue à l'aide d'appareils appelés spectrographes ou spectromètres : elle permet d'obtenir leurs spectres électromagnétiques. (Guedira, 2014)

II -2 Principe:

Dans une molécule, les transitions électroniques UV-visibles mettent en jeu les énergies les plus importantes de la chimie (environ de 13000 à 50000 cm^{-1} soit 160 à 665 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). L'ordre de grandeur des énergies mises en jeu est celui des énergies de liaison des molécules et ces rayonnements peuvent parfois provoquer des ruptures de liaisons. Plus généralement, ils provoquent des transitions électroniques entre les différents niveaux d'énergie des molécules. (Guedira, 2014)

II -3 Spectre, spectroscopie et spectrométrie :

La spectroscopie est l'étude du spectre électromagnétique d'un phénomène, visuellement (d'où le suffixe -scopie). Depuis un certain temps, maintenant, l'œil a été remplacé par différents types de détecteurs photoélectriques, moins subjectifs et il convient alors de parler de spectrométrie (le suffixe -mètre indiquant que l'on effectue une mesure et non une simple appréciation du phénomène). A de nombreux endroits de ce cours, il conviendrait donc de remplacer le terme « spectroscopie », par le terme plus exact de « spectrométrie » toutefois, les vieilles habitudes ayant la vie dure, il est courant de faire l'amalgame entre ces deux termes.

Quoiqu'il en soit, il nous reste à définir le spectre. Il s'agit de la distribution en énergie, puissance, intensité, absorbance, transmission, etc. (signal en général) en fonction de la longueur d'onde ou de la fréquence. On distingue 3 types de spectres :

Les spectres continus, pour lesquels il existe un « signal » pour chaque longueur d'onde (ou fréquence).

Les spectres discontinus, ou spectres de raies, ou encore spectres discrets, qui ne disposent d'un signal que pour certaines fréquences (longueurs d'onde) spécifiques, caractéristique de la matière irradiante ou irradiée les spectres combinés qui sont constitués d'une superposition d'un spectre continu et d'un spectre discret. Ex.

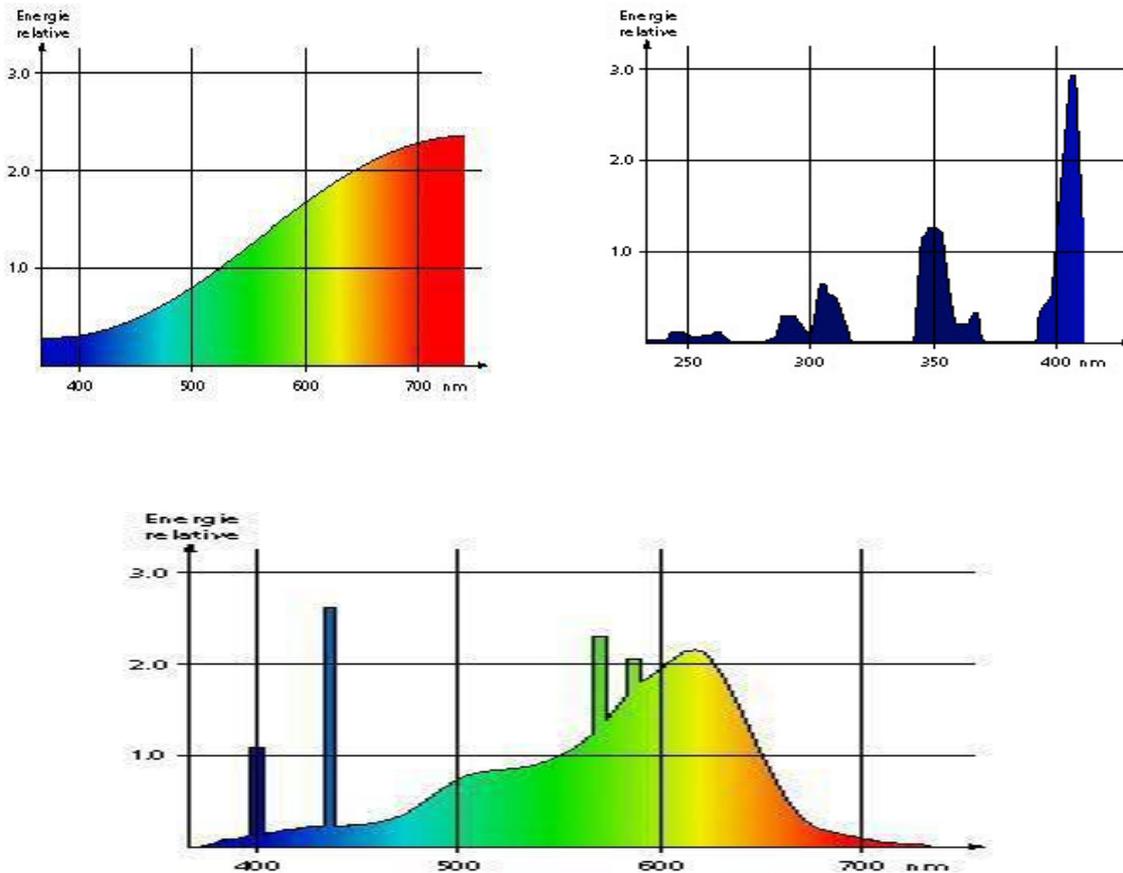


Fig. II.1 qui montre un exemple sur les spectres combinés qui sont constitués d'une superposition d'un spectre continu et d'un spectre discret.

II -4 Rayonnement électromagnétique :

Le rayonnement électromagnétique, dont la lumière est un exemple, est une forme d'énergie constituée d'ondes, c'est-à-dire de phénomènes vibratoires caractérisés par : une vitesse de propagation (en l'occurrence $c = 3.108 \text{ m.s}^{-1}$, constante pour toutes les ondes électromagnétiques dans le vide), une fréquence ν (nombre de vibrations par seconde) et une longueur d'onde λ (distance parcourue pendant une vibration). Ces 3 longueurs sont liées par la relation $\lambda = c / \nu$. Bien qu'il y ait une continuité totale dans les valeurs possibles de longueur d'onde (ou de fréquence), on distingue (arbitrairement) sur cette base des domaines particuliers du rayonnement électromagnétique, comme indiqué sur la figure 4.1. Il est bon de rappeler également que l'énergie d'un rayonnement électromagnétique est reliée à sa fréquence par la relation $E = h\nu$.

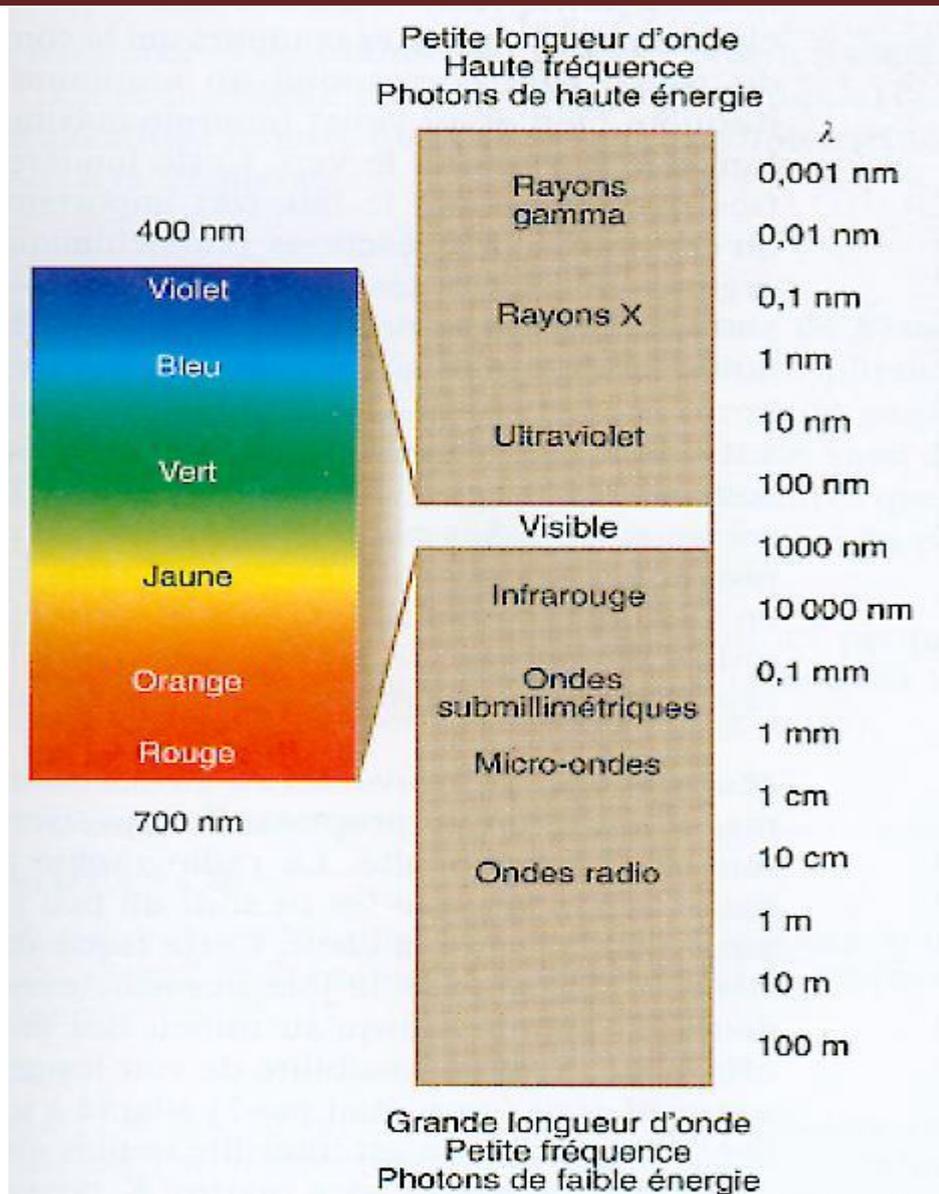


Fig. II.2: Domaines particulière du rayonnement électromagnétiques

A chacun des domaines particuliers du rayonnement électromagnétique, ou presque, correspond un type de spectroscopie qui repose sur une interaction particulière de la matière avec ce rayonnement. Ainsi pour le domaine :

Des γ et des RX, le rayonnement est extrêmement énergétique et il va pouvoir affecter les électrons des orbitales atomiques de cœur. Ces Interactions sont utilisées notamment dans la spectroscopie γ et dans la fluorescence X.

Des UV et du visible, le rayonnement est énergétique et il va pouvoir affecter les électrons des orbitales atomiques périphériques et/ou des orbitales moléculaires. Ces interactions sont utilisées notamment dans la spectroscopie d'émission atomique (SEA), la spectroscopie d'absorption atomique (SAA) et la spectroscopie moléculaire (UV-vis).

De l'infra rouge (IR) le rayonnement est faiblement énergétique et ne peut affecter principalement que les modes de vibration des molécules. Ces interactions sont utilisées notamment dans la spectroscopie IR et la spectroscopie raman.

Des micro-ondes, finalement, le rayonnement est très faiblement énergétique et ne peut affecter que les modes de rotation des molécules. Ces interactions sont utilisées notamment dans la spectroscopie micro-onde.

Dans le cadre de ce cours, nous écarterons les deux domaines extrêmes pour ne nous attarder que sur l'UV-vis. Et l'IR.

II -5 La spectroscopie d'émission:

Nous avons vu que la plupart des éléments (60) du tableau périodique peuvent être analysés par absorption atomique. Pourquoi alors recourir à des méthodes telles que l'émission atomique? Or les techniques d'émission atomique en flamme et en plasma sont largement utilisées, ce qui ne serait pas le cas si les chimistes analytiques n'y voyaient pas des avantages par rapport à la spectroscopie d'absorption. Les techniques d'émission atomique présentent deux avantages majeurs. Certains éléments peuvent être analysés avec une plus grande sensibilité et moins d'interférences. L'émission atomique permet d'effectuer des analyses qualitatives, ce qui n'est pas le cas en absorption. En effet, c'est l'échantillon lui-même qui est la source de lumière dans une spectroscopie d'émission. Cela signifie que plusieurs éléments peuvent être analysés simultanément, ce qui représente un gain de temps appréciable, et donc un gain d'argent, même si un spectromètre d'analyse multiéléments en émission coûte beaucoup plus cher qu'un spectromètre d'absorption atomique.

II-6 Principe de fonctionnement:

II-6-1 Fondements des méthodes de mesure par absorption atomique

Règle de Bohr:

Dans le cas particulier de l'absorption atomique, on travaille sur des atomes libres à l'état fondamental ($W_i = 0$): ces atomes peuvent absorber des photons et passer ainsi à leurs différents états excités peu nombreux à cause des règles de sélection qui interdisent le nombre total de combinaisons que l'on pourrait réaliser entre les états excités et l'état Fondamental. Pour un atome, on peut donc faire de l'absorption sur les raies qui correspondent au passage état fondamental - états excités, mais avec une sensibilité différente liée aux coefficients d'einstein différents pour chaque niveau excité. Ces raies sont appelées raies de résonance bien que l'on réserve quelquefois cette appellation à la plus sensible d'entre elles. (Mines, 2014)

II -6-2 Principe d'un spectroscopie à réseau :

Dans un spectroscopie à réseau, la séparation des différentes radiations est due au phénomène de diffraction. Un réseau est une plaquette de verre ou de plastique sur laquelle on a gravé un grand nombre de traits parallèles, par exemple 1200 traits par millimètre. sur une longueur de 5 centimètres. Notre réseau est un réseau à réflexion. Ils sont plus chers mais plus efficaces. La diffraction est l'interaction de la lumière avec le bord des traits: chaque trait se comporte alors comme une source secondaire de lumière et tous les traits du réseau deviennent des sources synchrones (de même longueur d'onde). Si le faisceau de lumière provient d'une source étendue, soleil ou bleu du ciel, il faut le limiter par un écran muni d'une fente. On obtient alors derrière l'écran un faisceau lumineux fin de quelques centièmes de millimètre. On place derrière la fente un objectif photographique dont le plan focal objet coïncide avec le plan de la fente; dans ces conditions les rayons lumineux sortants de l'objectif est parallèle entre eux. Le système s'appelle un collimateur. Les rayons lumineux sortants de l'objectif arrivent sur le réseau et la lumière diffractée passe à travers un second objectif qui la fait converger sur le capteur CCD ou l'appareil photographique. Nous venons à peine de terminer notre spectroscopie solaire. Nous n'avons donc pas pu faire toutes les conclusions. Nous allons les faire cette semaine et vous les apporter le jour de l'oral.

II -7 La spectroscopie infrarouge :

II -7-1 Le rayonnement infrarouge:

Le rayonnement infrarouge (IR) fut découvert en 1800 par Frédéric Wilhelm A1Herschel. Ces radiations localisées au-delà des longueurs d'onde dans le rouge, sont situées entre la région du spectre visible et des ondes hertziennes. Le domaine infrarouge s'étend de 0,8 μm à 1000 μm . Il est arbitrairement divisé en 3 catégories, le proche infrarouge (0,8 à 2,5 μm soit 12500-4000 cm^{-1}), le moyen infrarouge (2,5 à 25 μm soit 4000-400 cm^{-1}) et le lointain infrarouge (25 à 1000 μm soit 400-10 cm^{-1}). (Fig. II .3)

Dès 1924, on s'est aperçu que l'énergie du rayonnement moyen infrarouge coïncidait avec celle des mouvements internes de la molécule. Ainsi, la relation entre l'absorption d'un rayonnement moyen-IR par une molécule et sa structure moléculaire sont mises en évidence. Même si les régions du proche IR et de l'IR lointain ont suscité un certain intérêt, l'utilisation de la spectroscopie moyen-IR reste la plus adaptée pour l'élucidation de la composition moléculaire d'un composé.

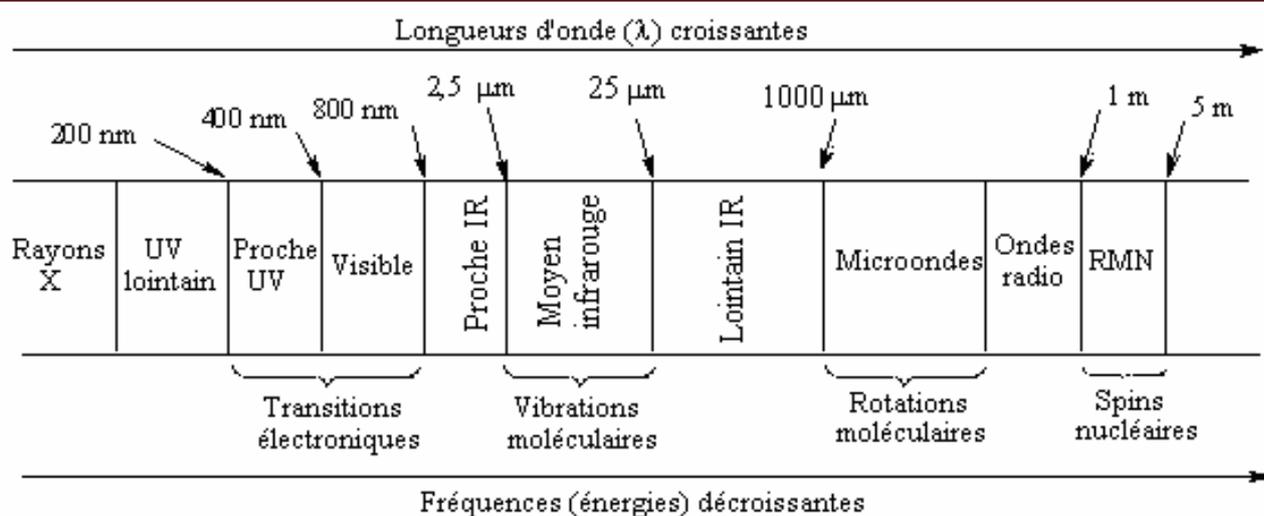


Fig. II .3 : Domaines de l'IR dans le spectre électromagnétique

II -7-2 L'analyse des données IR:

Les spectres IR contiennent des informations pertinentes sur les caractéristiques physiques et biochimiques des échantillons analysés. cependant, ces informations peuvent être parfois difficiles à extraire. L'utilisation des méthodes mathématiques, informatiques et D'analyse statistique multi variée forment une autre approche qui permet d'améliorer l'extraction et l'exploitation des informations spectrales sous-jacentes. Parmi ces méthodes, la classification hiérarchique, l'analyse en composantes principales ou encore l'analyse discriminante linéaire, sont les plus utilisées. La classification hiérarchique ascendante est une méthode d'analyse statistique qui regroupe les spectres en fonction de leur ressemblance sur le domaine spectral désiré. La classification hiérarchique est réalisée en utilisant un calcul qui permet de déterminer les distances euclidiennes entre les groupes de spectres suivant leurs ressemblances. L'algorithme de Ward est souvent utilisé pour ce calcul.

II -8 Application de la spectroscopie UV-visible:

a- Analyse qualitative:

Les spectres UV fournissent généralement peu de renseignements sur la structure moléculaire des composés comparés aux spectres IR. Néanmoins, on les utilise soit pour une confirmation soit pour une identification grâce aux règles empiriques.

b - Analyse quantitative:

L'analyse quantitative par la spectrométrie UV-visible est très employée (beaucoup plus que l'analyse qualitative) grâce à l'utilisation de la loi de Beer-Lambert.

Comme applications, on peut citer :

- _ Dosage du fer dans l'eau ou dans un médicament
- _ Dosage des molécules actives dans une préparation pharmaceutique
- _ Dosage du benzène dans le cyclohexane

c - Autres applications:

D'autres applications sont connues pour le Contrôle Qualité ou le suivi de la cinétique d'une réaction, la détermination des constantes de dissociation des acides ou des constantes de complexation, la détermination des masses molaires... (Essendoubi, 2007)

II -9 Loi d'absorption de la lumière – loi de beer-Lambert:

Soit une lumière monochromatique traversant une solution absorbante de concentration C contenue dans une cuve d'épaisseur l.

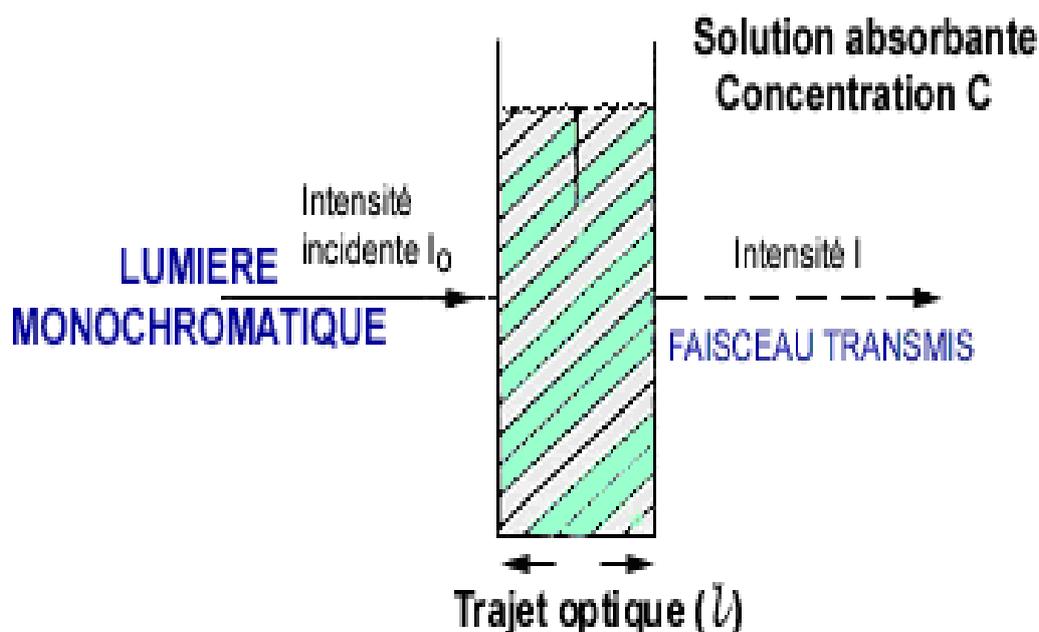


Fig. II .4: Une partie de ce rayonnement sera absorbée par l'échantillon et une partie sera transmise. Bouguer, Lambert et Beer ont étudié les relations qui existent entre I₀ et I : l'intensité d'une lumière monochromatique traversant un milieu où elle est absorbée décroît de façon exponentielle :

$$I = I_0 e^{-kIC}$$

* I₀ est l'intensité de la lumière incidente

- * I est l'intensité après passage à travers la cuve contenant la solution (intensité transmise)
- * l est la distance traversée par la lumière (épaisseur de la cuve) (en cm)
- * C est la concentration des espèces absorbantes
- * k est une constante caractéristique de l'échantillon.

Cette équation peut se réécrire $\log(I_0/I) = k l C / 2.3 = e l C$.

- * $\log(I_0/I)$ est appelé absorbance (A)
- * $I/I_0 = T$ est la transmission
- * % T est la transmittance
- * e est le coefficient d'extinction molaire ; c'est une caractéristique de la substance étudiée à une longueur d'onde donnée. Si C est la molarité, e est en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$.

On obtient alors la relation connue sous le nom de loi de Beer-Lambert :

$$A = -\log T = e l C$$

II -9-1 Validité de la loi de Beer-Lambert:

La loi de Beer-Lambert s'applique pour des radiations monochromatiques et sa validité est bonne lorsqu'on travaille avec des solutions suffisamment diluées pour ne pas modifier les propriétés des molécules (association, complexations ...). (Guedira, 2014)

II -10 Concepts généraux de la spectroscopie avec laser :

La spectroscopie avec laser peut être définie comme la mesure du résultat de l'interaction des photons (l'onde électromagnétique émise par le laser) avec la matière. La matière qui va nous intéresser dans ce cours est : des atomes, des molécules, que ce soit en phase gazeuse ou en milieu condensé (liquide et solide). Les mesures seront pratiquées à l'aide de méthodes dites de détection.

On cite les trois méthodes principales ci-dessous :

1. Méthode de détection de photons :

La méthode est basée sur l'absorption, l'émission ou la diffusion (scattering en Anglais) de la lumière (du laser) par la matière

2. Méthode de détection de particules chargées:

Cette méthode est appliquée lorsque l'interaction d'une particule neutre avec des photons conduit à l'ionisation de la particule. Dans ce cas, on détecte soit l'électron (ou les électrons) éjectés, soit l'ion formé, après passage de l'onde électromagnétique.

3. Méthodes de détection qui exploitent les modifications de propriétés macroscopiques

Physiques du milieu :

On exploite ici le fait que l'absorption de la lumière (des photons du laser) conduit à une modification de propriétés macroscopiques physiques du milieu.

II -11 Spectres et données spectrales :

Les spectroscopies de fluorescence et raman informent sur la composition chimique d'un échantillon par la mesure des rayonnements émis et, respectivement, diffusés résultants de l'interaction entre un laser excitateur incident et le tissu à analyser. Le vecteur de cette information est un spectre que nous allons présenter dans cette section.

II -12 La notion de spectre:

Dans le cadre des spectroscopies raman et de fluorescence, la notion de spectre est différente. Ces différences trouvent leurs origines au cœur même des principes physiques régissant chacune de ces spectroscopies.

II -13 Les différents types de mesures spectrales :

En fonction de l'application considérée, le type de mesures effectuées diffère. Trois principaux groupes de mesure coexistent :

L'enregistrement d'un spectre unique : la signature spectrale d'une espèce chimique pure est enregistrée entre spectres ou des opérations de régression linéaire sur ces spectres serviront à éliminer les informations liées à l'espèce chimique de référence et ainsi à isoler l'information complémentaire sur le composé complexe.

La spectroscopie résolue dans le temps : des spectres d'un système moléculaire en évolution sont enregistrés à plusieurs instants de temps successifs afin de suivre la dynamique de ce système.

L'imagerie spectrale : l'analyse d'un échantillon global est réalisée en mesurant des spectres en plusieurs points de l'échantillon. La localisation de défauts ou l'étude chimique d'un matériau sont rendues possibles par l'ajout des dimensions de surface. L'enregistrement de telles images se fait selon trois approches standards :

Le balayage point par point pour lequel un spectre est enregistré successivement en différents points de l'échantillon. Ce mode d'imagerie est assez lent. Une répartition uniforme Des points d'enregistrement suivant l'axe horizontal et l'axe vertical est généralement Utilisée pour collecter l'information disponible sur l'ensemble de l'échantillon.

Le balayage ligne par ligne qui demande moins de temps d'acquisition que le balayage Point par point car plusieurs spectres sont enregistrés en même temps.

L'imagerie directe pour laquelle une image complète de l'échantillon est collectée en une unique longueur d'onde. Le processus est répété à des intervalles spectraux réguliers. Le temps

d'acquisition est donc optimisé. Les données issues de ces techniques peuvent être considérées comme des cubes d'intensité spectrale en fonction de la longueur d'onde des rayons diffusés ou émis et des axes spatiaux. L'imagerie spectrale connaît un essor constant avec des applications nombreuses en environnement, industrie, agroalimentaire, semi-conducteurs et pharmacie. Les applications présentées dans les chapitres 3 et 4 s'appuient sur la manipulation d'images spectrales de fluorescence et Raman enregistrées en mode point par point sur des échantillons biologiques de grains de céréales et de tissus de peau humaine.

Ces applications nouvelles s'ajoutent aux nombreuses autres qui vont être brièvement décrites dans la section suivante, afin de donner un aperçu de la puissance des spectroscopies optiques et de l'intérêt de l'exploitation de leurs propriétés.

CHAPITRE III

Chromatographie liquide haute performance

III-1 Introduction:

Parmi les techniques chromatographiques dont la phase mobile est un liquide, la chromatographie liquide haute performance (CLHP) est la plus connue. Son champ d'application 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. Enfin la miniaturisation de la technique (nano chromatographie) a facilité son association avec la spectrométrie de masse. (Francis et Annick, 2004)

III-2 Origines de HPLC :

La chromatographie liquide a haut performance, souvent appelée du nom de son abréviation CLHP-HPLC en anglais – constitue technique analytique très générale d'emploi. Elle correspond à une évolution de la chromatographie préparative Sur colonne dont les performances, en termes de sélectivité et de résolution, sont son trouvé grandement améliorées par la miniaturisation et utilisation de phase stationnaires très élaborées. Ces phase, constitué généralement de microparticules sphérique dont diamètre est compris entre 2et 5 micromètre conduisent à une perte de charge importante dans la colonne. Il faut donc exercer sur la phase mobile un foret pression pour obtenir un débit convenable. Pour marqué cette particularité de la technique, la lettre P du sigle CLHP a pendant longtemps correspondu à la pression. (Francis et Annick, 2004)

III-3 conceptions générales d'un appareil de HPLC :

Une installation de CLHP comporte divers modules aux fonctions définies, soit intégrés dans même châssis pour les modèle standards ou pour des raisons de moindre encombrement, soit présentés dans des boîtiers distincts reliés entre eux comme les éléments d'une chaîne haute-fidélité. La circulation de la phase mobile entre ces modules se fait pare l'intermédiaire de canalisation courtes et très faibles diamètre interne (0,1mm). Traditionnellement en acier inoxydable, elles prouvent être aussi en PEEK(ou polyéther-etherketone) polymère souple et coloré, pouvant résister aux solvants usuels sous des pressions élevées (350 bars). (Francis et Annick, 2004)

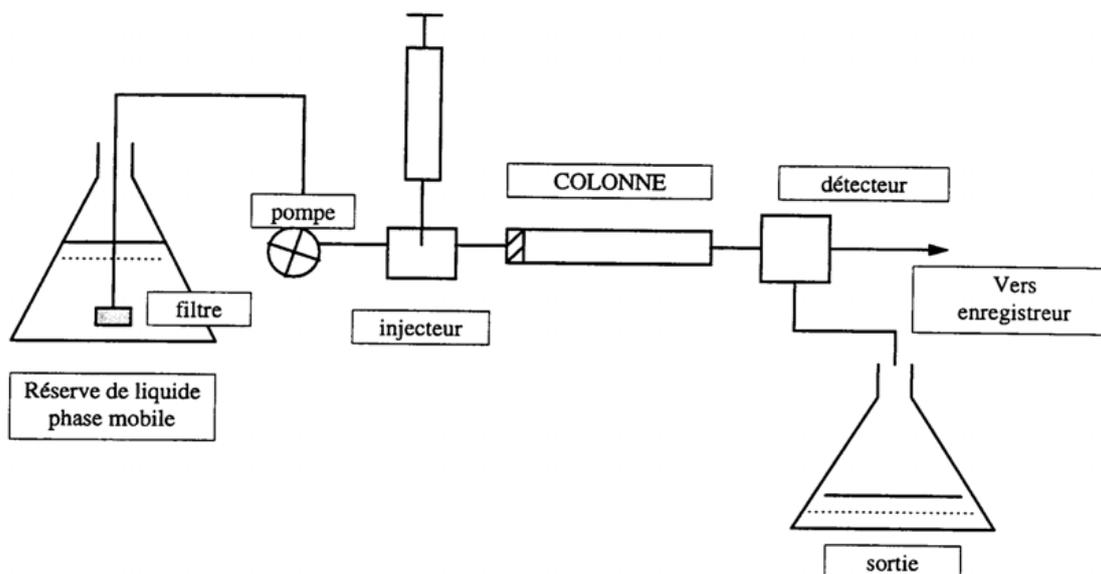


Fig.III.1: principe de fonctionnement de l'HPLC

III-4 Pompes et gradients d'éluant :

III-4-1 Pompes pour éluant:

Toute installation de CLHP comporte au moins une pompe pour forcer le passage de la phase mobile à travers la colonne dont le remplissage, très compact, est responsable d'une surpression très importante au niveau de l'injecteur. Cette pression peut atteindre 20 000 kpa (200 bars) suivant le débit de la phase mobile, sa viscosité et la taille des particules de phase stationnaire.

On utilise des pompes débit métriques conçues pour maintenir un débit non pulsé et stable même lorsque la composition de la phase mobile varie. Ces pompes comportent soit un seul piston soit deux pistons fonctionnant en opposition et placés en série pour éviter les interruptions de débit résultant de la phase de remplissage du cylindre. Pour régulariser le débit, le déplacement des pistons est contrôlé par un moteur pas associé à une came de forme particulière.

Pour parfaire la régulation du débit, on intercale entre la (ou les) pompe(s) et l'injecteur un amortisseur de pulsations fonctionnant suivant le principe mécanique du ballastage.

La solution la plus simple consiste à intercaler dans le circuit de la phase liquide un tube de faible section de plusieurs mètres de long, enroulé comme un ressort à boudin. Sous l'effet de l'onde de pression de solvant envoyée par la pompe, le tube se déplie légèrement ce qui augmente son volume interne et par là, contrecarre la variation de pression.

Suivant leur conception, les chromatographes comportent une ou plusieurs pompes. Associées à une chambre de mélange située en amont ou en aval, elles permettent de délivrer un éluant de composition fixe (mode isocratique) ou au contraire de composition variable pour faire un gradient d'éluant. Le système doit tenir compte dans ce second cas des différences de compressibilité des solvants, afin que la composition soit respectée à la pression d'utilisation. (Francis et Annick, 2004)

III-4-2 Gradients basse-pression ou haute-pression:

Quand l'installation comporte une pompe unique, elle est précédée d'une chambre de mélange basse-pression dans laquelle des électrovannes font rentrer les différents solvants dont la composition est programmée. Dans le montage haute-pression, il faut par contre autant de têtes de pompes que de solvants différents. Le mélange final est obtenu en aval dans une sorte de té placé avant la colonne. (Francis et Annick, 2004)

III-5 Injecteurs:

L'injection doit se faire en un temps très bref afin de ne pas perturber le régime d'écoulement dans la colonne et le détecteur. La difficulté consiste à introduire en tête de colonne un volume d'échantillon là où la pression atteint plusieurs dizaines de bars. On utilise pour cela une vanne haute pression à plusieurs voies (vanne à boucle d'injection). Ce type de vanne peut être utilisé soit manuellement soit commandé par un passeur automatique d'échantillons.

Le principe de fonctionnement de ces vannes est le suivant : l'échantillon est introduit avec une seringue à la pression atmosphérique dans la boucle (position chargement ou load), puis il est mis en communication par rotation de la vanne avec la phase mobile et la colonne (position injecte) (Fig. III.2). (V.JACOB ,2010)



Fig. III.2: Les deux phases de l'injection avec une boucle

III-6 Colonnes:

Elles sont le plus souvent en acier inoxydable ou en verre quand les pressions sont < 40 bars (Fig. III.3).

- Le diamètre intérieur des colonnes conventionnelles varie de ~ 4 à 10 mm, la longueur de ~ 5 à 30 cm. Elles peuvent être allongées en couplant une ou plusieurs colonnes. La granulométrie du support de ~ 2 à $10\mu\text{m}$.

Une colonne très utilisée a les caractéristiques suivantes:

$L = 25$ cm, d (intérieur) = $4,5$ mm, d (granulométrie) = $5\mu\text{m}$.

Nombre de plateaux théoriques: $N = 40\ 000$ à $60\ 000$ / mètre

- Il existe des micro-colonnes à haute performance et à grande vitesse: d (intérieur) = ~ 1 à $4,5$ mm, $L = \sim 3$ à $7,5$ cm et d (particules) = ~ 3 à $5\mu\text{m}$.

Elles possèdent jusqu'à $100\ 000$ plateaux par mètre.

Avantage: une colonne courte permet de faire des séparations plus rapidement; une colonne étroite permet une économie de la phase mobile, ce qui est important car les solvants de haute pureté exigés en CLHP sont très chers.

Les colonnes narrowbore pour CLHP ont un d intérieur de $\sim 2\text{mm}$ "

Les micro-bores CLHP ont un d intérieur de " $0,5$ à 2mm "

Tableau 01: les types de colonne de la chromatographie liquide.

Typical Liquid Chromatography Columns

Column Name	Inner Diameter	Column Length	Flow Rate	Injection Vol.	Rel. Loading Capacity
Semi Prep.	10-200 mm	5-50 cm	10-1000 mL/min	1-10 mL	100,000
Conventional	4-5 mm	5-25 cm	0.8-2.0 mL/min	5-50 μL	10,000
Narrowbore	2 mm	5-10 cm	0.1-0.3 mL/min	1-5 μL	1,000
Microbore	1 mm	5 cm-25cm	0.010-0.050 mL/min	0.2-0.5 μL	250
Packed Capillary	100-500 μm	5-25 cm	1-10 $\mu\text{L}/\text{min}$	0.1 μL	50
Open Tubular (Nano LC)	50-100 μm	1-25 cm	100-300 nL/min	1-3 nL	1

- Colonne de garde :

Une pré colonne courte (0,4 a 1 cm) précède la colonne. Elle est remplie avec la même phase stationnaire et la même densité de remplissage et elle sert a retenir des impuretés en provenance de l'échantillon, de la pompe ou de la vanne d'injection. La durée de vie de la colonne principale est ainsi allongée.

- Colonne thermo statée

Les variations de température ont une influence sur les temps de rétention.

Les appareils de chromatographie sont alors équipés avec des dispositifs de régulation qui contrôlent la température à $\pm 1^\circ\text{C}$ jusqu'a 150°C .

Reum: Les colonnes conventionnelles ont une capacité calorifique élevée et ne sont pas propices aux séparations a température programmée. Les colonnes capillaires remplies le sont. Elles répondent rapidement aux variations de température. (Marie-p, 2010)



Fig. III.3: Colonne standard et précolonne de HPLC.

III-7 Phase stationnaires:

La phase stationnaires (PS), au contact de la phase mobile (PM) mais insoluble dans celle-ci, est le second milieu dans lequel les composés initialement dissous dans la seule phase mobile vont également interagir. Il apparait dans la colonne autant d'associations particulières à trois constituants [PM/compose/PS] que d'analytes dans l'échantillon. (Phywe, 2010)

III-7-1 Le gel de silice, matière de base des phases actuelles:

Parmi les différents matériaux organiques ou inorganiques qui servent au remplissage des colonnes de CLHP, le gel de silice, solide amorphe et rigide ayant pour formule $\text{SiO}_2(\text{H}_2\text{O})_n$ (avec n très proche de 0), est utilisé, après transformation, dans 80% des applications. Ce matériau de base tout à fait différent de la silice naturelle cristalline (SiO_2) qui peut servir de matériau première à sa synthèse, est préparé sous forme de microsphères poreuses ou non, d'un diamètre très régulier de

l'ordre de 2 à 5 μm . ces particules sphériques, de même dimension, assurent un remplissage compact colonne, ce qui évite, pour la phase mobile, l'apparition de chemins préférentiels.

Sa préparation fait appel à des procédés de polymérisation sol-gel en émulsion d'un alcoxyasilicate (ex. tétraéthoxysilane)

Sous l'effet d'une hydrolyse basique. Il se forme d'abord de très petites particules (0.2 μm) qui sont rassemblées en sphères par divers procédés pour atteindre le diamètre final de quelque micromètre.

Le gel de silice est un matériau très polaire correspondant à un maillage tridimensionnel. Il n'a pas la structure ordonnée de la silice cristalline, mais il reste néanmoins bâti autour de l'agencement tétraédrique des quatre liaisons issues de l'atome de silicium. C'est un polymère inorganique réticulé comportant des groupements silanols, en nombre variable, qui ont résisté à la phase finale de cuisson. Ces groupements sont responsables des propriétés catalytiques acides de ce matériau car Si-OH à un pK de 10, comparable à celui de phénol. Leur concentration peut être établie par RMN à l'état solide du ^{29}Si ou par analyse centésimale du carbone pour les phases greffées.

La qualité d'un gel de silice pour chromatographie dépend de plusieurs paramètres parmi lesquels la structure interne,

La taille des grains, la porosité ouverte (dimension et répartition des pores), la surface spécifique, la résistance à l'écrasement et la polarité. Les gels de silice courants pour CLHP sont constitués de particules sphériques mono disperses (diamètre de 2 à 5 μm) comportant environ 5 groupes silanols par μm^2 . La surface spécifique varie de 4 à 350 m^2/g selon qu'il s'agit de silice poreuse ou non, avec des pores de 10 nm. On observe que le volume de phase mobile dans la colonne varie de 30 à 70 % de volume total de la colonne.

On est bien loin des phases utilisées au début de siècle par Tswett, constituées de craie ou de sucre en poudre. Le traitement subi par la silice en fait plutôt une sorte de « sable magique ». (Phywe, 2010)

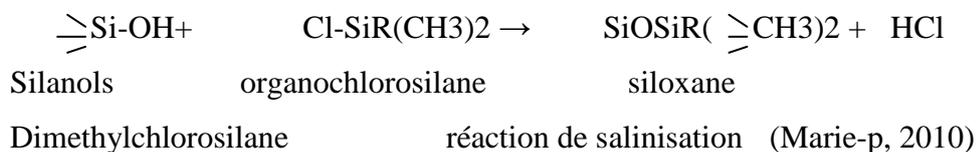
III-7-2 Les silices greffées:

Le gel de silice est hydrophile. Ses caractéristiques évoluent dans le temps, ce qui conduit à un manque de reproductibilité. Pour diminuer sa polarité, il est rendu hydrophobe par fixation par liaison chimique de molécules organiques sur les fonctions silanols. Le gel de silice devient alors un support de la phase

Stationnaire. L'oxyde de zirconium ZrO_2 , l'oxyde de titane TiO_2 ou l'alumine Al_2O_3 peuvent remplacer le gel de silice en qualité de support.

La séparation met alors en jeu des coefficients de partage et non des coefficients d'adsorption. Ces phases greffées dont la polarité est ajustable, sont utilisées dans la: chromatographie liquide phase greffée.

La plupart des supports a phase greffée sont constitués de siloxanes:



III-7-3 Autres phases polarité variable:

La nature de greffon caractérise les propriétés des colonnes greffées et le gel de silice perd le rôle essentiel qu'il avait en tant que phase stationnaire par lui-même.

Pour des applications particulières, on peut choisir des colonnes sans silice à base de polymères styrène/divinylbenzène ou hydroxyméthylstyrène. L'alumine et l'oxyde de zirconium (ZrO_2) servent également de supports de dépôts réticulés à base de polybutadiène. Ces phases stationnaires présentent une meilleure stabilité en milieu basique ou acide, certaines colonnes pouvant être rincées à la soude 1M, ce que ne supportent pas les liaisons Si-O-C.

Le graphite poreux sous forme de sphères dont la surface est 100% carbone, donc totalement hydrophobe, a reçu des applications pour les composés ayant des atomes porteurs de doublets électroniques libres, qui ont des facteurs de rétention élevés. (Phywe, 2010)

III-8 Chromatographie chirale:

La chromatographie chirale est une technique très importante pour l'étude des molécules chirales grâce à la séparation analytique et préparative des énantiomères.

Elle permet au niveau analytique de mesurer des excès énantiomériques et au niveau préparatif d'isoler des énantiomères purs.

Le principe de la séparation d'énantiomères par chromatographie chirale sera exposé, ainsi que les aspects techniques et pratiques :

- les paramètres chromatographiques utilisés pour décrire une séparation
- l'importance de la détection chiroptique
- les phases stationnaires chirales utilisées
- le développement d'une méthode analytique par criblage de colonnes chirales
- les facteurs influençant la séparation, les ordres d'élution et les mécanismes de reconnaissance

-les méthodes utilisées pour la détermination de la configuration absolue Plusieurs applications de la chromatographie chirale seront présentées :

- obtention d'énantiomères purs difficilement accessibles par d'autres voies
- étude de la racémisation
- mesure de barrières de rotation par chromatographie chirale dynamique
- production de principe actif chiral par lit mobile simulé. (Nicolas, 2010)

III-9 Phase mobiles:

Il est recommandé de toujours employer des solvants traités spécifiquement pour la CLHP; ils doivent être dégazés et filtrés avant usage. Le dégazage est effectué par ultra sons ou par barbotage d'un gaz inerte chimiquement par exemple azote, argon, hélium..; il assure une bonne reproductibilité et évite l'apparition d'une oscillation sur la ligne de base. Malgré la haute qualité des solvants, la filtration sur filtre spécial (0,4 μm) est recommandée pour empêcher l'obstruction éventuelle des orifices par les particules. Le choix du solvant constitue habituellement la partie la plus difficile de type de chromatographie. Il faut utiliser en priorité les mélanges suivants:

- méthanol - eau
- acétonitrile – eau
- tétrahydrofurane - eau

On fait d'abord les essais avec une forte proportion d'eau, puis on augmente progressivement la proportion en solvant organique jusqu'à obtention d'une bonne séparation. Avec un mélange de solvants de composition constante, il n'est pas toujours possible d'obtenir une bonne résolution et une durée d'analyse raisonnable. Pour concilier les deux, on peut opérer par élution graduée, c'est à dire par augmentation graduelle du pourcentage de solvant ayant la force d'élution la plus élevée. Il existe sur le marché des appareils programmés permettant d'obtenir des gradients d'élution. (M. SAFI, 2008 – 2009)

III-10 Chromatographie d'appariement d'ions:

La technique chromatographie par appariement d'ions (PIC) permet d'améliorer la séparation des composés ioniques ou très polaires qui ont trop peu d'affinité pour la phase stationnaire si celle-ci est apolaire. Pour augmenter leur rétention, il faut diminuer leur caractère ionique. Pour certains, on peut modifier le pH, mais si cela ne suffit pas, on ajoute à la phase mobile un composé porteur à la fois d'une chaîne carbonée (peu polaire) et d'un groupement de charge opposée à celle du composé à

séparer (alkylammonium ou alkylsulfonate). Ceci permet de créer une paire d'ions globalement neutre, assez stable et lipophile qui sera plus retenue sur la phase stationnaire. En suivant ce principe on peut séparer des cations ou anions minéraux sur une phase de polarité inversée. (Francis et Annick, 2004)

III-11 Chromatographie d'interaction hydrophobe:

L'hydrophobicité est la capacité des zones non polaires d'une ou de plusieurs molécules à s'associer entre elles pour minimiser l'exposition de la zone hydrophobe au solvant polaire.

Les résines portant des groupements hydrophobiques (cycliques ou aliphatiques) permettent de séparer les protéines en fonction de leur hydrophobicité.

Une colonne de chromatographie par interaction hydrophobe est chargée à haute force ionique et éluée avec un gradient décroissant de sels. (Daniela, 2008)

III-12 Détecteurs:

Le détecteur a pour but de fournir un signal électrique reflétant en continu les variations de composition de l'éluât en sortie de colonne ce qui permet de détecter le passage des composés successifs

a) Spectrophotomètre UV-Visible:

La réponse de ce type de détecteur est fondée sur la loi Lambert-Beer

$$A = \log I_0/I = \epsilon \lambda c$$

$\epsilon \lambda$: absorptivité du soluté à la longueur d'onde λ

I_0 : intensité du rayonnement incident

I : intensité du rayonnement transmis

l : longueur du chemin optique

c : concentration du soluté dans l'effluent

Soumis à l'influence d'un rayonnement lumineux, certains groupements fonctionnels peuvent être le siège d'une excitation électronique correspondant à une absorption d'énergie, à une ou plusieurs longueurs d'ondes spécifiques du groupement fonctionnel considéré. La ligne de base du signal recueilli représente donc la transmittance maximale de lumière et les déviations du signal indiquent une absorption de lumière.

- les détecteurs à longueur d'onde fixe. La longueur d'onde de 254 nm a été fixée par l'utilisation de la lampe à vapeur de mercure, qui a une raie d'émission maximale à 253,7 nm. Ceci a permis la construction de détecteurs de grande sensibilité, extrêmement stables et très utiles, car la plupart des composés organiques présentent une absorption dans l'U.V. au voisinage de 254 nm.

- Les détecteurs à longueur d'onde variable ; les détecteurs à longueur d'onde variable sont utiles lorsque le maximum de sensibilité correspond à une longueur d'onde autre que 254 nm.

- Les détecteurs à barrette de diodes. L'utilisation du principe de la diode photoélectrique en tant que récepteur dans un spectrophotomètre est réservée au montage de type multi canal, sous forme de barrette de diodes.

Une barrette de diodes de quelques mm contient plusieurs centaines de diodes, chacune reçoit le rayonnement contenu dans un petit domaine spectral. Chacun des circuits élémentaires est exploré par un système pilote : par un micro-ordinateur.

Ce système permet l'acquisition du spectre de l'échantillon en temps réel, une représentation en 3 dimensions (temps, absorbance, longueur d'onde) et une caractérisation des composés par leur spectre.

b) Détecteur à fluorescence:

La fluorescence est le rayonnement émis par des composés comportant certains groupements fonctionnels, lorsqu'ils sont excités par une radiation lumineuse. Le rendement de la fluorescence est fonction des longueurs d'onde d'excitation et d'émission.

Certains composés présentent une fluorescence naturelle ; si tel n'est pas le cas, il est souvent possible d'obtenir au niveau du détecteur des dérivés fortement fluorescents en faisant agir avant la séparation chromatographique des réactifs appropriés sur les composés de l'échantillon ne présentant aucune fluorescence.

c) Détecteur réfractométrique :

Le réfractomètre mesure la variation de l'indice de réfraction du liquide à la sortie de la colonne. Cette mesure, extrêmement précise, dépend néanmoins de la température du liquide. On compare cet indice avec celui de la phase mobile pure : il y a donc une référence d'où le terme de variation de l'indice. Ce détecteur exclut les variations de la composition de la phase mobile ; il n'est donc possible de travailler qu'en mode isocratique avec ce détecteur. Il existe

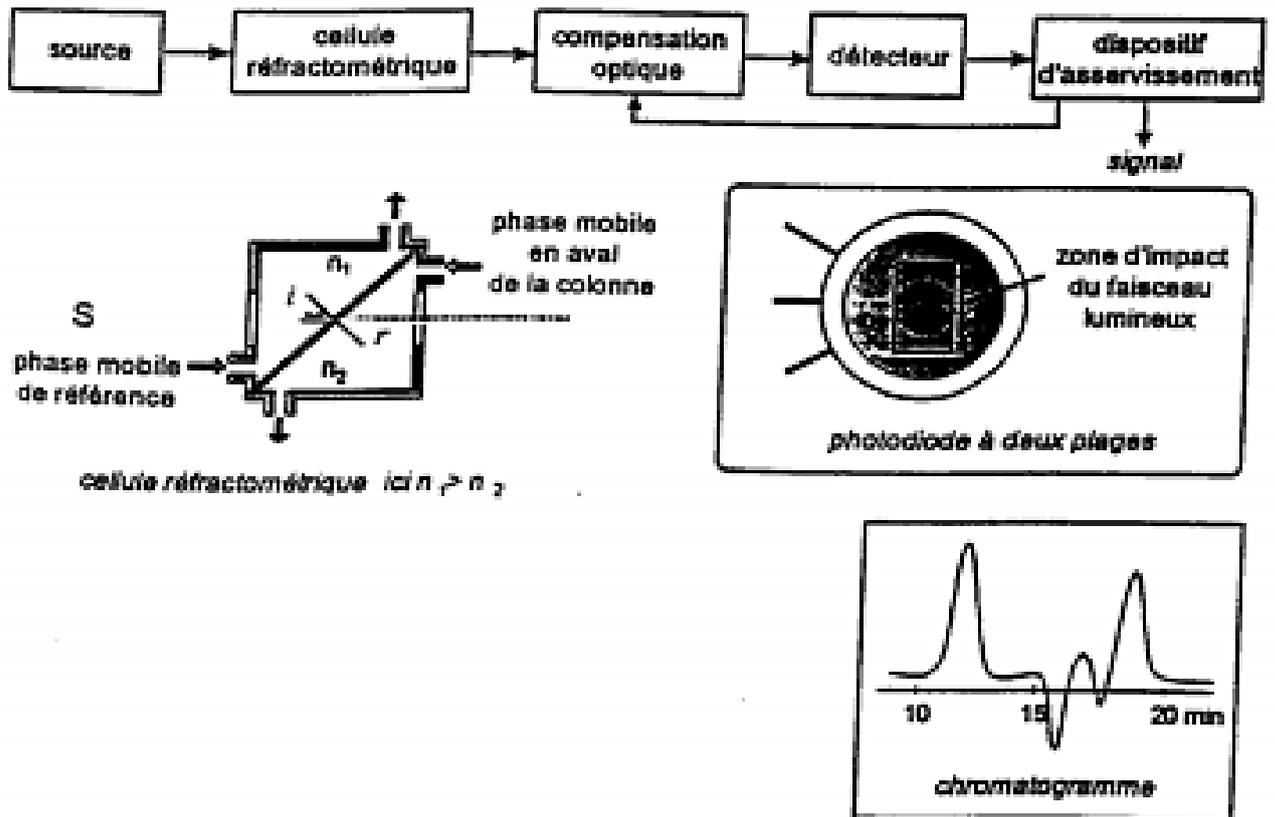


Fig. III.4: Trajet optiques détecteur de l'IR (Anonyme, 2006).

D'autres types de Détecteurs par exemple :

- a- Détecteur électrochimique
- b- Détecteur conductimétrique
- c- Détecteur à mesure de radioactivité... (M. Safi 2008 – 2009)

Partie expérimentale

CHAPITRE IV

Conception d'un appareil de HPLC YL9100

IV-1 Dégazeur à vide type YL910 en HPLC:

Il n'est pas facile, mais important de sélectionner et gérer le solvant de la phase mobile en HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance). Le dégazeur à vide YL910 est connecté à un module intégré de production de dégazage optimale de solvant pour l'utilisation en HPLC.

IV-1-1 Dégazage de solvant de la phase mobile:

Le solvant est dégazé en passant par le dégazeur à vide, la préparation solvant est simplifiée et le solvant dégazé est prêt à utiliser pour l'analyse. Avec un dégazeur à vide en ligne, vous pouvez réaliser un excellent environnement pour l'analyse HPLC. Le dégazeur à vide YL910 est composé de quatre canaux dans chaque canal de dégazage, l'air et de l'oxygène ont éliminés efficacement dans le solvant. Le dégazeur à vide fournit le meilleur solvant optimisé.

IV-1-2 caractéristiques du dégazeur:

Le dégazeur se caractérise par:

- 1) Nombre de canaux : 4 chs
- 2) Débit maximum : 10ml/min par canal 0-2.0ml/min par canal pour 70 % de gaz Retiré du méthanol
- 3) Le volume interne par canal : 925ul par canal
- 4) Les matériaux en contact avec le solvant : Téflon ® AF et PEEK
- 5) La détection d'erreur : Sécurité et entretien
- 6) Dimensions : 385 X 80 X 565 mm (largeur x hauteur x profondeur)
- 7) Tension de ligne : 110 ou 220VAC, $\pm 10\%$, la sélection automatique de la tension
- 8) La fréquence de ligne: 50/60Hz $\pm 5\%$
- 9) Consommation électrique: 20 W

IV-1-3 Dégazage du solvant:

Vérifiez si la pompe est à l'arrêt, autrement arrêter la pompe avant de mettre le dégazeur à vide YL910 en marche. En appuyant sur l'interrupteur d'alimentation, qui est situé à l'avant le dégazeur à vide est allumé, Le dégazeur à vide va commencer immédiatement à dégazer le solvant. Si le dégazeur est normalement opérationnelle, la lampe LED situé plus à gauche devient verte (VIDE) .

IV-2 La Pompe quaternaire YL9110:

La pompe quaternaire YL9110 de refoulement des solvants est une pompe pour liquide à haute performance chromatographique. commandé par un logiciel. Pompe YL9110 Quaternaire utilise spécialement conçu came et impulsion amortisseur pour la livraison solvant stable et a une fonction de compensation de compressibilité pour la livraison solvant exacte et précise. Et que la pompe a une fonction de rinçage automatique pour prolonger la durée de vie de la tête de pompe.

IV-2-1 Caractéristiques la pompe quaternaire YL9110:

La pompe se caractérise par:

- 1) Principe de fonctionnement : Parallèle pompe à double piston à faible gradient de pression
- 2) La compensation de compressibilité : Automatique
- 3) Plage de débit : 0.001-10ml/min
- 4) Précision débit de taux : $\leq \pm 1 \%$ à 1ml/mn
- 5) Débit précision de taux : 0,1 % RSD à 1ml/mn
- 6) Pression maximale : 6000 psi
- 7) Plage de fonctionnement : 0-6000 psi à 5ml/min
- 8) Plage de fonctionnement : 0-3000 psi à 10ml/min
- 9) pulsation de pression: $\leq \pm 1 \%$ à 1ml/mn
- 10) Composition de précision : $< 0,1 \%$
- 11) Composition Précision: $< 0,5 \%$
- 12) Premier Semi-Auto / purge
- 13) Communications : LAN
- 14) Sécurité et entretien: Détection de fuites, de diagnostic, la détection d'erreur
- 15) Dimensions : 385 X 160 X 565 mm (largeur x hauteur x profondeur)

16) Tension de la ligne : 110 ou 220 VAC, $\pm 10\%$

17) Fréquence de ligne : 50/60Hz $\pm 5\%$

18) Consommation: 70W

IV-2-2 Configuration de la pompe quaternaire:

IV-2-2-1 Cycle de fonctionnement d'écoulement d'un mélange de solvants :

La pompe quaternaire YL9110 est constituée par les mêmes composantes présentées sur la figure 1. Entre l'entrée de la pompe et le clapet d'entrée, Il est utilisé un tube de Téflon, SUS316 ou PEEK sont des tubes anti-retour de clapet de sortie(Fig.IV.1).

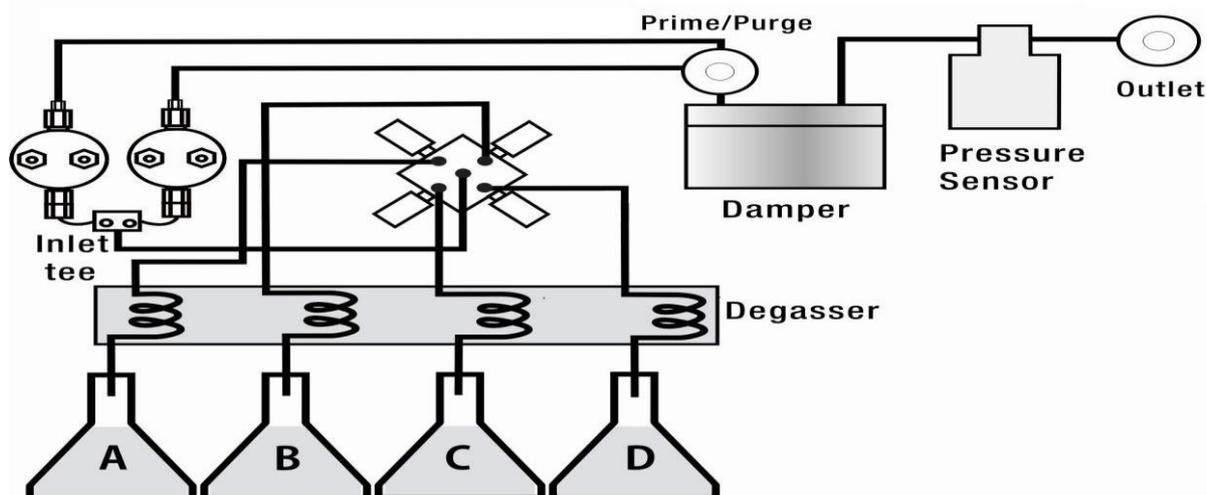


Fig.IV.1: diagramme de fonctionnement de la pompe YL9110

IV-3 Compartiment de la colonne YL9131:

Compartiment de colonne YL9131 est un thermostat pour contrôler la température de la colonne de système HPLC. Il utilise la sonde RTD pour lire la température et le contrôle PID pour contrôler dispositif Peltier, il offre une large plage de température et une excellente précision de la température.

IV-3-1 caractéristiques de la colonne YL9131:

La colonne se caractérise par:

- 1) La température : 4 ° C (refroidissement) - 90 ° C
- 2) La stabilité de la température : $\pm 0,05$ ° C
- 3) Précision de la température : $\pm 0,5$ ° C avec 2 points température. Étalonnage
- 4) La précision de température : $\pm 0,1$ ° C
- 5) Les programmes de température: 40 étapes
- 6) La capacité de la colonne: Total 3 colonnes jusqu'à 300mm de long (max OD : jusqu'à 18mm)
- 7) Commutation de colonne: automatique vanne 6 ports (en option) jusqu'à 2 ch
- 8) Temps de montée en température : à 16 minutes de 4 ° C à 90 ° C
- 9) Temps de refroidissement : 13 minutes de 90 ° C à 4 ° C
- 10) Préchauffer : tube échangeur de chaleur ID est 0.01inch
- 11) Entrée externe : Démarrer, Prêt
- 12) Sortie externe : Démarrer, Prêt Marquez
- 13) Communications : LAN
- 14) Sécurité et entretien: Détection de fuites, de diagnostic, la détection d'erreur
- 15) Dimensions : 385 X 160 X 565 mm (largeur x hauteur x profondeur)
- 16) Tension de la ligne : 110 ou 220 VAC, ± 10 %
- 17) Fréquence de ligne : 50/60Hz ± 5 %
- 18) Consommation: 150W

IV-4 Détecteur UV / Vis YL9120:

Le Détecteur UV / Vis YL9120 est détecteur d'absorbance le plus sensible et polyvalente disponible pour HPLC. Il dispose d'une capacité double de longueur d'onde.

Le détecteur UV / Vis YL9120 est conçu pour fournir des performances supérieures à la détection UV / VIS pour l'application de HPLC tels que le développement, la recherche analytique.

IV-4-1 Caractéristiques de détecteur YL9120:

Le détecteur se caractérise par:

- 1) L'intensité lumineuse supérieur par la structure optique Seya - Namioka et une large gamme de longueurs d'onde
- 2) Dérive Basse par le réseau concave holographique blazé
- 3) Mieux conçu ensemble de la cellule d'écoulement par effet compensé RI
- 4) La stabilité de base améliorée avec effet d'échange de chaleur
- 5) Grande Ergonomie par des lampes de montage et de débit ensemble de la cellule sur le front
- 6) La détection de double longueur d'onde et la numérisation du spectre
- 7) Plage longueur d'onde : 190-900 nm
- 8) Le taux de collecte des données : jusqu'à 50 Hz
- 9) Source lumineuse: lampe de lampe à arc de tungstène et deutérium
- 10) Filtre 2 - Commande: commutation automatique du filtre
- 11) Largeur de bande: 5,5 nm
- 12) Longueur d'onde Précision: ± 1 nm
- 13) Longueur d'onde de précision : $\pm 0,1$ nm
- 14) Linéarité : $> 99,5$ % à 2,5 UA (acétone, 254 nm)
- 15) Niveau de bruit : $< \pm 0,5 \times 10^{-5}$ Abs / min, 254 nm, pile sèche
- 16) Drift : $< 1 \times 10^{-4}$ Abs / heure

- 17) Élément de dispersion: grille concave
- 18) Temps de préchauffage : 1 heure
- 19) Débit Mobile Design: Cone
- 20) Longueur du trajet : 10 mm (cellule d'analyse)
- 21) Cellulaire Volume : 10 pi (cellule d'analyse)
- 22) Limite la pression: 1500psi (cellule d'analyse)
- 23) Matériaux humides : acier inoxydable 316, de quartz, de téflon
- 24) Sorties analogiques
 - A. Deux, sélectionnable par logiciel : absorption de l'énergie, de l'énergie de l'échantillon, de référence de l'énergie
- 25) Communications : LAN
- 26) De mise sous tension Diagnostic: Optique et la routine de diagnostic électronique
- 27) Vérification de longueur d'onde sous tension: automatique au démarrage via le filtre de holmium interne et D2 lampe
- 28) 5 points de longueur d'onde d'étalonnage : Sur demande via le filtre d'holmium interne et lampe D2
- 29) Sécurité et entretien: Détection de fuites, de diagnostic, la détection d'erreur
- 30) Dimensions : 385 X 160 X 565 mm (largeur x hauteur x profondeur)
- 31) Tension de la ligne : 110 ou 220 VAC, $\pm 10\%$
- 32) Fréquence de ligne : 50/60Hz $\pm 5\%$
- 33) Consommation: 100W

Chapitre V

Séparation des principaux composés d'une solution par HPLC

V -1 Introduction:

Le but de ce travail pratique est dans un premier temps de déterminer l'ordre d'éluion des composés principaux de la solution (Toluène, Naphtalène, Benzène), puis dans un deuxième temps de déterminer quelques paramètres de la séparation par chromatographie liquide haute performance HPLC.

V-2 Matériel et Méthode:

Dans ce test en utilise l'appareil HPLC YL9100, Pour séparer les constituant d'une solution composé de (Toluène, Naphtalène, Benzène), pour ce la des conditions opératoires suivantes ont été appliquées:

- Colonne: skypack c18 (150mm *4.6mm, 5 μ m)
- Détecteur: UV (à la longueur d'onde 254nm)
- Volume d'injection: 20 μ l
- Débit: 1.0 ml/min
- Phase mobile: ACN: eau=60:40
- Température: 35°C
- Échantillon: mélange de benzène, toluène, naphtalène 200ppm

V-3 Résulta et Discussion :

ce figure représente le chromatogramme d'une l'analyse obtenu:

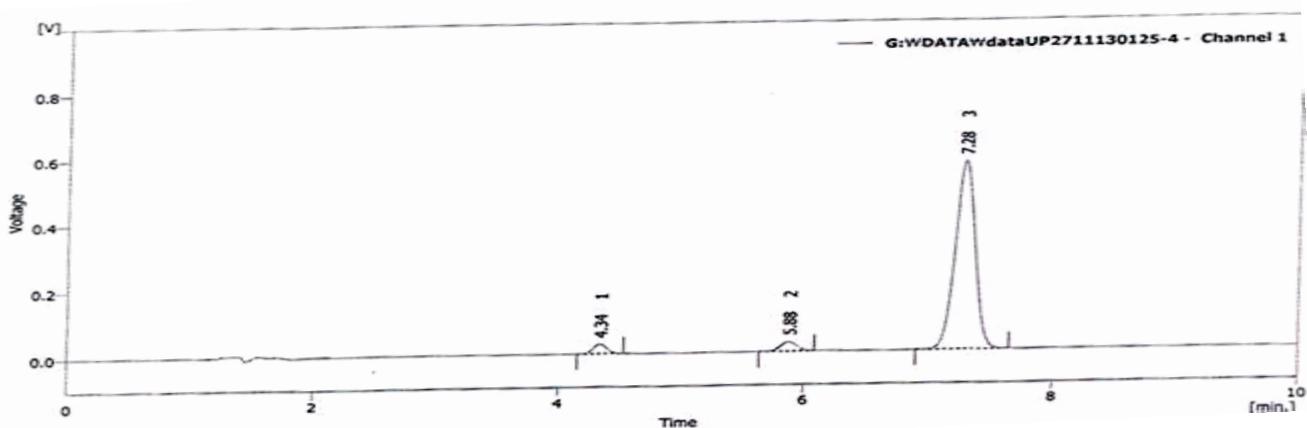
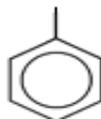
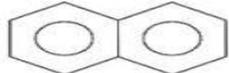


Fig.V.1: chromatogramme de la séparation

Le tableau représenté les pic du ce résultat :

Tableau 02: résultats de la séparation

	Temps de rétention [min]	Zone [mv. s]	Hauteur [mv]	Zone [%]	Hauteur [%]	W05 [min]	composé
1	4.340	215.384	28.784	3.2	4.6	0.12	Benzène 
2	5.880	254.236	28.028	3.8	4.5	0.15	Toluène 
3	7.283	6235.586	570.596	93.0	90.9	0.18	Naphtalène 
	Total	6755.206	627.409	100.0	100.0		

L'analyse des résultats du chromatogramme obtenu fait ressortir ce qui suit:

Un pic caractérisant la sortie de premier constituant : le benzène au temps 4.34 min et de hauteur 28.784 mv de poids moléculaire 78.11g/mol, suivie du toluène de poids moléculaire 92.14 g/mol, au pic situé dans l'abscisse de temps 5.880 min et de hauteur 28.028 mv et finalement le naphtalène de poids moléculaire 128.17 g/mol au pic situé à 7.283 min et de hauteur 570.596 mv.

De ce qui suit, la séparation s'est effectuée dans de bonnes conditions , ce résultat est justifié par la les pics enregistré à la fin de l'expérience des différents constituants de la solution décelé à temps de rétention prévus.

Conclusion

Notre travail consiste à la mise en marche d'un appareil de séparation par HPLC (YL 9100) , pour cela , un essais de séparation des constituants d'une solution liquide composé de benzène, toluène, naphthalène après injection de 20 µl de la solution et le réglage des conditions opératoire, chaque composés a été récupéré au temps de rétention mentionné sur l'appareil. Le benzène a été récupéré en premier lieu, suivie du toluène puis du naphthalène. L'appareil Y1900 nous a permet d'effectuer avec succès la séparation d'un mélange, d'après la lecture des résultats dans le chromatogramme obtenu, qui sont conformes aux résultats prévus, par suite on peut confirmer l'authenticité et la fiabilité de cet appareil.

Bibliographie

- 1- Chantal Lorentz 2010 Conservatoire National des Arts et Métiers Caractérisation de carburants alternatifs par chromatographie d'exclusion stérique et résonance magnétique nucléaire 161p
- 2 - Cheikh Moussa Ndiaye, 1998, étude de la chromatographie ionique comme méthode de référence potentielle Pour la détermination simultanée de cation alcalins alcalino-terreux et d'ions ammonium dans l'eau et les soles .
- 3- Nicolas Vanthuyne 20 Mai 2010, Conférences Chimie École Doctorale ,25p .
- 4 - Edith Antonot Robert Marechal Metz 26 et 28 janvier 1998 Lycée Louis Vincent 48 p.
- 5 - F.Guedira 2014 Um5a, Cours de Spectroscopie 33 p
- 6- Francis Rouessac Annick Rouessac avec la collaboration de Daniel Cruché 1992 analyse chimique Méthodes et techniques instrumentales modernes 6e édition Guy urisson Membre de l'Académie des Sciences. 462 P
- 7- Franck 2011 Denaticmub UMR 52609, Av. Alain Savary 41 p
- 8- Gillet Steve, D.Sc. 2007La chromatographie sur supports chiraux : Présentation de la technique et applications 60 P
- 9- Jean-Louis CUQ 1999 – Chromatographie liquide 99p
- 10- Mahdiar Salha 2013 Contribution à l'Etude de la composition chimique de la plante *Matricaria pubescens* et à l'évaluation de son activité antioxydante 69 p
- 11- Marie Paule Bazez Boeck 2008 . Fr. /mpb 82 2011 La Chromatographie en Phase Liquide CPL 38 p
- 12 - Marie-Pierre Gaigeot Année Universitaire 2007-2008 85p
- 13- Mohammed Essendoubi 2007 ardenne mention : sciences pour l'ingénieur Spécialité 34p
- 14 - Paul , Tadhg, Alberto et Adrian 2005 ,Ecole européenne de Bruxelles 1 mentions légales-Infos légales 127 p
- 15 - Phwesy stfmombh manuel d'utilisation dans appareille chromatographique liquide haut performances 65p
- 16 - Pierron 2011 Principe de la chromatographie 8 pages
- 17 - Saint-Etienne Génie des Procédés, 2014 méthodes spectrométriques d'analyse et de caractérisation spectrométrie d'absorption atomique centre spin, école des mines de 43p

18- Safi Mohamed 2008 – 2009 Universités hassani – Mohammedia 22 pages.

19- Universités au laboratoire lambe laboratoire analyse et modélisation pour la biologie et L'environnement, 2001 France master m1 master 16b 41p.

20- Unité de formation et de recherche de pharmacie Université Montpellier 2 science technique 97 p.

21- Véronique Jacob 22/02/2010 Chromatographie a haute performance IUT de Chimie de Grenoble 41 p.

Résumé :

Le but de notre travail est la mise en marche et l'essai de fonctionnement de l'appareil d'analyse par chromatographie liquide à haute performance HPLC YL 9100. Les caractéristiques techniques de l'appareil, ces différents constituants ainsi que son mode de fonctionnement ont été mis en exergue dans notre étude, puis un essai pratique consistant en la séparation d'un mélange d'une solution constituée de benzène, toluène et naphthalène. L'analyse du chromatogramme obtenu montre bien que la séparation a été réalisée avec succès, en effet, les pics obtenus à des temps de rétention différents et avec des amplitudes différentes caractérisent bien les trois constituants susmentionnés.

Abstract:

The aim of our work is starting and functional testing of the analyzer liquid chromatography high performance HPLC YL9100. The technical characteristics of the apparatus, these various constituents and its operation have been highlighted In our study, a practical test and the separation consisting of a mixture of a solution consisting of benzene, toluene and naphthalene. The analysis shows the chromatogram obtained that separation has been performed successfully, in effect; the peaks obtained with retention times and different amplitudes with different well characterize the three aforementioned components.

التلخيص :

الهدف من عملنا هذا بداية تجارب تقنية الفصل العالي الأداء (HPLC YL9100), والخصائص التقنية للجهاز وإبراز مختلف مكوناته وعملها في دراسة التجارب عملية وفصل في مكونات الخليط الذي يحتوي على البنزين والتولوين و النفثالين المبين الجيد للتحليل اللوني, وقد حققت هذه التجارب في الفصل نجاحا في الواقع , والمستويات التي تم الحصول عليها عدة مرات مع مختلف المكونات الثلاثة السابقة.