الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

3/85

وزارة التعليم و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

1 ex

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

DEPARTEMENT Génie chimique

PROJET DE FIN D'ETUDES

SUJET

ANALYSES D'HUILES DE GERMES DE MAIS PAR TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

Proposé par : Mr. R. Béllabès

Etudié par : N. Ahnouh.

Dirigé par : Mr. R. Béllabès

PROMOTION : Juin 85.

E.N.P. 10, Avenue Hacen Badi – EL-HARRACH – ALGER

UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE D'ALGER.

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

DEPARTEMENT : GENIE CHIMIQUE

PROJET DE FIN D'ETUDES

ANALYSE D'HUILES DE GERME DE MAÏS PAR TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES.

DIRIGÉ PAR : Mr R. BELABBES

ETUDIE PAR : N. ANNOUN

PROMOTION : JUIN 85

-oOo- MEMBRES DU JURY -oOo-

Président :

Monsieur , M.H. GUERMOUCHE Professeur à l'U.S.T.H.B.

Examinateurs :

M. R. BELABBES	Professeur à l'E.N.P.
M. S.E. CHITOUR	Professeur à l'E.N.P.
M. M. BOUATTOU	Coordinateur de projet à la SNIC (Invité)
Mme S. CHARCHARI	Maître Asiistante à l'E.N.P.

A mes parents,

A mes frères,

A mon mari,

Je dédie ce travail à tous les professeurs qui ont, pendant toutes ces années enrichi mon savoir,

REMERCIEMENTS

Le présent travail a été réalisé dans le cadre des projets de fin d'études de l'Ecole Nationale Polytechnique sous la direction de Monsieur R.BELABBES ,Directeur de la Post-Graduation à l'ENP.

Je tiens à lui exprimer ma vive reconnaissance pour tous les conseils précieux qu'il a bien voulu me prodiguer au cours de mon travail.

Je tiens également à remercier tous les chercheurs du laboratoire de la Faculté des Sciences d'Alger pour leur aide et particulièrement Monsieur M.H.GUERMOUCHE qui me fait l'honneur de présider mon Jury et qui à bien voulu mettre à ma disposition tout le matériel nécessaire ainsi que pour tous les conseils avisés.

Mes remerciements vont également au Directeur de la Raffinerie du port d'Alger pour m'avoir permis de visiter l'unité et de prélever un échantillon de l'huile de maïs ainsi qu'aux Ingénieurs en particulier Melle LOUNAOUCI pour sa gentillesse.

Je tiens ainsi à ne pas oublier les ingénieurs et les techniciens du laboratoire de la SNIC (sis Belcourt) pour toute l'aide qu'ils ont pu m'apporter et à remercier vivement Monsieur BOUATTOU ,Chef de projet à la SNIC pour m'avoir mise sur la voie de mon travail.

Enfin, je remercie Madame ANNOUN Farida pour avoir eu la gentillesse de se charger de la dactylographie de ce travail ainsi que Monsieur KHETTOU Mohamed pour m'avoir aidé ,matériellement et moralement durant ce travail.

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE.

وزارة التعليم العالي
المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات

Département : GENIE CHIMIQUE
Promoteur : R. BELABBES
Elève Ingénieur : N. ANNOUN

مصلحة : هندسة كيميا
موجه : ر. بلعباس
تلميذ مهندس : ن. عنون

الموضوع دراسة زيت الذرة بواسطة التحليل الكروماطوغرافي

الملخص اثناء هذا العمل قمنا بدراسة زيت الذرة بواسطة التحليل الكروماطوغرافي لهذا الغرض إستعملنا طريقتين :-1- الكروماطوغرافية في الطور الغازي وقد سمحت لنا هذه الطريقة بتحليل الحوامض الدسمة والمكونة لهذا الزيت كيفًا وكمًّا ولهذا عمدنا إلى تحويل الحوامض إلى الاستير المتيلي الذي ينتج عنها استقرار كبير لأنها تتميز بالتقطيب المنخفض والنصاير المرتفعة
-2- الكروماتوغرافية في الطور المائع وهي التي تسمح ايضا بفصل مختلف مركبات زيت الذرة وذلك بتحليل استير البرابوموفناسل نتيجة تسهيل الكشف بواسطة الاشعة فوق البنفسجية.

Sujet : ANALYSES D'HUILES DE GERME DE MAIS PAR TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES.

Résumé: Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'analyse chromatographique d'huiles de Germe de Maïs. Pour cela, deux techniques ont été étudiées.

1) La chromatographie en phase gazeuse qui a permis d'analyser qualitativement et quantitativement les acides gras composant cette huile. A cet effet, nous avons procédé à leur transformation en esters méthyliques qui présentent des propriétés chromatographiques nettement plus favorables à savoir leur haute volatilité et leur faible polarité d'où une plus grande stabilité.

2) La chromatographie en phase liquide qui a permis de séparer les divers constituants d'une huile de Maïs en analysant les esters du parabromophénacyl en raison de leur facilité de détection par ultra violet.

Subject : CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF FATTY ACIDS IN CORN OIL.

Abstract: In this work, a chromatographic analysis of fatty acids in corn oil is presented. Two technics were used:

-1- Gas chromatography is satisfactory to qualify and quantify fatty acids as their methylesters in corn oil.

-2- HPLC involves the derivatization of the fatty acids with Bromophenacyl Bromide in the présence of crown ether.

ANALYSE D'UNE HUILE DE GERME DE MAIS PAR TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

Sommaire :

INTRODUCTION :

Le présent travail réunit à la fois une étude générale de l'huile de germe de maïs ainsi que la determination de sa composition par analyses chromatographiques.

Pour cela nous avons opté pour deux techniques chromatographiques.

- la chromatographie en phase gazeuse qui nous permettra d'analyser qualitativement et quantitativement les acides gras composant cette huile. Cela nous les transformerons en esters méthyliques qui ont un point d'ébullition beaucoup plus bas ainsi qu'une plus grande stabilité.

A cet effet nous avons utilisé une colonne remplie où la phase stationnaire est un liquide et la phase mobile un gaz.

- La chromatographie en phase liquide :
Qui nous permettra de séparer également les divers constituants d'une huile de maïs en analysant les esters du para-bromophénacyl en raison de leur facilité de détection par UV, à cet effet nous avons utilisé une chromatographie de partage et où la séparation des solutés est fondée sur leur partage entre cette phase et la phase mobile.

Nous avons fait une application en comparant une huile de germe de maïs algérienne récemment fabriquée par l'ENCG et une huile de germe de maïs importée : la Dietex.

CHAPITRE I

Aperçu bibliographique relatif aux huiles alimentaires

- L'histoire de l'huilerie remonte à des temps si éloignés que l'on ne soupçonnerait en aucun cas son existence. Et pourtant, des peuplades lointaines de l'époque de Moïse utilisaient déjà l'huile et conseillaient à leurs gens de porter des cheveux longs et d'oindre ceux-ci d'huile vierge.

A cette époque, l'homme savait dont déjà produire de l'huile et tenait à sa qualité puisqu'il spécifiait "huile vierge".

Le déchiffrage des hiéroglyphes nous apprit aussi que les anciens égyptiens utilisaient l'huile dans les patisseries et que cette huile leur était livrée par les médianites qui étaient une peuplade de la Palestine.

En ce temps-là, l'homme avait donc les moyens de fabriquer de l'huile en quantité suffisante pour en faire le commerce et même l'exportation.

Il semblerait que les premières méthodes utilisées pour l'obtention de l'huile furent probablement une extraction à l'huile bouillante mais beaucoup plus tard, lorsque l'homme est passé du stade tribal à celui de société organisée, des presses primitives firent alors leur apparition. Les graines ou les fruits étaient probablement broyés entre deux pierres puis introduites dans un tronc d'arbre creux. On empilait des pierres sur cette pâte et l'huile suintant de la graine s'écoulait par un trou pratiqué à la partie inférieure du tronc

Depuis, plusieurs autres presses apparurent mais celles utilisées actuellement sont toutes dérivées de presses mécaniques datant de 1918 appelées encore "tordoirs".

.../...

En ce qui concerne les procédés modernes de production industrielle de l'huile, il convient de mettre tout d'abord l'accent sur le fait que la qualité de la matière première influe directement sur la qualité des produits obtenus; ceci faisant intervenir les problèmes de conservation des graines et leur stockage.

1- Définitions et origines d'une huile alimentaire :

Une huile alimentaire est extraite de graines oléagineuses ou de certains fruits oléagineux.

Nous classons ces corps gras d'origine végétale en deux catégories les comestibles et ceux à usage industriel, ou encore selon leur degré de siccativité (d'accélération de la dessication).

En corps gras siccatifs, parmi eux, nous citerons :

- huile de lin
- huile d'oeillette
- huile de bois de chêne
- huile d'abrasin
- huile de tournesol

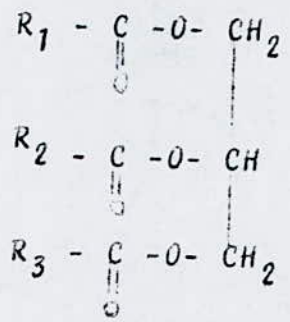
et en corps gras demi-siccatifs :

- huile de coton
- huile de sésame
- huile de maïs
- huile de colza
- huile soya

Rappelons qu'un corps gras est constitué de 3 groupes essentiels de produits : les lipides, les phosphatides et les insaponifiables.

I.1 - Les lipides :

Ils constituent 99% de la matière grasse. Ce sont essentiellement des esters d'acides gras $R-CO_2H$ et de glycérol $CH_2OH-CHOH-CH_2OH$ et qui ont pour formule générale :



R_1 , R_2 , R_3 sont des radicaux organiques à chaine droite rarement ramifiée dont le nombre d'atomes est pair et généralement compris entre 4 et 24.

Ces esters peuvent être partiels, à savoir qu'une ou deux fonctions alcool de la glycérine peuvent rester libres.

Ces acides peuvent être saturés ou insaturés tels l'acide stéarique saturé

$$CH_3 - (CH_2)_{16} - CO_2H$$

et l'acide oléique mono-insaturé

$$CH_3 - (CH_2)_7 - CH = CH - (CH_2)_7 - CO_2H$$

Pour une huile de germe de Maïs, les acides gras principaux les constituant sont :

- l'acide palmitique .C_{16} $CH_3 - (CH_2)_{14} - CO_2H$
- l'acide palmitoléique $C_{16}:1$ $CH_3 - (CH_2)_6 - CH=CH - (CH_2)_6 - CO_2H$
- l'acide stéarique .C_{18} $CH_3 - (CH_2)_{16} - CO_2H$
- l'acide oléique .$C_{18}:1$ $CH_3-(CH_2)_7- CH=CH -(CH_2)_7- CO_2H$
- l'acide linoleique $C_{18}:2$ $CH_3-(CH_2)_4-CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)7-CO_2H$
- l'acide linolénique : $C_{18}:3$ $CH_3-(CH_2-CH=CH)_3-CH_2(CH_2)_6\ COOH$

- l'acide arachidique C_{20} $\quad CH_3-(CH_2)_{18}-CO_2H$

- l'acide gadoléique $C_{20}:1$ $\quad CH_3-(CH_2)_8-CH=CH-(CH_2)_8-CO_2H$

Les proportions de chaque acide présent dans une huile de maïs sont données dans le tableau T_1

Examinons la :

Formation des lipides :

Les théories établies à ce sujet sont encore très complexes (REF2). Elles énoncent que les glucides présents dans la graine sous l'action de la lipogénase se transforment en lipides par la réaction globale :

$$3\ C_6H_{12}O_6 \longrightarrow \underset{\text{Acide stéarique}}{C_{18}H_{36}O_2} + 8O_2$$

De 20 à 30 jours après **la fécondation** de la graine survient une brève période d'une dizaine de jours au cours de laquelle se produit la synthèse des lipides.
Cette synthèse comprend deux parties : celle du glycérol et celle des acides gras.

On peut facilement résumer la synthèse du glycérol par le schéma suivant :

$$\text{Glucose} \longrightarrow \begin{array}{c} CH_2-OH \\ | \\ CO \\ | \\ CH_2-O-PO_3H_2 \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} CH_2OH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2-O-PO_3H_2 \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} CH_2OH \\ | \\ CHOH \\ | \\ CH_2OH \end{array}$$

Par contre la synthèse des acides gras est beaucoup plus complexe et se compose de deux biosynthèses, celle des acides gras saturés et celle des acides gras insaturés.

Biosynthèse des acides gras saturés :

Acides Gras	Limites Extrêmes en pourcent			Moyenne en pourcent
$C_{16}:0$	10,1	-	15,8	11,3
$C_{16}:1$	0,1	-	0,3	0,2
$C_{18}:0$	1,5	-	2,7	2,2
$C_{18}:1$	27,5	-	43,0	28,9
$C_{18}:2$	42,0	-	60,0	55,0
$C_{18}:3$	0,1	-	1,9	1,5
$C_{20}:0$	0,1	-	1,0	0,7
$C_{20}:1$	0,1	-	0,3	0,2

Tableau T1 : Teneurs en Acides Gras d'une huile de Maïs.

Les acides gras saturés des lipides végétaux ayant tous un nombre pair d'atomes de carbone laissent suggérer que le précurseur de leur biosynthèse peut être un fragment en C_2; ce qui fut démontré expérimentalement (réf.2).
Les chaînes d'acides gras se construisent progressivement par polymérisation linéaire selon divers modes qui ont été étudiés à l'aide du carbone marqué radioactif. Il a été arrêté qu'il existait deux mécanismes possibles de synthèse des acides gras (réf.2) qui font appel à des enzymes situés dans les compartiments différents de la cellule :

- un mécanisme d'élongation mitochondriale des chaînes grasses.

- un mécanisme cytoplasmique de biosynthèse totale des chaînes grasses.

Selon le premier mécanisme, la biosynthèse de certains acides gras est réalisée à partir de suspensions de mitochondries animales ou végétales (en particulier) isolés du foie de pigeon, et de péricarpe d'avocat) mais celles-ci résultent d'une élongation de chaînes préexistantes par des fragments en C_2 et non d'une synthèse totale.

Ainsi, il a été montré à l'aide du carbone marqué que l'acide stéarique résulte de l'élongation de la chaîne de l'acide palmitique par l'intermédiaire d'une série de réactions enzymatiques dans lesquelles intervient l'acétyl-coenzyme A.

Le deuxième mécanisme laisse prévoir que la synthèse totale des acides gras à partir de fragments C_2 s'effectue dans la phase liquide du cytoplasme. Les enzymes qui catalysent ces synthèses donnent un complexe dénommé "acide gras synthétase ".L'acide gras principal est l'acide palmitique et les acides gras de chaîne plus longue en particulier l'acide stéarique sont surtout obtenus par élongation.

<u>Biosynthèse des acides gras insaturés</u> :

La biosynthèse des acides gras insaturés est largement moins connue que celle des acides gras saturés.

Bon nombre de cellules animales et végétales sont capables de synthétiser des acides gras, monoéthyléniques comme l'acide oleique Par contre la synthèse des acides polyéthyléniques apparaît comme une propriété exclusive des végétaux supérieurs.

Les acides polyinsaturés sont vraisemblablement formés par désaturation progressive de l'acide oleique mais on ignore encore le mécanisme de ces réactions de désaturation car aucun enzyme n'a pu être isolé. Toutefois la lumière pourrait jouer un rôle important dans ces synthèses (réf.2)

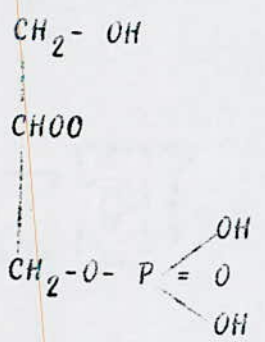
I-1b - Les phosphatides :

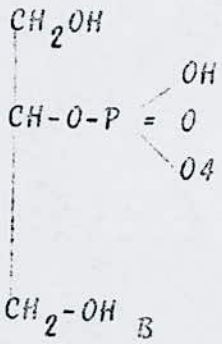
Les phosphatides ou phosphotipides constituent plusieurs classes de composés comprenant les acides gras, le glycérol, l'acide phosphorique et dans certains cas, des bases alcooliques azotées ou des acides aminés.

Ces classes sont les suivantes :

A. Les esters glycérophosphoriques :

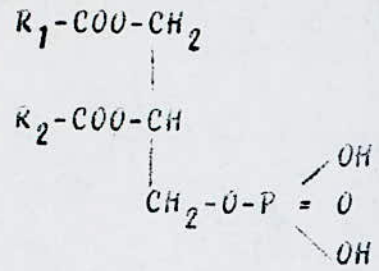
Ce sont des monophosphates du glycérol



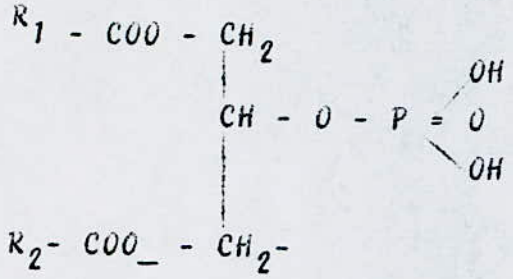


B. Les phosphatides

Ce sont des esters mixtes d'acides gras et d'acide phosphorique.



(forme A)

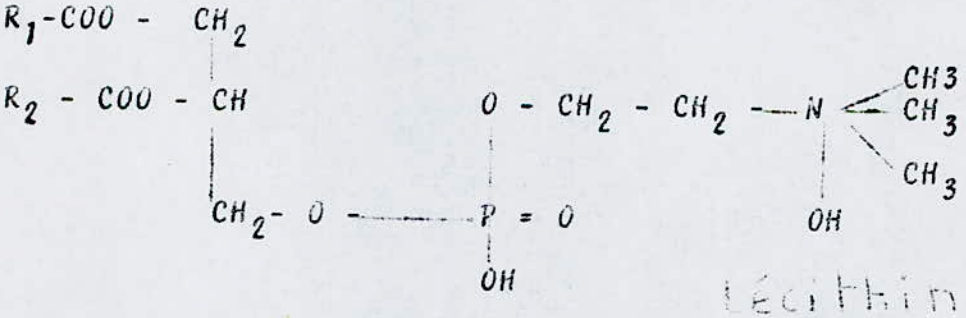


(forme B)

C. <u>Les phosphoglycérides</u> :

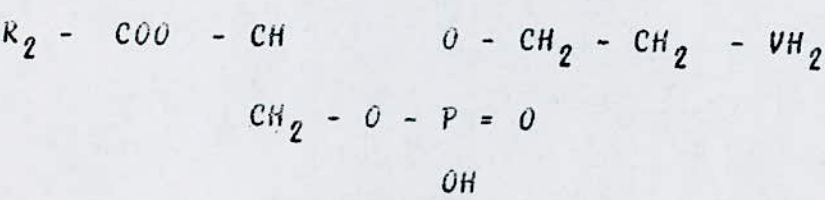
Ce sont des phosphatides dans lesquels un hydrogène H libre de l'acide phosphorique est remplacé par un groupe amino-alcool. Il existe :

- le groupe des phosphatidylcholines ou lécithines



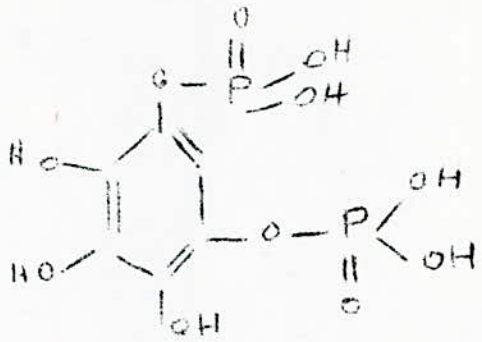
lécithines

- le groupe des phosphatidyl-éthanolamines ou céphaline

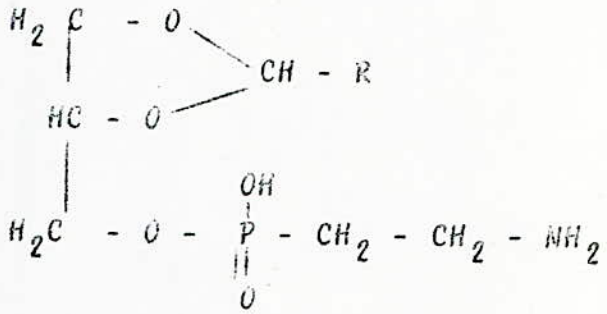


- les polyphosphoglycérides qui comprennent plusieurs molécules des précédents

D. Les phosphinositoides



E. les phosphoglycéro-acétols :



Tous ces phosphatides ou phospholipides constituent la partie essentielle des mucilages. Certains ont la propriété de s'hydrater et de précipiter, d'autres sous l'action de réactifs comme le chlorure de sodium ; le phosphate de soude ou des traces d'acides minéraux (HCl ou NO_3H) précipitent également.

Ils sont plus ou moins solubles dans l'hexane, doù leur extraction des graines par ce dernier. Cependant lors de l'analyse, le résultat de la teneur vraie en huile proprement dite est faussé puisque lors du raffinage l'opération de démucilagination les éliminera

I-1.c. <u>Les insaponifiables</u> :

On désigne sous le nom d'insaponifiables l'ensemble des composés autres qu'esters de constitution plus au moins complexe.
La teneur des corps gras en ces produits est généralement très faible inférieure à 1 %.
Ils sont essentiellement composés de :

- A - carbones d'hydrogène
  - Aliphatiques lourd, paraffiniques tel que le : $C_{20}H_{42}$
  - Terpéniques (diterpènes) exemple : le $C_{30}H_{50}$
  - Carotènoides dont les carotènes

- B - d'alcools à poids moléculaire élevé
  - Saturés exemple : Alcool cétylique (dodécanol)
  - Aliphatiques non saturés ex: Alcool oléilique 9-10
  - Polunucléaires : stérols ex: chlolestérol, ergostérol

- C - de vitamines liposolubles
  Vitamine A : carotène
  D : calciférol ou vitamine D_1
  E : tocophérols
  K : dérivé de méthylnaphtoquinone.

- D - de glycérine :

$$\begin{array}{l} CH_2 - OH \\ | \\ CH - OH \\ | \\ CH_2 - OH \end{array}$$

- E - d'acides gras libres

- F -de cires qui sont des mélanges complexes d'esters ,d'acides gras et d'alcools supérieurs (C_{18} à C_{30})

Les caractéristiques physico-chimiques ainsi que la composition de l'insaponifiable pour une huile de maïs est donnée dans le tableau suivant T2 selon les normes établies par jp Wolff (réf 10)

I.2- Propriétés d'une huile alimentaire :

I.2.1 Propriété s physiques :

- Les corps gras selon leur composition chimique sont liquides ou solides.
  Les glycérides les constituant sont d'autant plus solides qu'ils sont saturés et que leur poids moléculaire est plus élevé.

Caracteristiques	Composition de l'insaponifiable en mg / 100g d'huile
D_4^{20} 0,919 - 0,923	Tocopherols 90 - 520
η_D^{20} 1,472 - 1,476	Alcools 150 - 300
IS 187 - 196	Sterols 300-1000
II 105 - 128	Campesterol 20%
Titre 14 - 20	Stigmasterol 6%
Insaponifiable 0,8-2,0%	β-Sitosterol 74%

Tableau T2 : Caracteristiques Physico-chimiques d'une huile de MAÏS.

Aussi réalisons nous des hydrogènations de certaines huiles quand on a besoins de produits solides.

En ce qui concerne les glycérides des saturés, leur point de fusion croît avec le nombre d'atomes de carbone, tandis que la solubilité dans l'eau et dans les solvants décroît avec le nombre d'atomes de carbone.

Par contre les glycérides insaturés ont un point de fusion qui décroît avec le nombre de double liaison tandis que la solubilité dans les solvants croît avec les doubles liaisons.

En ce qui concerne l'influence de la forme géométrique le point de fusion des cis est plus bas que le point de fusion des trans et la solubilité dans les solvants est plus grande pour les cis que pour les trans.

Les chaines grasses se caractérisent également par leurs propriétés spéctrales à savoir l'absorption dans l'ultraviolet des chaines polyinsaturées qui dépend du nombre des liaisons conjuguées, l'absorption dans le visible d'en présence de pigments, l'absorption caractéristique dans l'infra-rouge des groupements fonctionnels et enfin l'absorption des liaisons éthyléniques de forme trans entre 10 μ et 10,5 μ.

Les principaux critères physiques sont les suivants :

- la densité qui représente la masse de l'unité de volume en g/cm^3 à la température T° et qui se situe pour une huile végétale entre 0,915 et 0,964 et pour une huile de maïs en particulier entre 0,919 et 0,923.

- L'indice de réfraction qui représente la mesure du pouvoir réfrigent au moyen d'un réfractomètre par rapport à la Raie D du sodium.

- Le spectre d'absorption dans l'ultra-violet au moyen duquel on caractérise la double liaison dans une molécule insaturée.

- Le pouvoir rotatoire qui donne la déviation à droite de la lumière polarisée.

- Le point de fusion et le point de solidification qui permettent d'apprécier le degré de pureté d'un corps gras.

- La viscosité pour une température donnée qui est le coefficient de frottement moléculaire interne.

I.2.2 - Propriétés chimiques :

Les propriétés chimiques des glycérides dépendent essentiellement des acides gras qui les constituent.

D'une façon générale, ces acides gras sont caractérisés par :

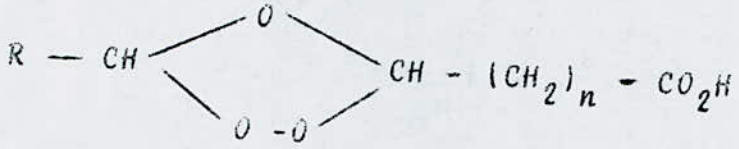
- une seule fonction acide
- une chaîne droite non ramifiée
- un nombre pair d'atomes de carbone

Les acides gras saturés sont solides, stables et ne peuvent avoir que des dérivés de substitution:
ex: acide stéarique C_{18}, acide palmitique C_{16}
Les acides gras insaturés sont liquides tels que :
l'acide oleique, linoleique $C_{18}:2$, linolénique $C_{18}: 3$
$(C_{18}: 1)$
et ils entrainent une oxydation par action de l'oxygène de l'air. C'est ce qui entraine que les huiles ayant une forte proportion d'acides gras insaturés sont très altérables par l'oxygène d'où des traitements particuliers pour les conserver.

En effet, il y aura la formation d'hydro-péroxydes sur les carbones voisins des carbones portant la double liaison.

$$CH_3 - (CH_2)_n - CH_2 - CH = CH - CH_2 - (CH_2)_n - CO_2H$$
$$+ O_2$$
$$\text{------}\ CH_3 - (CH_2)_n - \underset{\underset{O - OH}{|}}{CH} - CH = CH - CH_2 - (CH_2)_n - CO_2H$$

On peut également avoir la fixation de l'ozone qui entrainera la formation d'ozonides.



dont la destruction par l'eau donne :

$R - CHO + CHO - (CH_2)_n - CO_2H + H_2O_2$.

- Les principaux critères chimiques d'une huile sont les suivants:

  - L'indice d'acide I_a c'est le nombre de mg de potasse nécessaire pour neutraliser l'acidité de 1g de corps gras c'est-à dire les acides libres contenus dans 1g de corps gras.

  - L'indice de saponification I_s c'est le nombre de mg de potasse caustique (KOH) nécessaire pour transformer en savon les acides gras libres ou combinés d'un g de corps gras.

  - L'indice d'iode I_i c'est le nombre de g d'iode fixé par 100g de corps gras. C'est une addition pure et simple d'iode sur les doubles ou triples liaisons et qui caractérise l'insaturation du corps gras.

  - L'indice de péroxyde I_p il en existe plusieurs suivant la nature des péroxydes. Disons qu'il donne la quantité d'oxygène actif en milliéquivalents contenue dans 1000g de substance.

  - L'insaponifiable : c'est la matière qui n'est pas décomposée par la potasse et qui reste soluble dans les solvants habituels.

En plus de ces critères, une huile est caractérisée chimiquement par la répartition de ses acides gras dans les glycérides.

En effet ils ont des positions possibles en α ou β dans un glycéride.

α : CH_2OH
β : $CH - OH$
α : CH_2OH

Le nombre N de combinaisons possibles du glycérol avec n acides gras différents est :

$$N = \frac{1}{2} (n^3 + n^2)$$

Par exemple si on a n=3 acides gras différents palmitique, stéarique oleique on aura N = 18 triglycérides correspondants.

Un même acide gras ne peut se rencontrer 3 fois dans un même glycéride s'il n'existe pas dans une proportion au moins égale à 60% dans le mélange des acides gras totaux.
Il ne peut s'y rencontrer qu'une seule fois ci cette proportion est inférieure à 30%.
Mais on ne rencontre pratiquement pas de corps gras constitués par tryglycérides simples c'est-à dire d'esters glycéridiques formés par un seul type d'acide (tripalmitine, trideine, tristéarine).

Dans la très grande majorité des corps gras, les chaînes extérieures sont formées par les acides saturés et la chaîne interne par des acides insaturés.

Exemple:

Acide stéarique ——— CH_2
Acide oleique ——— CH
Acide palmitique ——— CH_2

I.2.3 - Propriétés biologiques :

Les acides gras essentiels tels que l'acide linoleique plus particulièrement le cis-cis, l'acide linolénique et l'acide arachidonique jouent un rôle physiologique très important.

En effet, ils interviennent contre la carence en corps gras et les

affections qui en dérivent.

Ils ont également la propriété de former avec le cholestérol du sang des esters qui sont fluides; autrement dit , ils diminueront la teneur du sang en cholestérol auquel on attribue des accidents cardio-vasculaires.

C'est pourquoi c'est une "vertu" particulière des corps gras de renfermer des acides gras insaturés en fortes proportions tels que l'huile de maïs, l'huile d'olive, l'huile de tournesol et l'huile de soya.

On admet qu'il ya une relation entre le taux de cholestérol dans le sang et le rapport :

$$\frac{\text{polynsaturés}}{\text{saturés}}$$

Ce rapport est optimum quand il est égal à 2 c'est donc pour cela que l'huile de germe de maïs est très appréciée dans certains secteurs de l'industrie alimentaire : condiments pour salade, mayonnaise, plats préparés, fritures industrielles et semi-industrielles et comme excipient pour vitamines et autres produits pharmaceutiques.

[illegible]

CHAPITRE II

Procédé d'obtention de l'huile de germe de Maïs

II- Origine du maïs utilisé :

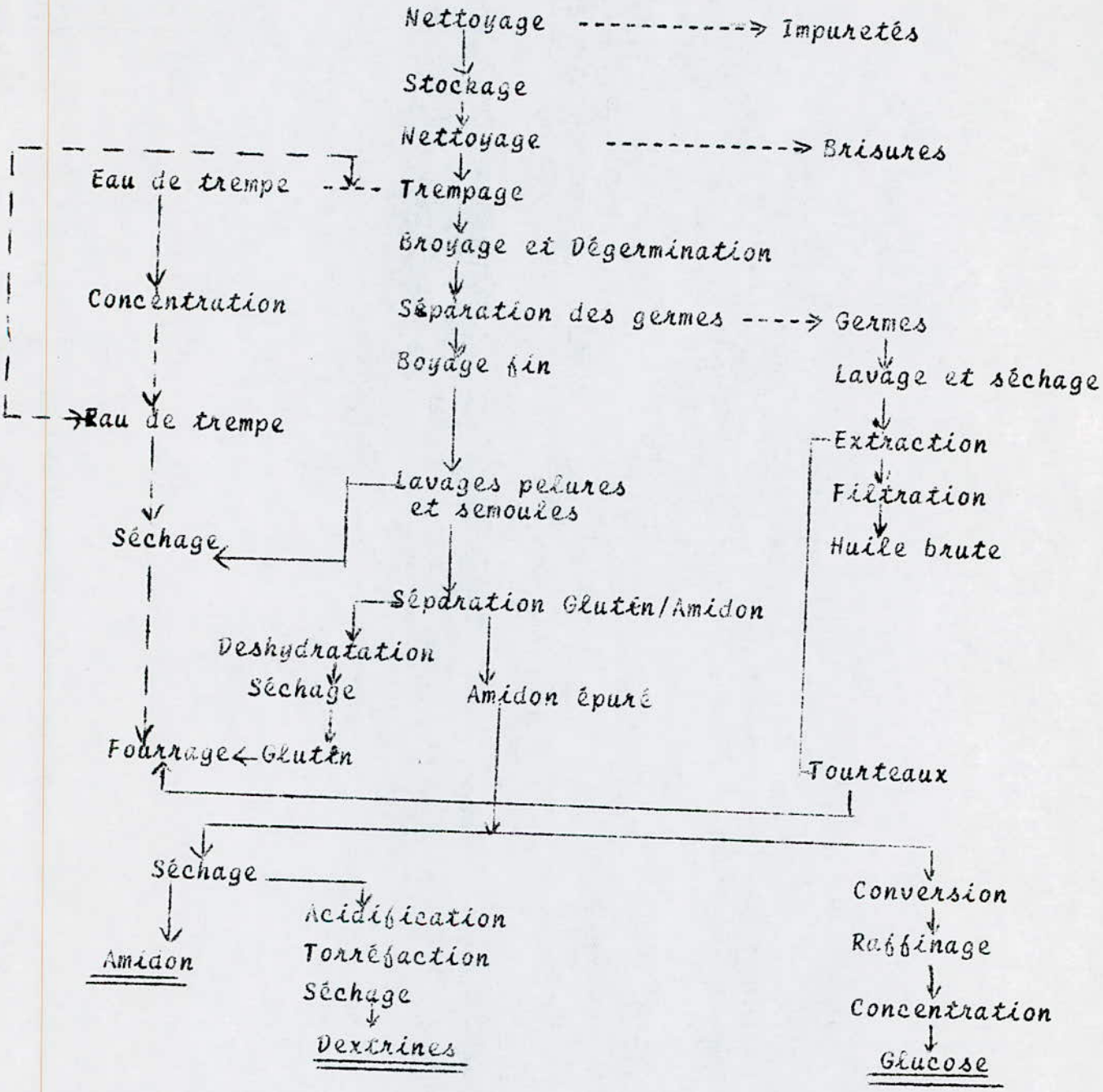
Le complexe de transformation du maïs se situe à Maghnia. Il comprend 3 ateliers de fabrication :

- L'amidonnerie
- La glugosérie
- la dextrinerie

Le maïs utilisé est américain :l'hybride US CornII yellow qui est stocké dans des silos de 1000 tonnes chacun.
La capacité totale de stockage de l'unité est de 200t/jour.
La gamme de production du complexe s'etend à :

- Amidon
- Glucose
- Dextrines blanches pour adjuvents (peintures)
- Dextrines jaunes (colles pour cuirs)
- Fourrage
- Glutin
- Huile de germes
- Brisures
- Coques de maïs

Le schêma suivant représente le processus global de transformation du maïs.



II.2 -<u>Procédé d'extraction de l'huile</u> : <u>l'huile de maïs</u> est extraite suivant différentes opérations qui sont :

A- <u>Stockage de la graine de maïs</u> :

Le maïs est stocké avec un taux d'humidité maximum de 14 % ce qui permet de tenir le germe vivant.

B- <u>Trempage</u> :

Par un système de pompage ,la graine est acheminée vers un bac de trempage ou elle est trempée dans une eau souffrée représentant un agent de conservation pendant 50 h à une température comprise entre 45 et 50°C. Cette opération permet de faciliter la séparation des germes des graines lors du broyage.

C- Dégermination :

Les germes sont alors séparés ,après broyage des graines par un système de vibration .Ils sont ensuite stockés dans un bac à germe

II.2.3 - Déhydratation :

Par un système de presse, les germes ayant une teneur en humidité d'environ 38% subissent un préséchage qui élimine la majeure partie d'eau absorbée au cours du trempage.

Au moyen d'un séchoir la teneur en humidité des germes qui était de 38% environ est ramenée à une valeur de 6% maximum.

Si le taux d'humidité dépasse 6%, on envoie les germes dans un réchauffeur réglé à une température de 115°C jusqu'à ce qu'on fixe la teneur à 6%.

II.2.4 - Pressage :

Grâce à l'utilisation de presses de forme conique,les germes subissent une double pression (presse verticale suivie d'une presse horizontale) qui permet d'obtenir un rendement en huile de 40% environ.

II.2.5.- Filtration - conditionnement :

L'huile reprise par un racleur est acheminée vers un filtre presse

où s'effectue la séparation huile - tourteaux.

L'huile ainsi obtenue est envoyée vers un bac final et ensuite conditionnée dans des fûts métalliques de 200 litres.

Le schéma des installations d'extraction de l'uile de germe de maïs est représenté sur la figure suivants:

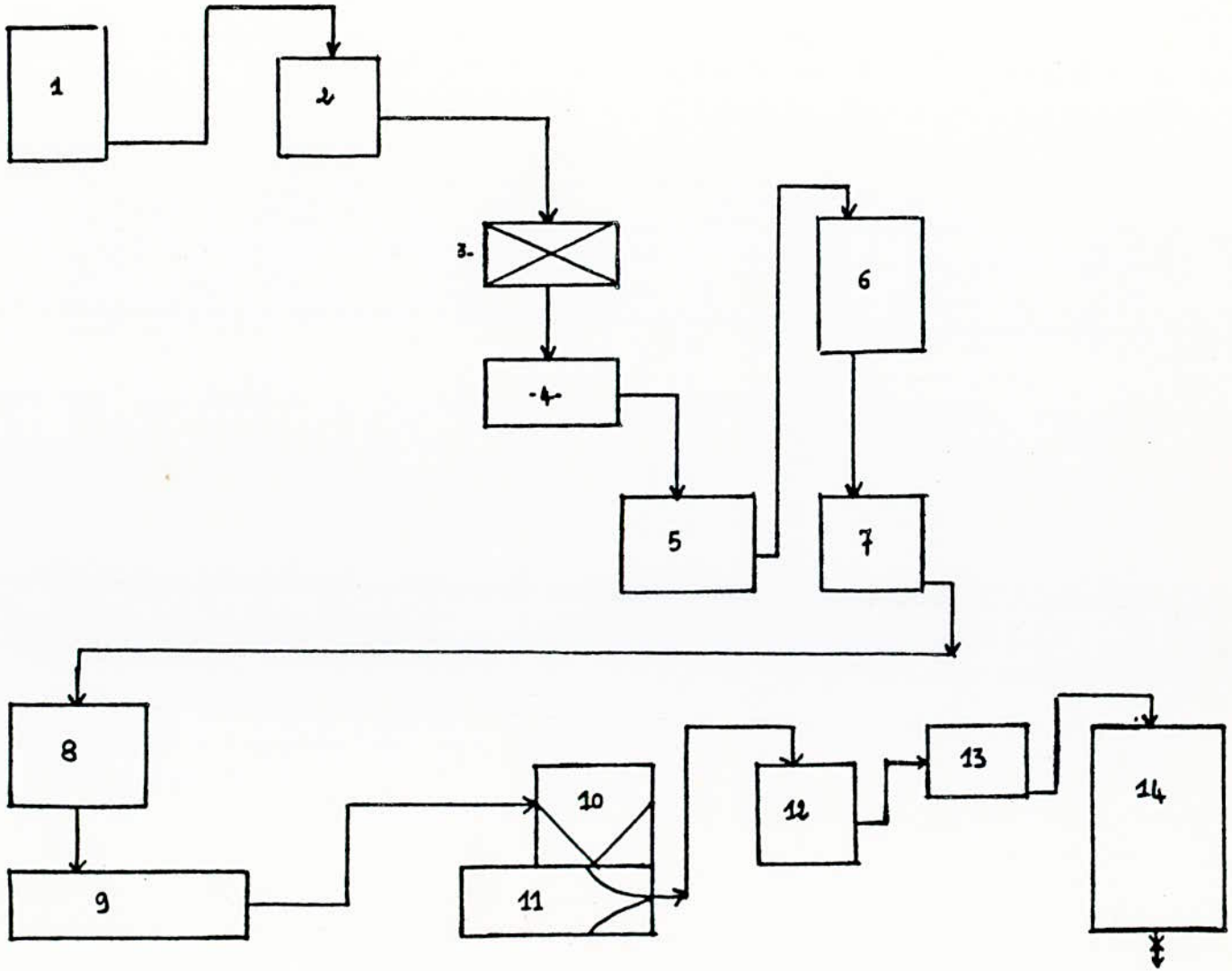
La légende du schéma se constitue ainsi :

-1- Silo de Maïs
- 2- Bac de trempage
-3- Broyeur
-4- Bac de dégermination
-5- Bac à germes
-6- Presse à déshydrater
-7- Séchoir
-8- Bac de stockage des germes
-9- Réchauffeur
-10- Presse d'extraction verticale
-11- Presse d'extraction horizontale
-12- Racleur
-13- Filtre presse
- 14- Bac reception huile de germe et mise en fûts.

II.3.- <u>Procédé de raffinage de l'huile brut</u> :

L'huile brut obtenue à l'unité de transformation du maïs de Maghnia est ensuite acheminée vers l'unité de raffinage du port d'Alger afin d'y subir toutes les opérations de raffinage nécessaires avant sa commercialisation.
Ces opérations consistent à débarasser l'huile des impuretés qu'elle renferme encore après son extraction et qui sont en général principalement des acides gras libres et des phospholipides qui eux jouent un rôle dans l'altération de l'uile (voir chapitre III).

Schéma des Installations d'Extraction de l'huile de germe de Maïs



Ce procédé comporte donc les étapes suivantes :

-1- La démucilagination : c'est un traitement à l'eau chaude qui insolubilise les phospholipides ainsi que diverses matières colloïdales (polysaccharides , gommes , résines) ; les deux phases sont ensuite séparées par centrifugation.

-2- La neutralisation (ou raffinage)

L'huile est portée à 80 -90°C puis agitée avec de la soude ou de la potasse. Les acides gras libres responsables de l'acidité et de l'oxydabilité de l'huile passent dans la phase acqueuse sous forme de savons et sont éliminés lors de la décantation ou de de la centrifugation qui suit .

L'huile est ensuite lavée à l'eau pour éliminer les résidus d'alcali et de savon puis deshydratée sous vide environ (environ 35 torrs).

-3- La décoloration :

La décoloration a pour but d'enlever la chlorophylle et les pigments caroténoïdes; à cette fin l'huile préalablement chauffée au-dessus de 100°C est deshydratée, est traitée par du charbon activé ou autre adsorbant puis filtrée; l'opération détruit les péroxydes et élimine en grande partie les traces de métaux.

-4- La démargarination :

Cette opération appelée aussi frigellisation ou "Wintérisation: consiste à faire cristalliser à basse température et à éliminer ensuite par filtration ou centrifugation des tryglycérides à point de fusion relativement élevé qui risqueraient de cristalliser dans l'huile au cours de l'entreposage. On traite ainsi certaines huiles de table telles que l'huile de maïs et de tournesol.

-5- La désodorisation:

La désodorisation est obtenue en éliminant par distillation sous vide (2à9 torrs) avec un léger entrainement à la valeur d'eau, des substances comme les aldéhydes et les cétones souvent responsables d'odènes désagréables et les acides gras libres encore présents dont certains sont très sensibles à l'oxydation.

On ajoute parfois des antioxydants ainsi que certains sels(citrates, phosphates,tartrates) qui complexent les traces de métaux,cuivre et fer notamment, pouvant être présents.

Après la désodorisation l'huile doit être séchée pour éviter l'hydraolyse des triglycérides et placée à l'abri de l'air sous azote par exemple.

Les divers traitements de purification que l'on vient de décrire permettent de modifier la teneur moyenne en impuretés d'une huile dans le sens qu'illustrent les chiffres ci-après:

	Huile initiale	Huile finale
Triglycérides	85 - 89	98 - 99
Acides gras libres	jusqu'à 5	0,1
Phospholipides	jusqu'à 3	0,1
Stérols	jusqu'à 2	1
Tocophérols	0,14	0,09

Les Tocophérols dont la vitamine E sont des antooxydants naturels dont la présence est souhaitable; ils sont peu touchés par la purification. alcalins et saturés d'humidité de l'ordre de 90% comme certaines levures,elles peuvent à la fois contaminer la matière et l'hydrolyser.

B- Action des enzymes

On sait que les enzymes sont des composés définis,complexes agissant comme catalyseurs.

En outre;la lipase hydrolyse les triglycérides provoquant ainsi

une double perte en huile : la partie hydrolysée = acide gras + glycérine et la partie qui sera entraînée ultérieurement avec les savons formés lors du traitement à la soude.

C- Action de l'air :

L'action de l'air sur les lipides est très connue. En effet les constituants insaturés sont particulièrement sensibles à l'oxydation même à la température ordinaire et d'autant plus que cette température est plus élevée.

D- Altération par les interactions :

Suivant la température à laquelle se trouvent soumises les graines et la durée de stockage, il se produit les modifications suivantes

- modifications des teneurs en protides et particulièrement des acides aminés qui se combinent aux sucres réducteurs. Ceci se produit pour des humidités relatives comprises entre 25 et 70% à des températures supérieures à 100°C et se développement avec la durée du chauffage.

.../...

CHAPITRE III

Altération d'une huile

Les phénomènes d'altérations d'une huile sont très divers. En effet une huile peut subir les phénomènes d'altérations au cours des quatre principales opérations avant sa mise à la consommation à savoir :

la réception et le stockage des graines
l'extraction de l'huile
le raffinage
la conservation

Nous parlerons de deux problèmes à savoir le stockage des graines et la conservation du produit fini c'est-à-dire l'huile raffinée.

III.1- Le stockage des graines :

En effet, lorsque les graines sont réceptionnées elles ont été conservées pendant au moins trois ou quatre mois. Pendant ce temps elles font donc l'objet de plusieurs causes d'altération tel que

-A- L'action des microorganismes en présence d'humidité tel que:
- 1 les moisissures
- 2 les levures
- 3 les bactéries

-B- Action des enzymes

-C- Action de l'air

-D- Interaction de certains constituants

-A.1- Action des moisissures:

On sait que les moisissures sont des champignons microscopiques qui se developpent le plus souvent en présence de l'air et de préférence dans les atmosphères chaudes et humides.

Les aspergillus sont des agents responsables le plus souvent de l'acidification des graines oléagineuses.
Leur action se manifeste d'autant plus que l'humidité du milieu est plus elevée au delà de 62,5% et même de 20%. Le résultat de cette action est donc essentiellement l'hydrolyse des glycérides d'où formation de di et de monoglycérides et parfois libération de glycérol.

Enfin certaines moisissures peuvent déposer des produits toxiques. C'est le cas de l'aspergillus Flovus qui secrète l'aflatoxine redoutable poison.

A.2- <u>Action des levures</u> :

On sait qu'elles sont composées d'une seule cellule. Leur developpement s'observe au-dessus d'une humidité relative supérieure à 88% principalement sur les glucides présents dans les graines.

A.3- <u>Action des bactéries</u> :

Ce sont des organismes semblables mais beaucoup plus petits qui se reproduisent par simple scission de leur cellule.Elles se developpent de préférence dans les milieux

- formation de complexes lipoproteiques.

Ces transformations nuisent aux rendements en huile et à sa qalité ainsi qu'à celle des tourteaux résiduaires.

En résumé nous remarquons que les altérations que subit une graine sont favorisées par les éléments suivants : température, humidité, air , brisures des graines.

Conclusion : connaissant les causes et les facteurs de l'altération il est nécessaire de respecter coûte que coûte les conditions de stockage des graines car de toute évidence si les graines sont altérées, quelque soit le raffinage appliqué on n'obtiendra jamais un produit de bonne qualité

III.2- La conservation:

Les facteurs d'altération d'une huile raffiné sont les suivants :

- l'air qui provoque l'altération oxydative des acides gras constitutifs, des triglycérides avec production d'aldéhydes et d'alcools qui sont les principaux éléments de la rancidité.Cette action est d'autant plus grande que les acides sont insaturés.

- la lumière qui catalyse l'autoxydation

- la chaleur au delà de 150°C

- les corps étrangers provenant des parois des récipients qui les contiennent et plus spécialement des traces de métaux tels que le fer et le cuivre.

Contre l'activation des métaux présents, on utilise les additifs s suivants : (réf2)

le sorbital

l'acide phosphorique (avant la dimucilagination)
0,30 à 00 d'une solution à 75 %

L'acide citrique 0,005 à 0,01% d'une solution à 50%

Contre l'oxydation dans ses diverses manifestations ont peut incorporer aux corps gras suivant la législation des pays les antioxygènes suivants :

- Les gallates de propyle, d'octyle de dodécyle à la dose de 0,1à 0,2%.

A noter que pour les corps gras purs, le gallate de dodécyle à la dose de 0,1 à 0,2% est plus indiqué pour certaines préparations acqueuses le Gallate de propyle est préférable.

- Le Palmitate d'ascorbyle (poudre blanche de PF (07-108°) à la dose de 0,01 à 1 g %

- Le Rancibitiol à la dose de 0,1 à 0,2%

- Le BHT (ditertiobutyl-hydroxytoluène).Il possède en outre la propriété de protéger les vitamines A et B.

- Le BHA (tertiobutyl-hydroxyanisol) est un mélange de deux isomères le 3-tertiobutyl hydroxyanisol et le 2 tertiobutyl hydroxyanisol.
  Il est employé à la dose de 0,1 à 0,2 %.
  Il est en outre thermiquement résistant et utilisé en industrie cosmétique dans les corps gras qui sont à la base de produits de beauté.

- Le DBPC (Dibutyl tertiaire paracrésol) à la dose de 0,1%

- Le NDGH (acide nordhydro-guaiarétique) à la dose de 0,1 %

- Les Tocophérols. Nous noterons que les tocophérols se trouvent dans les huiles de graines à l'état libre ou partiellement estérifié.Ils constituent la vitamine E liposoluble et représentent aussi les antioxygènes naturels les plus importants.
  Le fait que la vitamine E est stable fait qu'elle n'est pas détruite au cours du raffinage.

Le tocophérol

constitue une fraction interressante de la partie insaponifiable de l'huile de maïs. Il protège l'huile contre une oxydation rapide en dépit de sa forte teneur en esters linoleiques .

Les tocophérols totaux représentent 1% du poids de l'huile et sont constitués principalement par des dérivés dont le pouvoir anti-oxygène est relativement élevé.

En effet la plupart des altérations sont dûes essentiellement à une oxydation des chaînes grasses insaturées. L'oxydation par l'oxygène de l'air commence par la formation d'un péroxyde.
C'est une réaction autocalytique qui débute très lentement et qui, après une période d'induction s'accelère de facon exponentielle

- A température ambiante ,la réaction prédominante est la formation d'un hydropéroxyde en α de la double liaisons et d'un épidioxyde. Dès que la préroxydation devient notable les péroxydes sont immédiatements détruits pour donner des composés secondaires d'oxydation schématiquement ont peut les classer en trois catégories :

- Les produits de scission : résultent de la coupure dans la chaine grasse au niveau de la double liaison. Ils donnent des composés à courtes chaînes dont les plus importants sont les aldéhydes et les cétones. Ces derniers sont responsables de l'odeur des corps gras rances.

- Les produits oxydés ayant même longueur de chaîne sont les cétones insaturées, des dicétones et des hydroxyacides.

- Les produits d'oxydation de poids moléculaire supérieur ,résultant de la polymérisation de plusieurs chaînes oxydées.

D'autre part, les mucilages résiduels ont également un rôle néfaste sur la conservation des huiles imparfaitement raffinées. Les phosphatides,en effet, au contact de l'eau s'hydratent puis d'insolubilisent ce qui se traduit d'abord par un trouble ou un louche puis un dépot donnant un aspect peu engagent à l'huile.

Ces phosphatides hydratés étant plus facilement altérables sont évoluer dans le temps et libérer des constituants aminés qui communiqueront à l'huile une saveur et une odeur désagréable.C'est donc pour cela qu'il convient de les faire disparaître afin de conserver à l'huile toute sa valeur commerciale et alimentaire. L'interêt d'une démucilagination poussée apparaît donc nettement.

CHAPITRE IV

La chromatographie en phase liquide

Généralités :

En général une analyse chimique répond à deux objectifs :

1- Découvrir de quels éléments se compose l'échantillon.
2- Mesurer la concentration de l'un ou des éléments comparant l'échantillon.

Pour cela, les techniques chromatographiques placent maintenant parmi les méthodes les plus importantes utilisées pour l'analyse des matières organiques.

Il y a essentiellement deux sortes de chromatographie

- la chromatographie en phase gazeuse
- la chromatographie en phase liquide.

Dans sa conception, la chromatographie présente une grande analogie avec la distillation fractionnée.
Elle repose en effet sur un processus d'échange de matière entre deux phases en mouvement relatif dans une colonne, l'une est stationnaire et remplit une colonne, l'autre est mobile et s'écoule d'une extrémité à l'autre de la colonne au contact de la phase stationnaire.
La séparation est basée sur les phénomènes de partage des espèces à séparer entre les deux phases et exploite les différences qui existent entre elles de ce point de vue.

La dénomination "chromatographie " provient de ce que cette mathode a été initialement utilisée pour la séparation de composés naturels dont les colorations permettaient de suivre l'évolution dans la colonne. Son domaine d'application est devenu tout à fait général de cette appellation consacrée par l'usage n'a plus avec ce qu'elle désigne que ce rapport historique.

Historique :

La chromatographie en phase liquide est l'une des plus anciennes méthodes d'analyse chimique. En effet, elle doit son nom à sa première caractéristique c'est-à-dire la séparation par les couleurs En effet, elle a été inventée et utilisée pour la première fois en 1902 par le botaniste russe TSWETT dans le but d'isoler des pigments contenus dans les plantes. Initialement la chromatographie liquide dite "classique" c'est-à-dire la chromatographie sur papier, sur couches minces, sur colonne ouverte, par échange d'ions était caractérisée par des séparations extremement lentes basée sur le phénomène de gravité.

Evidemment pour une époque aussi exigente que la nôtre en matière de rapidité et d'efficacité, cette lenteur des séparations obtenues a fait que cette méthode a été délaissée au profit de sa "soeur": la chromatographie en phase gazeuse dont la technique s'est averée beaucoup plus rapide du fait qu'elle s'appuyait sur la vitesse de migration d'un soluté gazeux.

Plus pard l'augmentation de la vitesse fût obtenue en pompant la solution et en " poussant" le soluté dans la colonne jusqu'à des pressions de 400 bars. Des détecteurs plus performants furent mis au point et permirent à la chromatographie en phase liquide de reprendre la place qui lui convenait dans la résolution des problèmes d'analyse chimique.

En effet, sont apparus les détecteurs à indice de réfraction et les détecteurs à ultra-violet très sensibles.

C'est ainsi que la chromatographie liquide dite "moderne" née avec Huber et Hulsman en 1967 s'est vue octroyé les qualificatifs de " sous haute pression ", " à grande vitesse", "à haute performance" "à haute efficacité, ou "à haute sensibilité".

IV.1- Principe de la HPLC

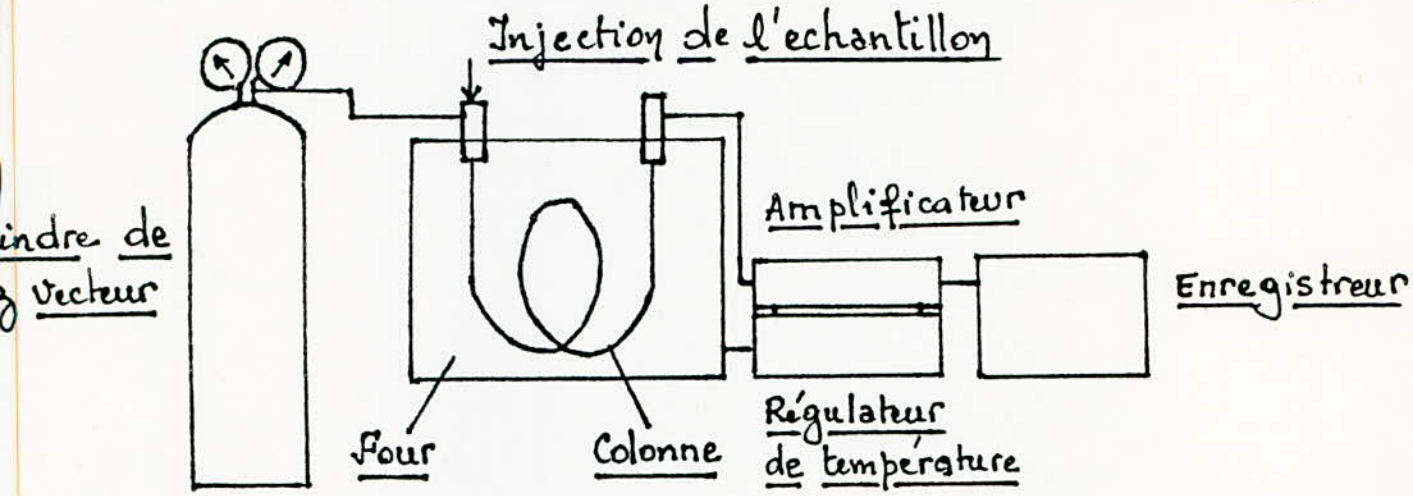
La chromatographie en phase liquide repose sur le fait qu'au lieu de travailler avec des composés volatifs migrant le long d'une colonne chromatographique à l'aide d'une phase mobile gazeuse comme c'est le cas en chromatographie en phase gazeuse, nous analysons directement les solutions liquides en utilisant un système de pompage qui va permettre de faire circuler la phase mobile liquide dans la colonne sous des pressions pouvant atteindre 400 bars afin de "pousser" le soluté à migrer dans la colonne. Afin de mieux comprendre le principe de la chomatographie en phase liquide il serait peut être avantageux de faire une comparaison avec si l'on peut s'exprimer ainsi, sa "voisine" c'est-à-dire la chromatographie en "phase gazeuse. Pour cela faisons les schémas très simplifiés de ces deux techniques. (voir fign°1).

Nous pourrons alors voir l'analogie frappante qu'il existe entre ces deux dernières. En effet la seule différence visible est qu'à la place d'une phase mobile gazeuse il y a une phase mobile liquide circulant grâce à une pompe. Mais nous retrouvons la colonne, le détecteur, l'amplificateur et l'enregistreur. Mais il est clair que les deux techniques sont complémentaires c'est-à-dire que lorsque l'une d'elles ne répond plus aux exigences requises pour une analyse donnée c'est l'autre qui prend "la relève. En effet pour la chromatographie en phase gazeuse, l'échantillon doit être volatil et de plus doit être stable thermiquement à la température à laquelle on doit le vaporiser. La chromatographie en phase liquide, elle ne souffre pas de ces limitations du fait que l'échantillon parcourt la colonne en phase liquide souvent à la température ambiante.

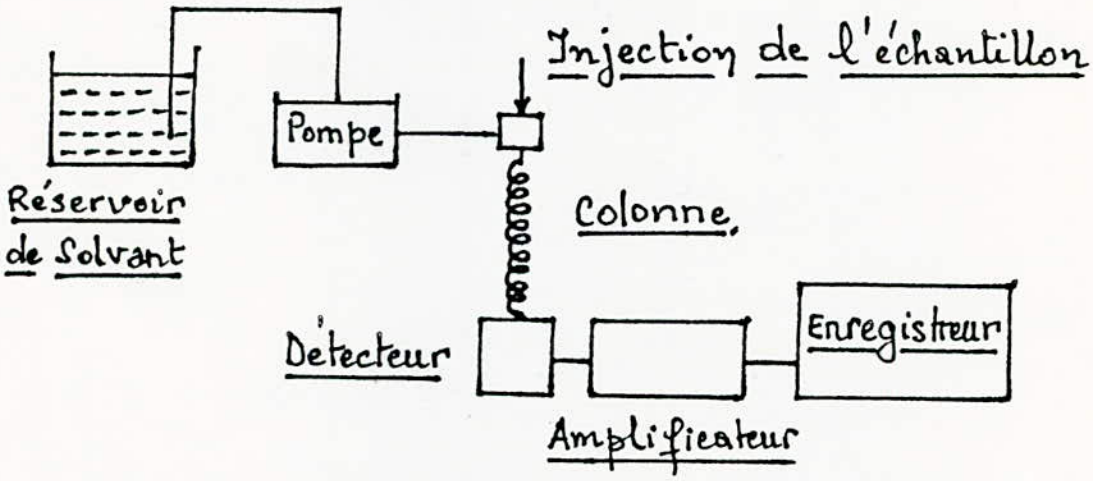
De plus cette technique nous permet d'analyser des échantillons de poids moléculaires assez élévés, c'est pour cela qu'elle offre de nos jours un très large eventail d'applications dans tous les secteurs à savoir la pharmacie, la biochimie, la cosmétologie, l'alimentation, les plastiques et dans les problèmes d'environnement.

Dans le tableau T_3 est représentée la liste des familles de séparations par chromatographie liquide réalisé par Waters jusqu'à fin 1977. (Waters étant la marque du chromatographe sur lequel nous avons travaillé).

Chromatographe en Phase gazeuse typique



Chromatographe liquide typique



- fig n°1 -

Tableau 3

PRODUITS NATURELS SYNTHESE ORGANIQUE

Alcaloïdes
Caroténoïdes
Colorants
Hormones juvéniles
Intermédiaires organiques
Pigments biliaires
Polynucléaires
Porphyrine, aromatiques
Produits forestiers
Produits naturels
Prostagiandines
Sesquiterpènes

PHARMACIE COSMETOLOGIE

Alcaloïdes
Analgésiques
Anesthésiques
Antiasthmatiques
Anticonvulsants
Antihistamines, antitussifs
Antibiotiques
Antiseptiques
Barbituriques
Hormones, thyroïde
Produits cardio-vasculaires
Sédatifs
Stéroïdes
Stimulants
Vitamines

BIOLOGIE / BIOCHIMIE

Acides aminés
Acides gras
Acides nucléiques
Anticancer
Catécholamines
Lipides
Médicaments dans les liquides biologiques
A) urine
B) sérum, plasma
C) autres
Métabolisme des médicaments
Peptides
Polyamines
Protéines
Stéroïdes

ALIMENTATION / BOISSON

Adjuvants boisson
Acides organiques
Aflatoxines
Antioxydants
Colorants
Conservateurs
Flavonoïdes
Additifs médicamenteux dans fourrage
Pesticides
Sucres
Sucrants artificiels
Vitamines ajoutées
Conditionnement, emballage

POLYMERES / PLASTIQUE PETROLE / ENERGIE

Acryliques
Additifs, polymères
Antioxydants
Caoutchoucs naturels
Cellulosiques
Comburants
Cristaux liquides
Epoxy
Oligomères
Peintures
Pétrole, huiles et dérivés
Phénol
Plastifiants (phtalates)
Polycarbonates
Polyamides, Polyesters
Polyoléfines
Polyvinyliques (Chlorure, acétate,
Polyuréthannes
Silicates
Surfactants, phénoliques

ENVIRONNEMENT

Pollution de l'air
Herbicides
Pesticides
Analyses du sol
Analyses de traces
Pollution de l'eau

SCIENCES JUDICIAIRES

IV.2 Théorie de l'élution :

Le principe de la chromatographie est basé sur la différence de distribution des composés constituant l'échantillon à analyser entre les deux phases mises en jeu à savoir la phase stationnaire et la phase mobile.

Pour tout système de chromatographie on caractérise cette distribution par le coéfficient de distribution ou encore coefficient de partage P défini par la relation

$$P = \frac{Xs}{Xm}$$

Xs --- concentration du soluté dans la phase stationnaire
Xm --- concentration du soluté dans la phase mobile.

De même que la séparation des éléments composant un échantillon se fait grâce à la colonne. En effet lorsqu'on désire effectuer la séparation complète de composés possèdant des propriétés analogues on doit utiliser une technique qui porte le nom de developpement par élution ou séparation par élution qui peut se traduire de la façon suivante :
soit un corps dont on sépare un petit échantillon à l'extrémité d'une colonne contenant la phase stationnaire.Si le coefficient de partage P de la substance est très grand, celle-ci se fixe intégralement dans les premières couches de phase stationnaire.Puis lorsqu'on réalise l'écoulement de la phase mobile appelée éluant il ne se produit pratiquement pas d'entraînement de la substance d dans le sens de la circulation de l'éluant même après un grand volume de celui-ci.Si au contraire le coefficient de partage est très petit,la substance ne se fixe pratiquement pas dans la phase stationnaire et l'éluant l'entraine intégralement dans son écoulement à travers les interstices de la phase fixe.
La substance sort alors de la colonne au bout d'un très petit volume d'éluant.

Si enfin,la substance présente un coefficient de partage P de valeur moyenne, l'éluant pourra l'entrainer dans son mouvement plus

au moins rapidement selon que P est plus au moins petit.

Soit un mélange de 2 corps A et B sur lequel on repète l'opération précédente. Si le coefficient de partage Pa de A est très grand et le coefficient de partage Pb de B très petit, l'éluant n'entrainera que le composé B et la séparation sera effectuée avec un très petit volume d'éluant lorsque B sera intégralement sorti de la colonne.

Si Pa et Pb sont tous deux très petits, il n'y a pas de séparation car A et B sont entrainés en même temps par l'éluant.

Si Pa et Pb sont tous deux très grands, la séparation n'est pas réalisable non plus. Mais si Pa et Pb ont des valeurs moyennes et suffisamment différentes A et B sont entrainés par l'éluant à des vitesses différentes et sortiront de la colonne après des volumes d'éluant différents, le composé ayant le plus petit coefficient de partage apparaissant avant l'autre.

On peut généraliser la raisonnement au cas d'un nombre quelconque de constituants dans le mélange. On obtient ainsi leur séparation sur un chromatogramme sur lequel on peut obtenir 3 sortes d'informations :

a- composition qualitative de l'échantillon
b- composition quantitative de l'échantillon
c- état de l'appareil

a- <u>Analyse qualitative</u> :

L'identification des pics dans un échantillon de composition inconnue peut être effectuée en mesurant le temps de retention du pic. On compare alors le temps de rétention à celui d'un échantillon standard connu. La définition du temps de retention est la suivante :

C'est le temps qui s'écoule depuis le moment de l'injection jusqu'à l'apogée du pic (voir fig. 2).

Afin de mesurer le temps de retention, il est necéssaire de fixer les paramètres suivants :

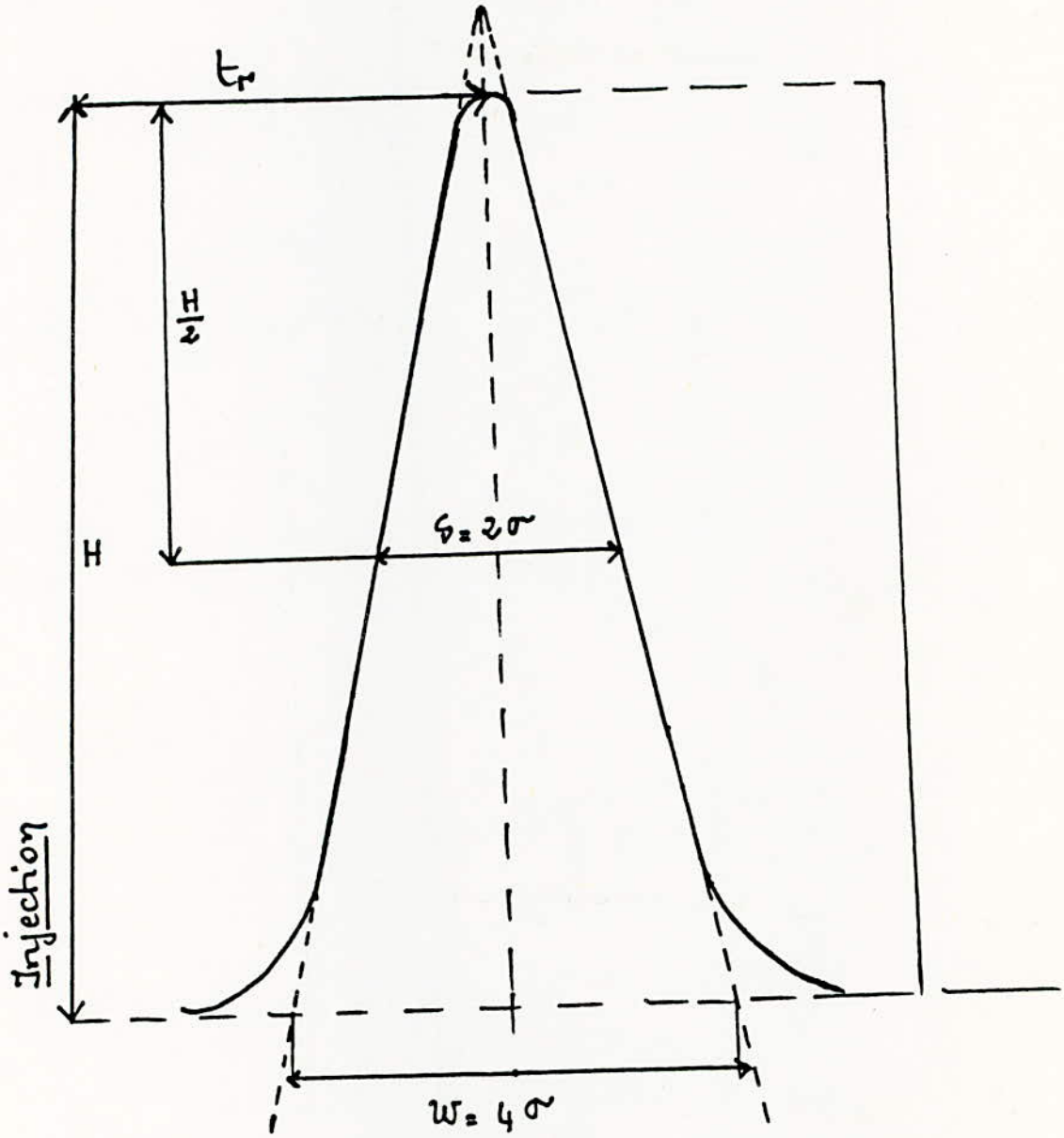


figure 2

a- longueur de la colonne et substance qui la remplit
- débit du liquide vecteur
- Pression

La mesure la plus précise du temps de rètention est obtenue en utilisant un intègrateur èlèctronique. Si l'on n'en dispose pas on emploie la mesure de la distance sur le graphe.

C'est pourquoi on peut exprimer le temps de rètention en secondes ou en centimètres.

On peut également grâce au débit D de la phase mobile définir le volume de rètention Vr par la relation suivante:

$$Vr = Tr.D = Tr.V.S$$

V. vitesse linéaire de la phase mobile
S. section de la colonne
Vr. représente le volume de phase mobile nécessaire pour éluer chaque composé.
Tr. Temps de rètention

b-<u>Analyse quantitative</u> :

Cette analyse repose sur l'étalonnage du détecteur grâce à des solutions standards de concentration connue. On compare le concentration avec la surface du pic.

En effet, l'aire du pic obtenu est en principe proportionnelle avec des quantités connues permet de s'en assurer et de connaître le coefficient de proportionnalité qui est relié à la concentration du composé par la relation suivante :

$$m = K.A.$$

m - masse de substance ayant traversé le détecteur
A - aire du pic correspondant
K - facteur de proportionnalité ou coefficient de réponse relié ou fonction de la sensibilité propre du détecteur vis à vis du constituant.

La determination des valeurs A et K constitue l'analyse quantitative.

La determination de l'aire du pice peut être effectué de manière différentes

-1- Par assimilation du pic à un triangle et donc :

$$A = 1/2 \text{ base} \times \text{hauteur}$$

ou $$A = \frac{h}{2} \times S$$ avec h- hauteur totale du pic

S- largueur du pic à la 1/2 hauteur

ceci dans le cas d'un pic gaussien (voir fig.)

-2- Par découpage du pic et la pesée du papier

-3- Par l'utilisation d'un planimètre.

-4- On peut dans certains cas remplacer la mesure des aires des pics par celles de la hauteur des pics quand on a des pics très fins et des séparations complètes des constituants.

c- <u>Etat de l'appareil</u> :

Le chromatogramme fournit des renseignements essentiels concernant l'état de l'appareil et de la colonne.
Lorsque l'appareil et la colonne fonctionnent correctement on doit obtenir un tracé présentant les caractéristiques suivants :

1- pics séparés les uns des autres
2- pics séparés du solvant
3- pics d'aspect symétrique
4- ligne zéro sans dérive
5- ligne zéro sans bruit

Il doit être également possible de répéter ce tracé en termes de temps de rétention et de surface des pics.Cependant du fait de défauts soit dans la colonne, dans l'appareil soit même dans la méthode d'échantillonnage ,on peut rencontrer certains effets indésirables comme ceux représenté (fig 3) Examinons-les individuellement :

-A- Allongement :

1- Dû à l'utilisation de la mauvaise phase stationnaire il faut changer la colonne.

2- La substance de support réagit sur l'échantillon c'est généralement une colonne usagée dans laquelle il est nécessaire de remplacer les quelques premiers centimètres par du produit frais.

-B- Allongement inversé :

Il est dû généralement à une surcharge c'est-à-dire la quantité d'échantillonage est trop grande pour être acceptée par la colonne. Il faut donc diluer l'échantillon.

-C- Dérive et bruit de la ligne zéro:

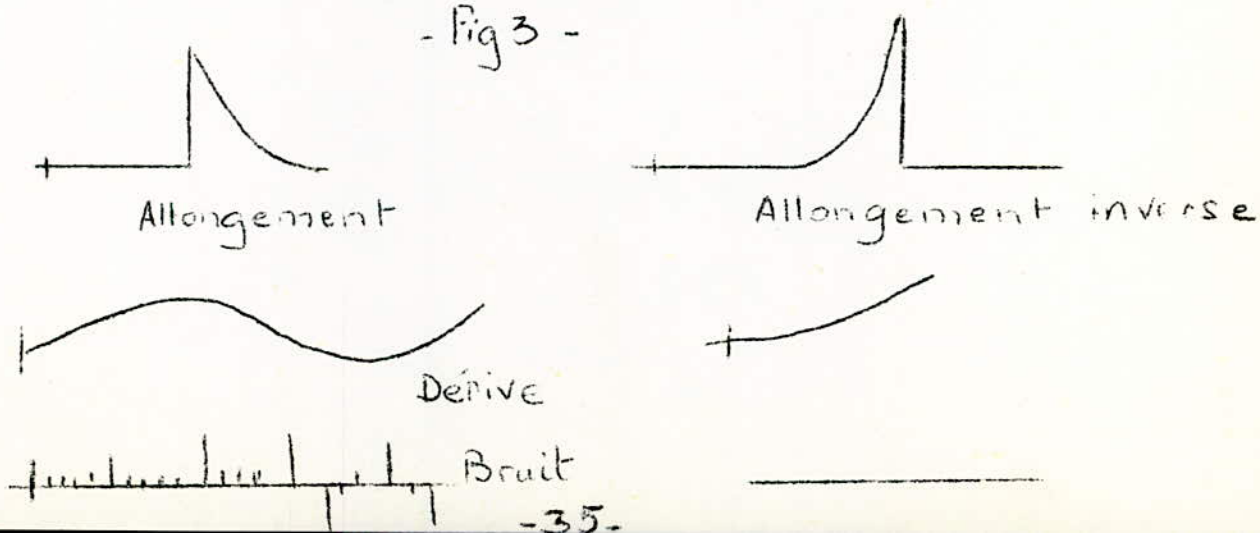
1- Bruit

Il peut être dû soit à l'enregistreur soit au détecteur qui peut être sale. Il faut donc éliminer l'enregistreur et s'il y a toujours apparition du bruit c'est que c'est le détecteur il faut donc le démonter et le nettoyer.

2- Dérive

Vers le haut ou vers le bas, la ligne de dérive est dû soit à une colonne mal conditionnée il faut donc la conditionner pendant la nuit soit est dû à une fuite de la colonne ceci produisant une ligne de dérive vers le haut seulement.

- Fig 3 -



IV.3 -Classification des méthodes chromatograpgiques:

Il existe quatre techniques principales utilisées pour produire une séparation en chromatographie liquide.Ce sont les suivantes :

- Adsorption liquide/solide (HPLSC)
- Partage liquide/liquide (HPLLC)
- Echange d'ions (HPIEC)
- Pénétration de gel (HPGPC)

Pour l'optimisation de ces techniques, on produit de nos jours des colonnes qui nécessitent des pressions élevées pour faire passer le solvant dans la colonne. De là le terme souvent utilisé de chromatographie liquide à haute pression.

-A- La chromatographie d'adsorption liquide/solide (HPLSC)

En HPLSC, la colonne contient un adsorbant en poudre tel que le gel de silice ou l'alumine et la séparation est produite du fait des affinités adsorptives différentes du contenu de la colonne pour les divers éléments entrant dans la composition de l'échantillon. Cette adsorption sur la phase stationnaire résulte le plus souvent d'interactions bipoles-bipole entre les groupements fonctionnels des substances chromatographiées et les sites actifs de l'adsorbant.

Cette technique s'applique très bien aux composés organiques dont le poids moléculaire est compris entre 200 et 1000 et de polarités différentes volatils ou non de même qu'à certains types d'isomères. Elle s'applique mal aux composés très peu polaires.Ce mode de chromatographie reste celui qui est le plus largement utilisé.

-B- La chromatographie liquide /liquide (HPLLC)

La LLC produit la séparation par un procédé de partage semblable à

celui utilisé en chromato gaz/liquide excepté le fait que le partage s'effectue entre deux liquides immiscibles: la phase mobile et une phase liquide stationnaire maintenue dans la colonne par une substance de support solide inerte et la retenant par une liaison chimique covalente. La séparation est fondée sur le partage des solutés, entre cette phase et la phase mobile elle également liquide, qui suivant des solubilités différentes dans une phase et dans l'autre s'en trouvent donc séparés.

Cette méthode s'applique pour la séparation de substances d'une même famille homologue et à des substances hydrophiles.

En chromatographie de partage comme d'adsorption il existe deux modes chromatographiques :

- la chromatographie liquide en phase normale
- la chromatographie liquide en phase inversée.

Le tableau 3 nous donnera la comparaison entre ces deux modes:

Mode chromatographique	normal	Inverse
Polarité de la phase stationnaire (support)	Moyenne à forte	Faible à moyenne
Polarité de la phase mobile (solvant)	faible à moyenne	moyenne à forte
Ordre d'élution des composés	les moins polaires en premier	les plus polaires en premier
Effet produit par l'accroissement de la polarité du solvant	réduit le temps d'élution	augmente le temps d'élution

-C- <u>Chromatographie par échange d'ions : (HPIEC</u>

Dans ce type de chromatographie la colonne contient une résine permettant l'échange d'ions. Cette résine se compose de substances polymériques contenant des groupes ionisés.
Si la résine entre en contact avec des solutions contenant des ions dans le cas d'un échangeur de cations, les cations seront échangés avec le cation attaché à la résine et dans le cas d'un échangeur d'anions ceux-ci seront échangés avec les anions de la résine.

Les espèces ioniques progresseront le long de la colonne dans la phase mobile en obeissant au phénomène de partage décrit dans III.1.2.

Les différents éléments entrant dans la composition de l'échantillon progresseront le long de la colonne à une vitesse qui dépendra de leur affinité avec la résine.

Ce type de chromatographie est principalement utilisé avec des solvants acqueux et pour l'analyse des espèces ioniques tels que les sels de composés organiques et plus particulièrement en biologie et en biochimie.

-D- Chromatographie par pénétration de gel (HPGPC)

La HPGPC est à la base une technique de tamisage moléculaire.
En effet la colonne contient une substance qui comporte des pores de de dimensions moléculaires dans lesquels les molécules de l'échantillon peuvent pénétrer. La profondeur de pénétration est inversement proportionnelle à la dimension de la molécule doù il découle que les petites molécules pénètrent plus loin que les molécules plus grosses.

Le retard apporté à la progression des éléments entrant dans la composition de l'échantillon le long de la colonne est fonction de la profondeur de pénétration dans les pores de la substance contenue dans la colonne et la séparation se produit si les composants de l'échantillon sont différents au point de vue de la dimension des molécules. L'ordre de séparation s'inverse donc c'est-à-dire que les

que les grosses molécules passent avant les petites.

Le contenu des colonnes en HPGPC se compose principalement de grains de polystyrène subi une préparation spéciale et au cours de cette préparation, les conditions sont contrôlées de manière que la dimension des pores soit approprié à l'application pour laquelle la résine est destinée.

L'application principale de la GPC concerne l'industrie des plastiques dans laquelle elle peut être utilisée pour déterminer la gamme des poids moléculaires des polymères en tant qu'indication concernant leur résistance, leur dureté...

IV.4- Rappels théoriques associés à la HPLC

Les différents paramètres existant en HPLC sont les suivants :

- facteur de résolution Rs
- selectivité d'une colonne
- efficacité d'une colonne, nombre de plateaux théoriques - nombre de plateaux efficaces.

1-Facteur de résolution Rs

Le facteur de résolution Rs entre deux pics 1 et 2 est défini par la relation:

$$Rs = \frac{2(Tr_2 - tr_1)}{W_2 + W_1}$$

ou tr_2 et tr_1 sont les temps de rétention des pics 1 et 2
W_2 et W_1 sont les largeurs à la base (voir fig. 2)

Donc plus Rs est grand et plus la séparation entre deux pics est meilleure.

Elle est complète quand Rs = 1

2-Facteur de capacité K

$$K = \frac{\text{quantité de soluté de la phase stationnaire}}{\text{quantité de soluté dans la phase mobile}}$$

$$= \frac{Xs}{Xm} \cdot \frac{Vs}{Vm} = P \cdot \frac{Vs}{Vm}$$

$$\text{ou } K = \frac{Vr - Vm}{Vm} = \frac{Tr - To}{To}$$

ou Vm ---Volume de la phase mobile de la colonne
Vr ---Volume de rétention d'un soluté
Vs ---Volume de la phase stationnaire
P ---Coefficient de partage
Xs ---Concentration du soluté de la phase stationnaire
Xm ---Concentration du soluté de la phase mobile
Tr ---Temps de rétention d'un soluté
To ---Temps de rétention du solvant

3- Selectivité d'une colonne :

Le facteur de sélectivité d'une colonne caractérise la distance séparant les sommets de 2 pics 1 et 2 .
Il est donnée par la formule suivante :

$$= \frac{Tr_2 - To}{Tr_1 - To} = \frac{K_2}{K_1} = \frac{P_2}{P_1}$$

4- Efficacité d'une colonne

La colonne chromatographique contient un nombre important de plateaux théoriques sur lesquels s'effectuent les échanges entre la phase stationnaire
la phase mobile et les solutés à séparer .

$$N = \left(\frac{Tr}{\sigma}\right)^2 = 16\left(\frac{Tr}{W}\right)^2 = 5,54\left(\frac{Tr}{S}\right)^2$$

W --- largeur du pic à la base définie comme la distance entre les points d'intersection des tangentes d'inflexion avec la ligne de base .

En général : $S = 2\sigma$ - largeur du pic à mi-hauteur.

Le nombre N mesure l'efficacité de la colonne.

Pour comparer entre elles des colonnes de différentes longueurs, on définit la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT)

$$HEPT = \frac{L}{N}$$ L : longueur de la colonne

En HPLC, la HEPT est donnée par la relation

$$H = A + CV^n$$

A est la contribution à l'élargissement du pic dûe à la diffusion turbulente du soluté de la phase mobile.

CV celle dûe à la résistance au transfert de masse entre les deux phases.

Nombre de plateaux efficaces de la colonne

Ce nombre donne de manière plus précise la véritable efficacité de la colonne

$$Neff = \frac{5{,}54\ (Tr - To)^2}{S^2}$$

Tr-To : temps réduit de rétention du soluté

IV.5 Appareillage utilisé en HPLC

L'appareillage utilisé est le modèle ALC/GPC 244 Waters associates.

Il comporte les éléments suivants :

1- Le reservoir de phase mobile pouvant contenir un solvant ou un mélange de solvant. Il doit être inerte vis à vis des phases mobiles. Les solvants doivent être très purs préalablement dégagés et filtrés avant leur utilisation.

2- La pompe (Modèle M6000) , c'est l'une des parties essentielles et la plus coûteuse du chomatographe. Elle permet d'exeler une

pression sur le soluté et donc de l'entrainer tout au long de la colonne. Ces pressions peuvent aller jusqu'à 6000 psi (400 bars).

Si l'on veut avoir un gradient d'élution c'est-à-dire variation de la composition de la phase mobile en fonction du temps, un deuxième reservoir ainsi qu'une autre pompe sont nécessaire.

3- L'injecteur qui permet l'introduction de l'échantillon dans la colonne.
Il existe deux types d'injecteurs :

a) Les injecteurs à seringue recommandés pour les analyses qualitatives nécessitant des pressions n'excédant pas 200 bars.

b) Les vannes d'échantillonage particulièrement adaptés à des séparations semi préparatives ou prépatives automatisés et repétitives qui peuvent supporter des pressions allant jusqu'à 400 bars.

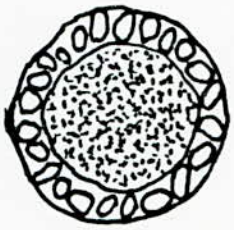
Le second type demeure le plus séduisant car il permet l'injection dans un tas à pression ambiante pouvant être mise en contact à un instant donné avec la phase mobile.

[illegible] 22.

Cet injecteur est tout particulièrement désigné pour permettre d'utiliser des échantillons lourds et d'utiliser des pressions allant jusqu'à 6000 psi (400 bars) sans interrompre l'écoulement du solvant.

4- La colonne est l'élément le plus important de l'appareillage puisque son choix est determinant dans l'analyse à effectuer. En effet pour chaque type d'analyses de produits determinés il y a une colonne appropriée.
Etant donné qu'on utilise de fortes pressions, la colonne est droite et fabriquée dans un matériau métallique inoxydable.

TABLEAU I : MATERIAUX DE REMPLISSAGE EN CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE.

TYPE DE SEPARATION	PREPARATIVES	ANALYTIQUES	ANALYTIQUES ET SEMI-PREPARATIVES
STRUCTURE	 50 MICRONS 300 - 500 m^2/g	 50 MICRONS 10 - 30 m^2/g	 5 MICRONS 350 m^2/g
NATURE DU SUPPORT	TRES POREUX	PELLICULAIRE (à COUCHE SUPERFICIELLE POREUSE)	TRES POREUX
CARACTERISTIQUES	- GRAND diamètre - EFFICACITÉ MOYENNE - GRANDE CAPACITÉ - Vitesse MOYENNE - GRANDE SURFACE SPECIFIQUE - GRANDE distance de diffusion	GRAND diamètre GRANDE EFFICACITÉ FAIBLE CAPACITÉ Vitesse MOYENNE Petite SURFACE SPECIFIQUE Petite distance de diffusion	Petit diamètre TRES GRANDE EFFICACITÉ CAPACITÉ MOYENNE GRANDE Vitesse SURFACE SPECIFIQUE MOYENNE TRES Petite distance de diffusion

Généralement sa longueur varie de 25 à 50 cm. Son diamètre interne est de 4 mm et son diamètre externe de 0,125 à 0,25

En fait les colonnes se différencient par leur phase stationnaire En effet par exemple la microbondapek C18V utilisée au cours de no notre travail est d'une phase stationnaire constituée de microparticules greffées (Bonded phases) commercialisée par Waters Associates.

La réaction générale d'obtention de ces supports est la suivante:

- SIOH + cl3 - Si - R ------ SIOSIR + Hcl
(Gel de silice) (Bondapak)

Selon la nature du radical R on a des phases stationnaires de polarités différentes

- SIOH + cl3 Si $(CH2)_{11}$ CH_3 ---- SIOSI $(CH2)_{11}$ CH3 +Hcl

Bondapak C18

- La microbondapak C18 est une phase très apolaire conçue pour les séparations analytiques ou semi-préparatives. Elle sera donc utilisée en "Mode inverse" c'est-à-dire avec une phase mobile polaire.

Les colonnes préremplies microbondapak C18 sont garanties avec un nombre minimum de 9000 plateaux au mètre.

Taille des particules 10
Dimensions de la colonne 4mm DI x30 cm
N' de Ref 27324

Les différents types de remplissage sont indiqués dans le tableau I c'est donc que les résultats en HPLC reposent sur la granulométrie du matériau de remplissage de la phase stationnaire.

5- Le détecteur : c'est un éléments en ce sens qu'il permet de suivre en continu la séparation et de mesurer la concentration des solutés.

Il y a quatre sortes de détecteurs.

1- les réfractomètres qui mesurent en continu la variation d'indice de réfraction entre deux feux de liquide.

En effet nous savons que tous les composés ont un indice de réfraction et donc une très faible variation de l'indice, entre le solvant et le composé dissout et détectée.

Celui qui est adapté à notre chromatographe est du type R401 Waters Associates.

2- Les détecteurs fluorimètriques

Ils nécessitent la préparation de dérivés fluorescents soit avant l'injection soit en sortie de colonne. Ils sont donc spécifiques, sensibles et particulièrement adaptés à l'analyse des tracés.

3- Les détecteurs électroniques utilisant les propriétés, oxydoréductrices des solutés et la capacité pour l'effluant d'être suffisamment conducteur pour permettre le passage du courant.

4- Les détecteurs à absorptiométrie dans l'UV et les visible à longueur d'onde fixe 254 ou 280 nm ou à longueur d'onde variable de 190 à 700 nm. Les spectromètres UV sont des détecteurs les plus utilisés et les plus usuellement couplés aux systèmes chromstographiques.

- Celui que nous avons utilisé est le modèle Pye Unicam PU 4020 UV.

Un seul point noir au tableau, c'est le fait que l'on travaille qu'a des longueurs d'ondes égal à 254 nm. En effet ceci constituant un inconvenient dans le cas des dérivés ayant des maximas UV au dessus de cette longueur d'onde. Ceci nous astreint donc à un domaine limité de produit.

5- L'enregistreur : Il est poacé à la sortie du détecteur et sert à représenté le profil des courbes d'élution transmis par le système de détection qui sont inprimé sur un chromatogramme qui donne dans notre cas puisque nous avons utilisé le détecteur à UV

- L'absorption de l'éluant sortant de la colonne en fonction du temps .

Ou dans le cas d'un détecteur réfractomètre :

- les différences d'indices de réfraction entre le soluté et la phase mobile en fonction du temps.

Nous avons utilisé un enregistreur "Servotrace" Sefram.

6- Le système de récupération :

Il est constitué d'une simple vanne à trois voies poacées à la sortie du détecteur.

Il permet :

- soit d'évacuer ou de recycler la phase mobile
- soit de collecter manuellement (ou automatiquement) des fractions d'éluant de l'échantillon pour des analyses ultérieures sur l'enregistreur.

Il est à noter que l'on peut adapter un système de programmation de solvants ou de débits à l'appareil suivant que l'on veuille effectuer

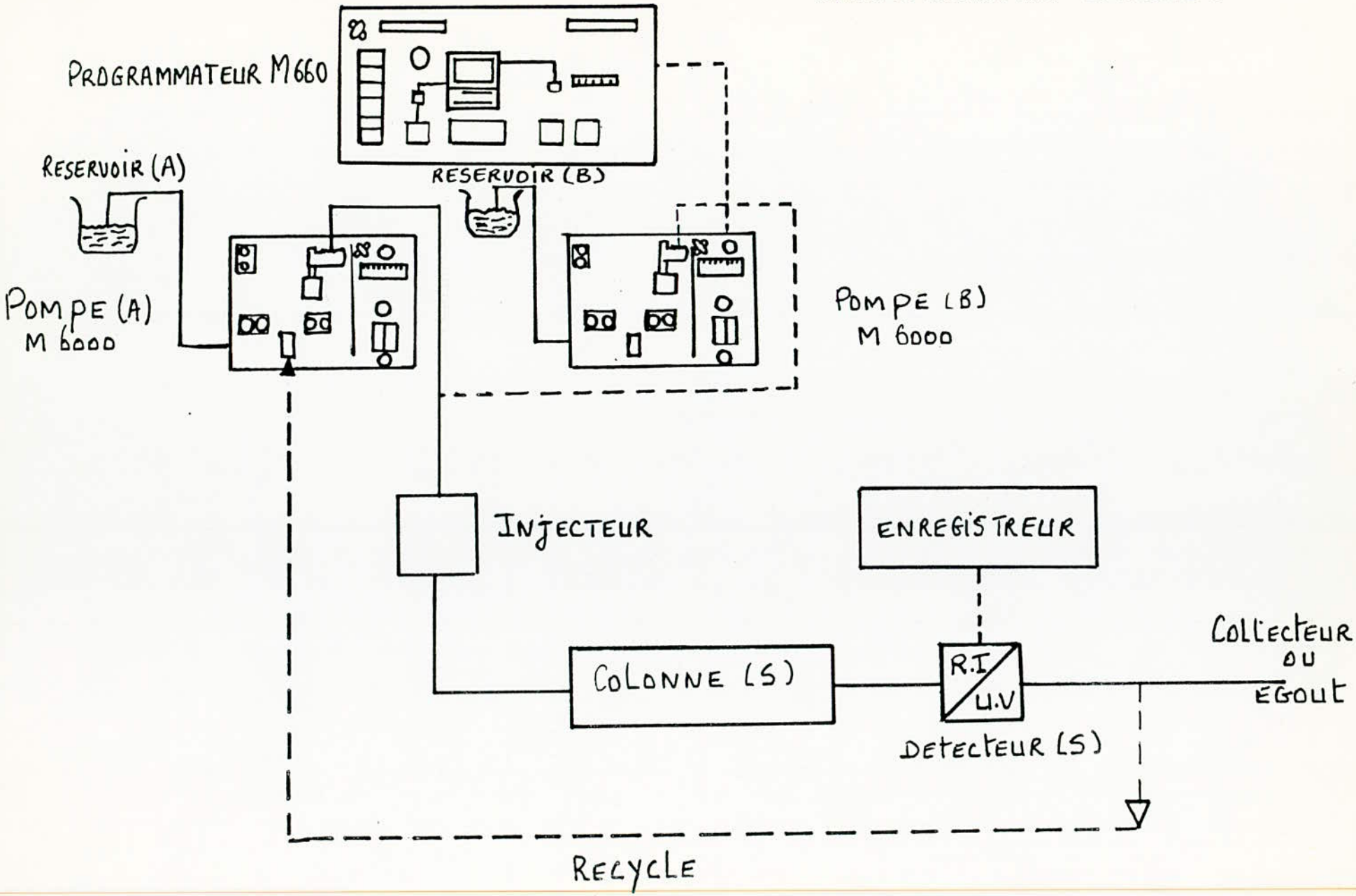
- soit un gradient d'élution c'est-à-dire une variation de composition de la phase mobile en fonction du temps.C'est ce que nous avons utilisé au cours de ce travail.

- soit un gradient de débit c'est-à-dire la variation de débit de la phase mobile en fonction du temps.

7- Une seringue de 10 ul Hewlett Packard.

Le T4 représente un système complet de chromatographie en phase liquide.

TABLEAU 14 : DIAGRAMME SCHETIQUE MA d'UN SYSTEME COMPLET DE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE.



IV.6 - Application de la HPLC à l'analyse d'une huile de germe de maïs:

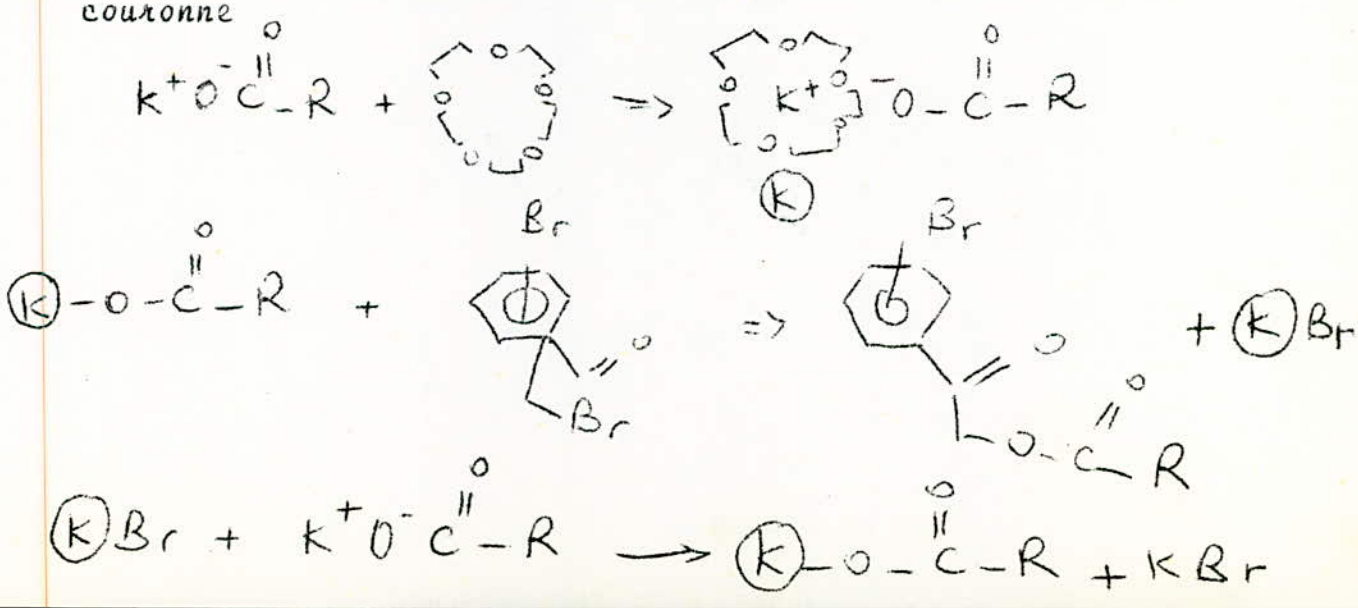
L'analyse d'une huile de germe de maïs par HPLC nécessite des opérations particulières afin d'obtenir des meilleurs résultats possibles. En effet, quoiqu'un travail ait été fait au sujet de l'analyse directe (16) des triglycérides il n'en reste pas moins qu'en l'absence de ces produits étalons très difficilement synthétisables il est nécessaires de recourir à d'autres méthodes. Celle qui s'est offerte à nous vu que nous possédions le produit requis a été la méthode de dérivation des acides gras en esters du para-bromophénacyl qui sont eux beaucoups plus détectables en raison de leur forte absorption dans l'ultra-violet.

On pourrait en utilisant le detecteur à indice de refraction séparer les acides gras de cette huile directement mais il faudrait pour cela posséder la colonne Fatty acid Analysis qui est très compétente quand à leur séparation mais tous les travaux à ce sujet ont été fait avec un détecteur à indice de réfraction ( ) et non avec un détecteur à absorption dans l'UV, de longueur d'onde

= 254 nm comme c'est le cas de notre travail

De plus si nous nous rapprochons du problèmes de la dérivation nous verrons que la réaction tel qu 'elle a été décrite (17) se présente ainsi :

Notons que le para-bromophénacyl est dilué dans une solution ether couronne



CHAPITRE V

La chromatographie en phase gazeuse

INTRODUCTION

C'est donc en 1906 par TSWETT qu'est apparue la chromatographie qui se base sur les vitesses de migration des solutés le long de la colonne.

Plus tard d'autres savants cherchèrent à améliorer cette technique comme MARTIN et SYNGE en 1941, mais ce n'est qu'onze ans plus tard que JAMES et MARTIN décrivent la première méthode de chromatographie en phase gazeuse qui traite la séparation d'un mélange d'acides gras.

Depuis l'immense souplesse de ce procédé ainsi que les informations ainsi tirées lui ont valu un développement estraordinaire. Evidemment la chromatographie ne peut remplacer toutes les méthodes mais elle contribue pour une large part à la résolution des problèmes analytiques touchant tous les domaines de la chimie organique, de la biochimie et de la pharmacie.

V.1. Principe de la chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La CPG est basée sur la distribution d'un soluté entre deux phases qui sont :

- une phase stationnaire, et une phase mobile : gaz vecteur inerte tel que N_2, Ar, He, CO2

Cette distribution se faisant en une suite d'équilibres de dissolution ou d'adsorption constamment déplacée entre la fraction de soluté retenue par la phase fixe et celle qui subsiste dans la phase mobile.

La phase mobile fixe ou stationnaire peut être un adsorbant ou un support théoriquement inactif recouvert d'un film de liquide à tension de vapeur négligeable à la température d'utilisation de la colonne. C'est ce qui donne lieu à deux sortes de chromatographie: d'adsorption et de partage.

C'est ainsi que le soluté va parcourir la longueur de la colonne en un temps qui sera lié à son coefficient de partage entre les deux phases (paragIV.2).

Pour des conditions opératoires identiques, deux solutés différents auront des temps d'élutions différentes.

La CPG est en général une chromatographie gaz-liquide ou la phase stationnaire est un liquide peu volatil réparti à la surface d'un support inerte de grande surface.

V.2. Appareillage

Un appareil de chromatographie en phase gazeuse comprend les éléments suivants (voir schéma 1)

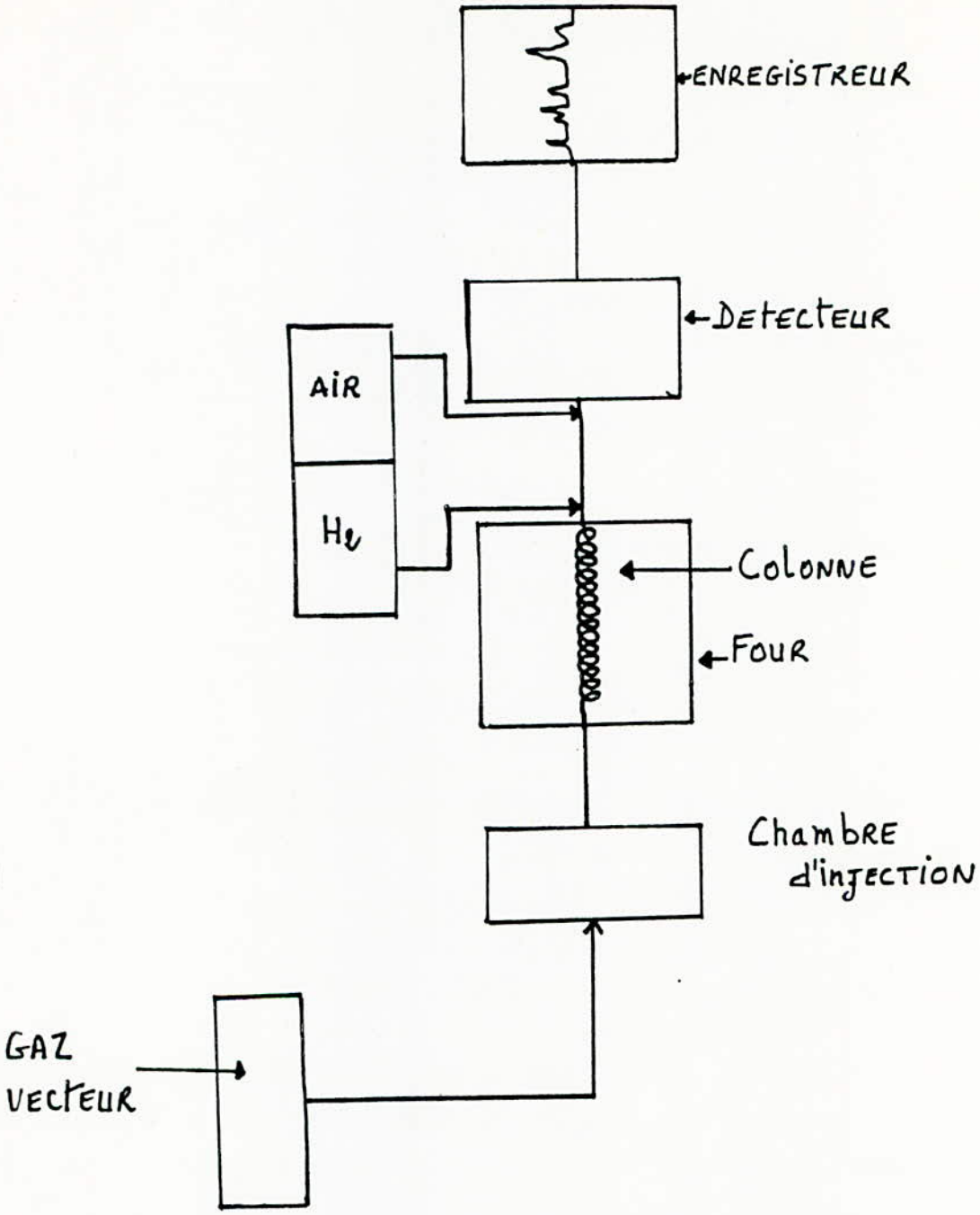
- une bouteille de gaz vecteur N_2, He, Ar, CO_2
- une chambre d'injection dans laquelle sont vaporisés les échantillons à analyser
- une colonne dans laquelle vont migrer les solutés grace au gaz vecteur et qui est placée dans un four
- un détecteur
- un enregistreur

Nous avons utilisé au cours de notre travail un détecteur FID ce qui entraine qu'en plus de la bouteille de gaz vecteur sont couplées au chomatographe pour produire une flamme ,deux bouteilles d'air et d'hydrogène.

Examinons chacun de ces éléments séparement

-1- Le gaz vecteur :

Les gaz qui sont utilisés comme vecteur sont l'azote, l'Helium, l'argon, l'hydrogène et même quelque fois le gaz carbonique CO_2. Ils doivent être parfaitement purs pour avoir des résultats reproductibles. Mais leur choix depend essentiellement du type de detecteur utilisé. Le débit joue également un grand rôle lors d'une analyse.



Schema 1 : Eléments d'un chromatographe en phase gazeuse

-2- La chambre d'injection :

L'échantillon à analyser est introduit dans la chambre d'injection à l'aide d'une micro-seringue.

Cette dernière étant portée à une température élevée l'échantillon est rapidement vaporisé. La température de la chambre d'injection est toujours supérieure à celle de la colonne pour éviter une condensation des solutés au niveau de l'injecteur.

-3- La colonne:

C'est dans la colonne que le processus de séparation chromatographique apparaît et c'est donc elle qui caractérise une bonne analyse d'une mauvaise. Ses dimensions, la phase stationnaire qui la remplit, sa nature sont autant de facteurs déterminants.

La colonne utilisée au cours de ce travail est une colonne de 1m83 1/8 inch remplie de SILAR SCP 10%.

-4- Le détecteur :

C'est un élément très important du chromatographe car il nous renseigne sur la composition du soluté élué. Le détecteur que nous avons util. utilisé est le détecteur à ionisation de flamme (FID) dont le principe de base sur le fait qu'une flamme d'hydrogène brûlant dans l'air produit des ions. La présence dans cette flamme d'un produit organique s'ionisant facilement augmente considérablement le nombre d'ions qui vont être collectés par une électrode portée à un potentiel de 100 à 300 volts; Le courant d'ionisation est amplifié et ensuite enregistré en continu.

Ce système est stable lorsque les débits des différents gaz sont maintenus très constants.

Ce detecteur est très utilisé car son emploi est simple et sa sensibilité vis à vis des composés organiques est supérieure de plus

de 100 fois en moyenne à celle des catharomètres.

Les éléments composant un chromatographe sont représentés au schéma I tandis que le schéma electrique du détecteur FID est représenté au schéma II.

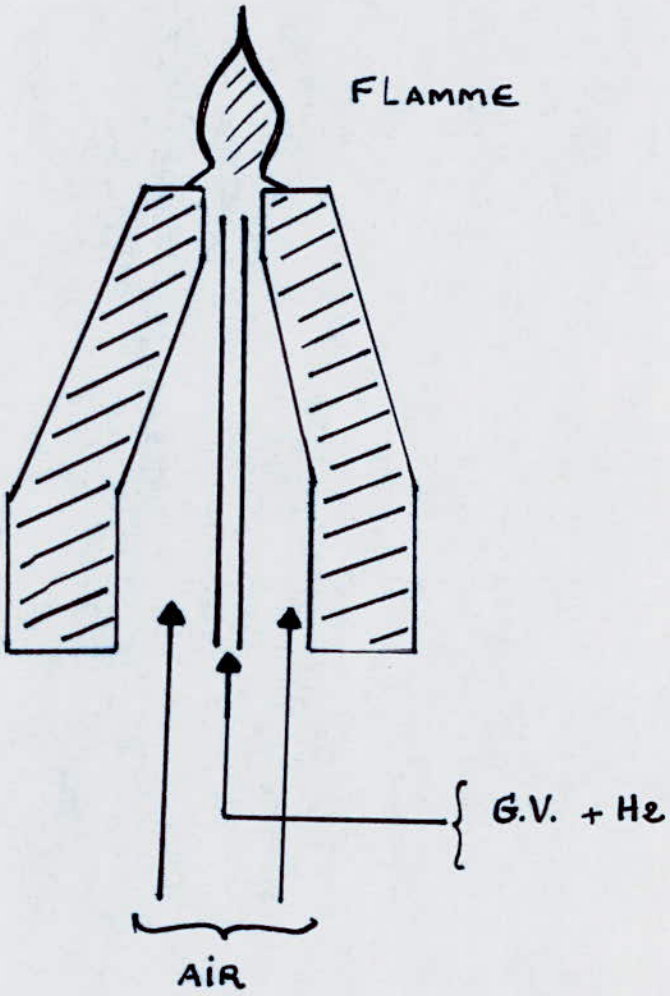
L'appareillage utilisé au cours de ce travail est l'intersmat IGC-120 DFL.

Toute la théorie se rapportant à la CPG est la même que pour la HPLC décrit au chapitre précédent.

<u>Application de la chromatographie en phase gazeuse à l'analyse de l'huile de maïs :</u>
Les huiles sont des triesters d'acides gras et du glycérol.La détermination des divers acides gras, leur teneur et les proportions en présence permettent de deceler l'origine et la pureté de l'échantillon par exemple pour une huile de maïs.

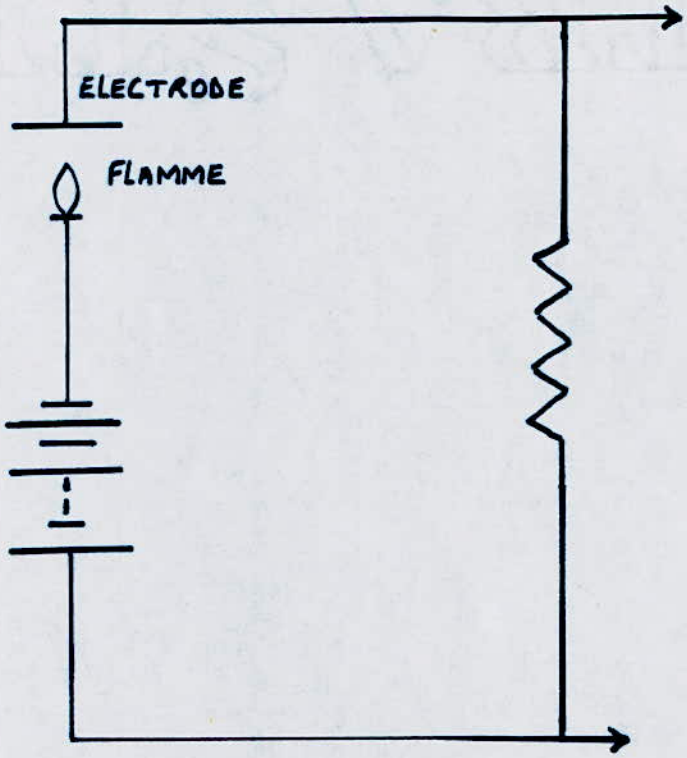
Mais le poids moléculaire elevé et la très faible tension de vapeur de la plupart des composés organiques à longue chaine imposent dans l'étude des chaines grasses par CPG ,des conditions opératoires particulières caractérisées par l'utilisation de température elevées ap après avoir accru la volatilité des corps étudiés par des transformations chimiques appropriées telles l'estérification par la potasse alcoolique qui modifiera les acides gras en esters méthiliques beaucoups plus volatils et moins polaires donc plus stables.

De plus l'utilisation d'une phase polaire donnera vis à vis des chaines grasses un pouvoir solvant sepectif.Elle se prêterons donc particulièrement bien à la séparation de corps ayant le même nombre d'atomes de carbone et se différenciant par leur degré d'insaturation



SHÉMA II : Schéma d'un bruleur FID

ET ARRIVÉE DES GAZ.



<u>SCHEMA II</u> : SCHEMA ELECTRIQUE d'UN detecteur FID

CHAPITRE VI : ETUDE EXPERIMENTALE

But et principe

C'est de mettre en oeuvre toutes les opérations nécessaires à l'analyse d'huile de germe de maïs.

Nous etudierons tout d'abord tous les modes opératoires nécessaires à déterminer les caractéristiques physico-chimiques des huiles ainsi que tous les modes de préparation des échantillons à chromatographier et enfin nous établierons toutes les conditions optimales pour une bonne séparation des produits composants ces huiles .

I. Détermination des caractéristiques physico-chimiques :

A- Propriétés physiques :

Les propriétés physiques qui caractérisent une huile sont les suivantes :

1- La densité
2- L'indice de réfraction
3- le pouvoir rotatoire
4- La viscosité

1- La densité:

Nous avons au cours de ce travail déterminé la densité à l'aide d'un picnomètre à la température 20°C dont les résultats sont donnés dans le tableau T1 .

DENSITE	VALEURS EXPERIMENTALE	VALEURS THEORIQUES
Huile de maïs Algérienne	0,922	0,919 - 0,923
Huile Dietex	0,919	0,919 - 0,923

TABLEAU T1

Nous remarquerons que les valeurs déterminées expérimentalement se rapprochent des valeurs données par la théorie .

2- L'indice de réfraction :

Nous avons déterminé les valeurs de l'indice de réfraction à la température de 20°C. Les résultats sont donnés dans le tableau II

n_d^{20}	VALEURS EXPERIMENTALES	VALEURS THEORIQUE
Huile Ditex	1,47063	1,472 - 1,476
Huile de maïs Algerienne	1,47029	1,472 - 1,476

TABLEAU II

Nous noterons que les valeurs expérimentales correspondent bien aux valeurs normalisées.

3- Le pouvoir rotatoire n'a pas était déterminé.

4- La viscosité:

La viscosité a été déterminée à l'aide d'un viscosimètre de constante C=5 .Les valeurs trouvées sont identiques pour l'huile de germe de maïs algérienne et pour l'huile Dietex

	Viscosité (a)
Huile de maïs algérienne	57,5
Huile Dietex	57,5

B/ Propriétés chimiques :

Les propriétés chimiques d'une huile se caractérisent par la determination des critères suivants

-1- L'indice d'acide (Ia)

-2- L'indice de saponification (Is)

-3- L'indice d'iode (Ii)
-4- L'indice de péroxyde (Ip)
-5- Le taux en insaponifiables (

-1- L'indice d'acide :

Il indique le nombre qui exprime en mg la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres présents dans un g de substance.

Le mode opératoire est le suivant :

Dissoudre 10 g d'huile dans 100ml d'un mélange de volumes égaux d'alcool éthylique et d'ether que l'on aura neutralisé au préalable par l'hydroxyde de potassium (01N) jusqu'au virage au rose persistant pendant 15 secondes au moins.

soit n le nombre de ml employés, l'indice d'acide Ia est determiné par :

$$Ia = \frac{n \times 5,61}{10}$$

-2- L'indice de saponification :

Cet indice Is est le nombre qui exprime en mg la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides gras libres et à la saponification des esters présents dans 1g de substance.

Mode opératoire:

Dans une fiole de 200 ml en verre rodée munie d'un réfrigérant à reflux, on introduit une prise d'essai de 2g auquel on ajoute 25ml d'hydroxyde de potassium alcoolique 0,5N et quelques billes de verre. On chauffe à ébullition à reflux pendant 30mn au bain marie. Ensuite on ajoute 20 gouttes de phénolphtaline (R) et en titre immédiatement par l'acide chlorhydrique (0,5N).

$$Is = \frac{(n_2 - n_1) \times 28,05}{2}$$

-3- L'indice d'iode :

L'indice d'iode Ii est le nombre qui exprime en grammes la quantité

d'halogène calculée en iode susceptible d'être fixée par la matière grasse.

Mode opératoire :

Dans un récipient de 300ml muni d'un bouchon rodé on introduit 0,10g que l'on dissout dans 15 ml de chloroforme. Puis on fait couler lentement d'une burette 25,0 ml de solution de bromure d'iode.

On bouche le récipient et on le place à l'obscurité pendant 30 mn en agitant fréquemment. Après addition de 10 ml d'une solution d'iodure de potassium 10% et de 100 ml d'eau, on titre l'iode libéré par le thiosulfate de sodium 0,1N en agitant énergiquement jusqu'à ce que la coloration jaune ait presque disparu. On ajoute amors 1ml de solution d'amidon et on continue le titrage en agitant énérgiquement et en ajoutant goutte à goutte le thiosulfate de sodium 0,1N jusqu'à disparition de la coloration bleue soit n_1 la quantité de thiosulfate de sodium.

On effectuera un essai témoin dans les mêmes conditions (soit n_2 ml de thiosulfate de sodium 0,1N

$$Ii = \frac{(n_2 - n_1) \times 1,27}{0,10}$$

-3- L'indice de péroxyde:

L'indice de péroxyde I_p est le nombre qui exprime en milliéquivalents d'oxygène actif la qualité de péroxyde contenue dans 1000g de substance.

Mode opératoire

On dissout 10 g dans un flaçon bouché à l'émeri, on ajoute 25ml d'un mélange de 3 volumes d'acide acétique et de 2 volumes de chloroforme, puis 0,5 ml de solution saturée d'iodure de potassium. On agite pendant 60 s, exactement puis on laisse reposer 5 mn à l'obscurité et on ajoute 50 ml d'eau distillée et 0,5 ml d'emplois d'amidon.

On titre alors par le thiosulfate 0,01N soit Nml la quantité de volume determiné. On effectue un essai temoin soit N_2ml de thiosulfate de sodium 0,01N

$$I_p = \frac{(n_1 - n_2) \times 10}{10}$$

- L'indice de péroxyde devra être d'après les normes (18) inférieur à 12.

- Le tableau T_3 des valeurs expérimentales trouvées nous indique que les normes sont bien respectées pour les deux huiles.

Huile de maïs algérienne	0,8
Huile Vietex	0,69

T_3

II- Analyse chromatographique

A/ En phase gazeuse

Comme nous l'avons énoncé auparavant, les acides gras possédant des chaines trop longues, nous les transformons en esters méthyliques beaucoup plus volatils et moins polaires donc plus stable en effectuant une saponification de la matière grasse. Nous appliquons la méthode de l'étalon interne qui consiste à introduire une quantité connue dans la solution de manière à pouvoir faire une analyse quantitative

Le mode opératoire est le suivant :
Nous disolvons 0,2 ml d'huile dans 3ml d'hexane auquel on ajoute 0,1 ml de KOH méthalolique (1N) et 4 ul de l'étalon interne l'ester $C_{13}H26\ O_2$. On agite pendant 20 s et on injecte la phase supérieure organique c'est-à-dire les esters dissous dans l'hexane.

Pour ce travail nous avons opéré sur un appareil Hewlett Packard muni d'une colonne capillaire à quartz mais la colonne ne présentait pas de propriétés selectives quand à la séparation des produits se différenciant par leur degré d'insaturation, nous avons donc abandonné cet appareil au profit d'un intersmat IGC 120 DFL muni d'une colonne remplie de 1m83 de long et de diamètre de 1/8 inch remplie de Silar 5 Cp 10% sur chromosorbe .
Les conditions opératoires sont les suivantes
- Quantité injectée = 1 ul
- détecteur : FID température = 250°C Débits (Air = 400ml/mn
  (H_2= 30 ml/mn
- injecteur : température = 230°C

Four : température programmée de 130° --- 200°C à raison de 1°/mn
Gaz vecteur : N_2 Débit = 30 mℓ/mn
Vp = 2,5 mm/mn

Atténuation = 32

Nous avons donc injecter trois solutions
- la solution étalon comprenant des esters méthyliques suivants :

$C_{13}H_{26}O_2$

$C_{17}H_{34}O_2$

$C_{18}H_{36}O_2$

$C_{19}H_{38}O_2$

$C_{20}H_{38}O_2$

$C_{19}H_{36}O_2$

$C_{21}H_{42}O_2$

$C_{19}H_{34}O_2$

$C_{23}H_{46}O_2$

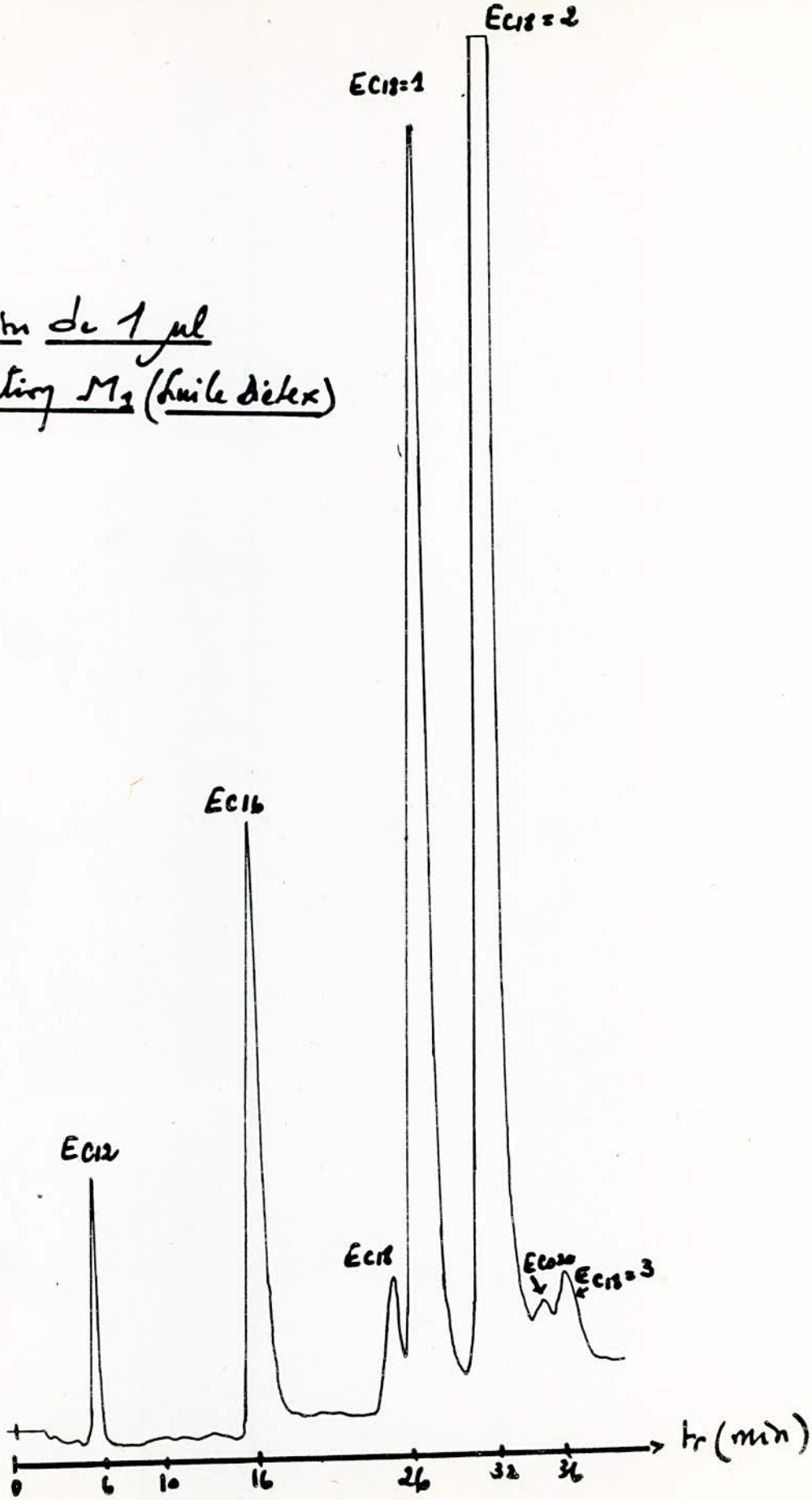
$C_{23}H_{44}O_2$

- La solution des esters méthyliques de l'huile de maïs algérienne
- la solution des esters méthyliques de l'huile Dictex.

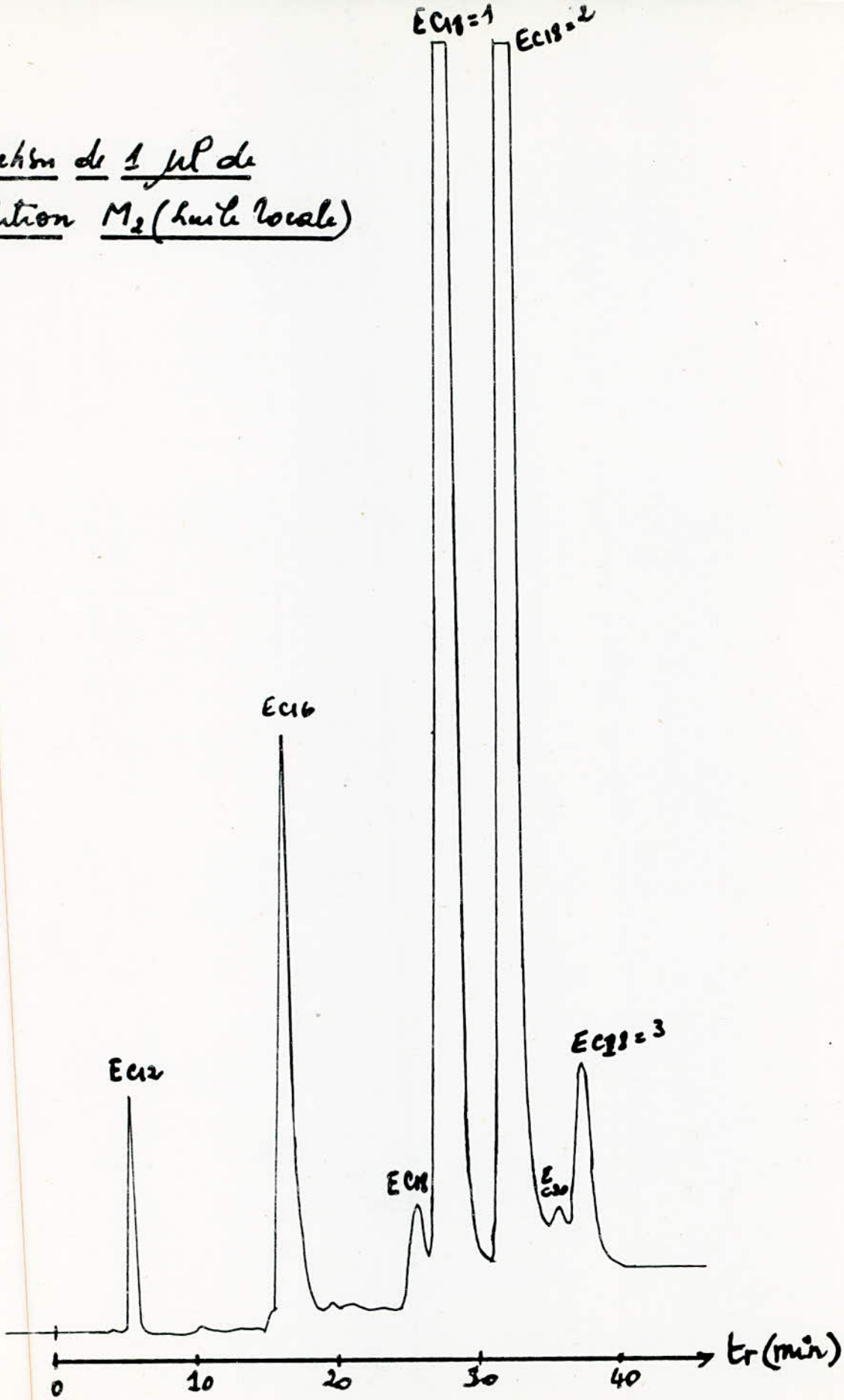
Les chromatogrammes obtenus sont donnés page 57 . 58 - 59 -
Les surfaces des pics ainsi que les temps de rétentions ont été donnés par un intégrateur sharp relié à l'appareillage/

D'après la méthode de l'étalon interne, nous avons pu évaluer la valeur de l'absorbance pour une quantité précise injectée nous étant assuré tout d'abord que le produit étalon injecté n'était pas contenu dans l'huile.
Les résultats sont donnés dans les tableaux. Suivants -

Injection de 1 µl
de solution M_1 (huile diéter)



Injection de 1 µl de solution M_2 (huile locale)



Chromatogramme n° 1

Injection de 1 µl
de solution d'esters
de C_{12} • C_{16} • C_{17} •
C_{18} • $C_{18:1}$ • $C_{18:2}$ •
C_{20} • $C_{18:3}$ • C_{22} • $C_{22:1}$

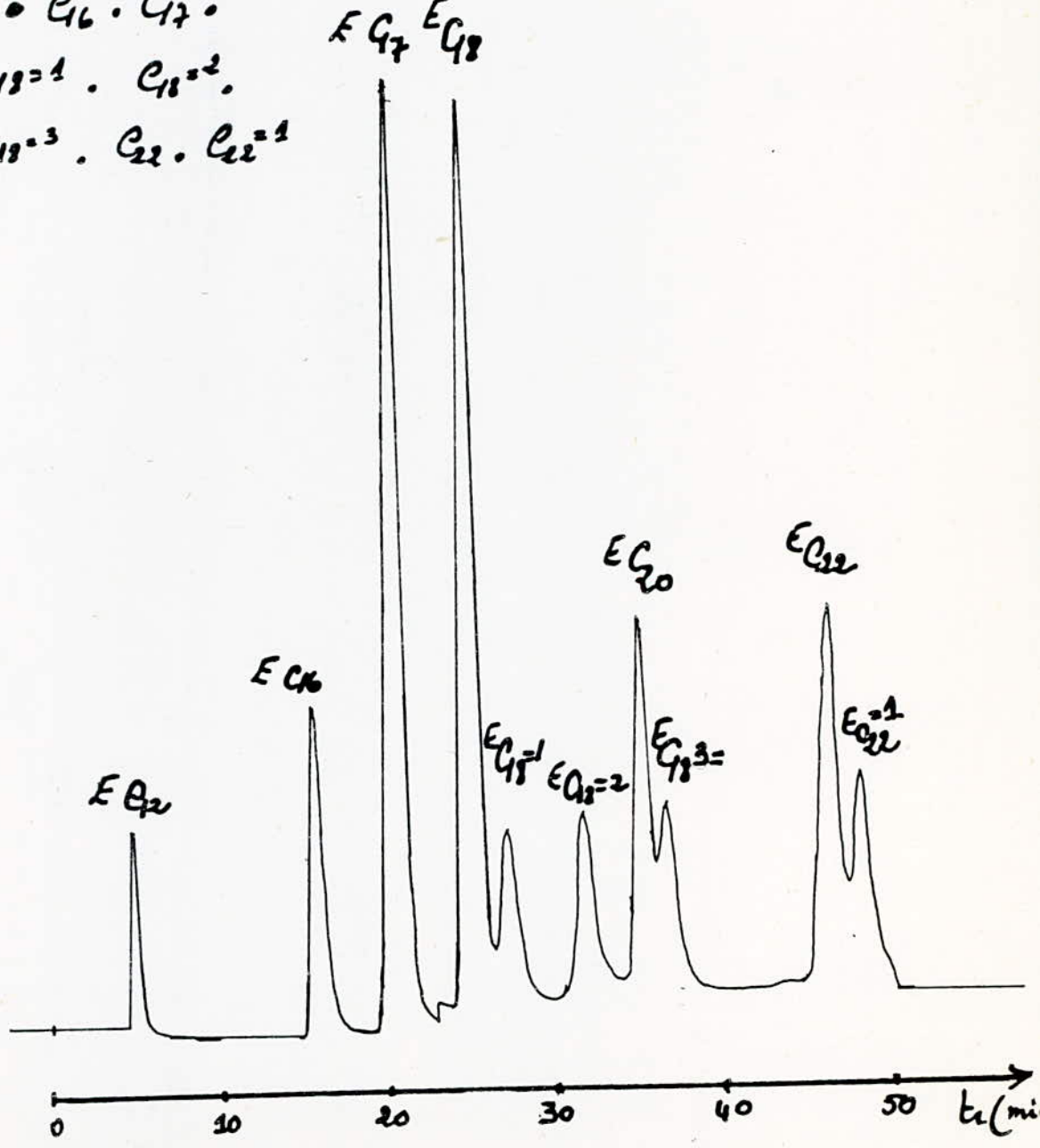


Tableau des résultats de l'analyse chromatographique en phase gazeuse. pour la solution d'étalons d'Esters méthyliques des acides gras.

NOm de l'acide	t_r (min)
C_{12} (laurique)	5
C_{16} (palmétique)	16
C_{18} (stéarique)	25
$C_{18}:1$ (Oleique)	27
$C_{18}:2$ (linoleique)	31,5
$C_{18}:3$ (linolénique)	37
C_{20} (Arachidique)	35
C_{22} (érucique)	46
$C_{22}:1$	48

Pour la solution (huile Dietex)

M_1

Nom de l'acide	t_r (min)	% S exp	% S calculé
C_{12} (laurique)	5,19	309860	2
C_{16} (Palmitique)	15,66	1607100	1,037
C_{18} (stéarique)	24,62	355280	2,29
$C_{18}:1$ (leique)	26,79	4339200	28
$C_{18}:2$ (C noleique)	31,30	5298100	34,19
$C_{18}:3$ (linolénique)	35,35	49047	0,00031
C_{20} (arachidique)	34,39	216370	1,39
?	35,81	274360	1,77

Pour la solution M_2 huile locale

Nom de l'acide	t_r (mn)	% S exp	% S Calculé
C_{12}(laurique)	8,11	298050	2
C_{16}(patril	16,08	1560600	10,47
C_{18}	25,28	208030	1,39
$C_{18}:1$	27,75	6121000	41,07
$C_{18}:2$	32,23	8353800	56,05
$C_{18}:3$	36,96	222490	1,49
C_{20}	35,29	20538	0,137
?	41,16	19487	0,130

[illegible] :

/)/ ous avons pu donc identifier tous les acides gras composant les huiles de germe de maïs dans des proportions aprés se rapprochement beaucoup des valeurs theoriques.

Exemple de Calcul

Le calcul de l'aire se fait en pourcentage à la base de l'étalon interne que l'on introduit dans la solution en quantité connue.

En effet nous injectons 4 ul de l'ester C_{16} dans 0,2 ml d'huile.

298050 Conrrespond à 4 ul .

1560600 Correspond à ?

Il y aura donc $\frac{1560600 \times 4}{298050}$ = 20,94 u- de l'ester C_{16} dans 0,2 ml d'huile

On a donc 20,94 ul Correspond à 0,2 ml d'huile

? Correspond 100 ml

Il y a donc $\frac{20,94 \times 100}{0,2}$ = 10470 ul de C_{16} dans 100 ml d'huile

ou encore 10,47 ml de l'ester C_{16} dans 100 ml d'huile.

B/ En phase liquide

De par, la difficulté d'absorption des acides gras dans l'utra-violet nous étions contraints de les dériver par le para-bromophénocyl .

Plusieurs étapes constituent cette opération

- la première consiste à saponifier les huiles afin d'obtenir les sels acides gras par la méthode suivante :

On dissout 3g d'huile et 0,2g d'EI C_{12}(acide lorique) dans 40ml de solution d'hydroxyde de potassium KOH 5% dans H_{2O}/ méthanol 1/1 V/V. Puis on porte à ébullition sous reflux pendant 2h. Ensuite on décante les 2 phases obtenues et on recupère les sels acides formant le savon. On évaporera le méthanol sous courant d'azote.

- la seconde consiste en la dérivation proprement dite par le para-bromophénacyl suivant le mode opératoire suivant :

On pèse 1mg des sels d'acides dans un réacti-vial

et on dissout dans 0,1 ml de para-bromophénacyl et 0,3 ml d'acétonitrile.On chauffe pendant 2h à la température de 80°C et la solution est prête injectée.

En ce qui conerne les étalons standards nous avons opéré de la manière suivante :

Mode opératoire : Prenons 1mg d'acide dans 0,5ml de KOH méthanolique 0,1N. Après avoir évaporer le méthanol sous courant d'azote nous dissolvons la solution dans 0,1ml de para-bromophenacyl et 0,3ml d'acétonitrile. On chauffe pendant 2h à la température de 80°C et la solution est prête à être injectée. Nous noterons que nous avons injecté chaque étalon, séparément.

Les conditions opératoires sont les suivantes :

- Appareillage = Waters Associates R440
- Colonne : Bondapack C_{18}
- Détecteur : type Unicam PU 4020 UV, à longueur d'onde = 254nm

- *Programmation d'un gradient d'élution 40 à 100%*

Phase mobile A : solution acétonitrile/eau 40-60 %
B : Acétonitrile pur

- *Durée de la programmation 50 mn*
- *Vp = 2,5 mm/mn*
- *AH = 0,08*
- *Quantité injectée = 10 mℓ*
- *Débit = 1mℓ/mn*
- *P = 3000 Psi*

Les chromatogrammes obtenus sont donnés en pages 65 - 72 -

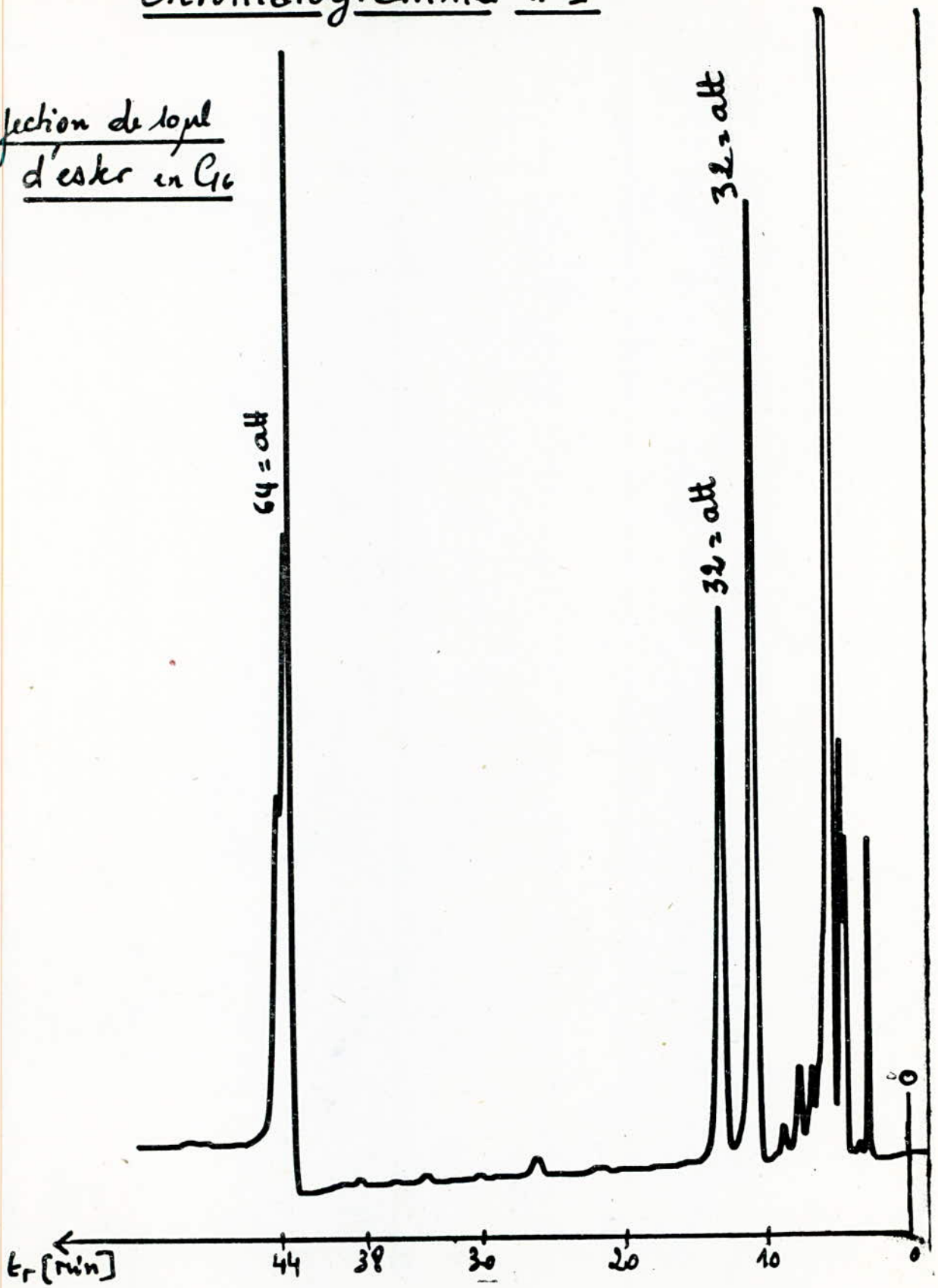
Les résultats obtenus sont les suivant :

Huile locale t_r (min)		Huile Dietex t_r (min)
Pic 1	2,4	1
2	4,4	2,4
3	6	4,9
4	9,2	4,4
	25,2	4,8
	30,8	6,4
	34,8	11,6
	39,2	25
	39,2	
	45	35
	47	40
	49	45,5

Malheureusement nous n'avons pas pu exploiter les résultats.

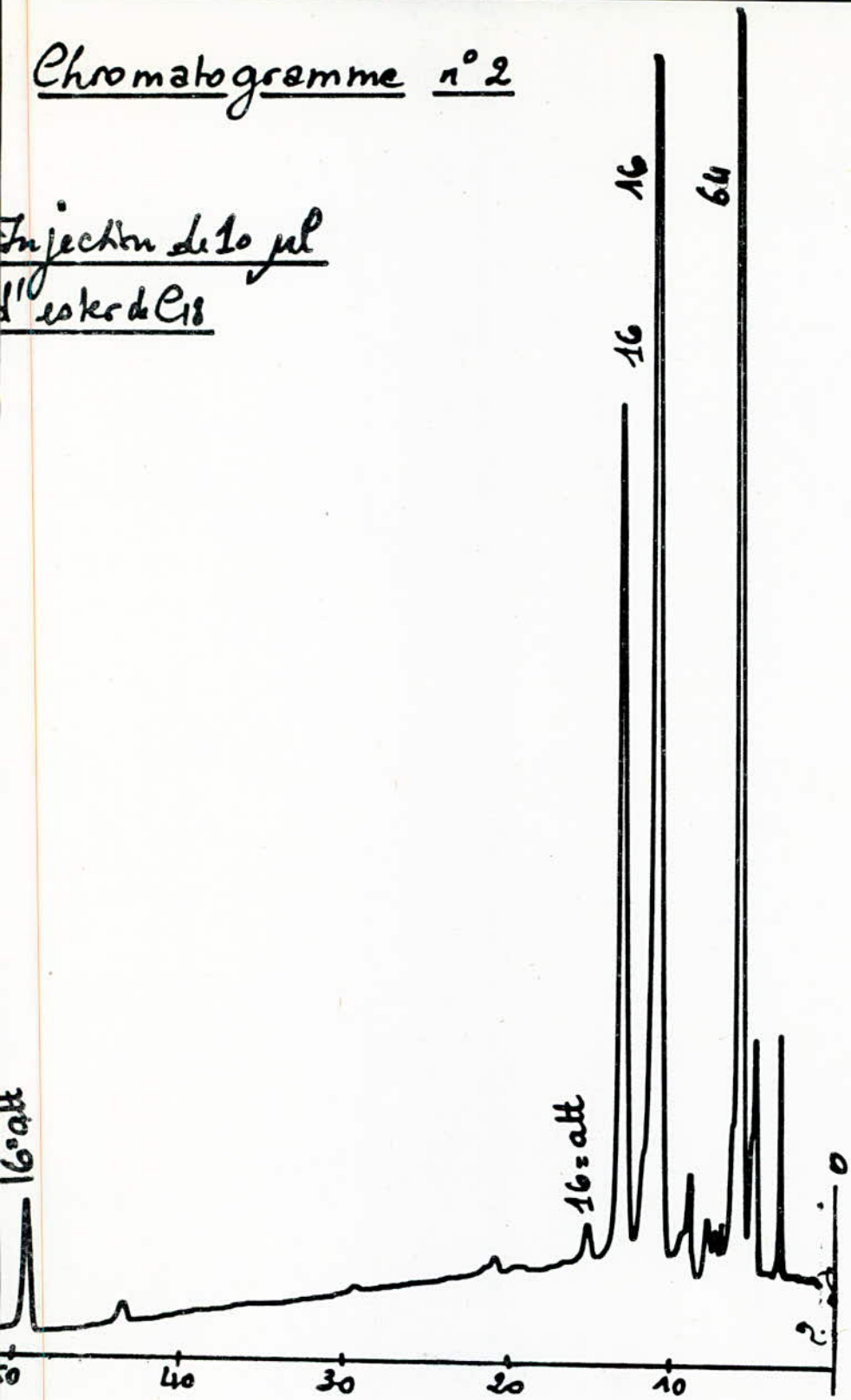
Chromatogramme n°1

Injection de 1µl d'ester en C_6



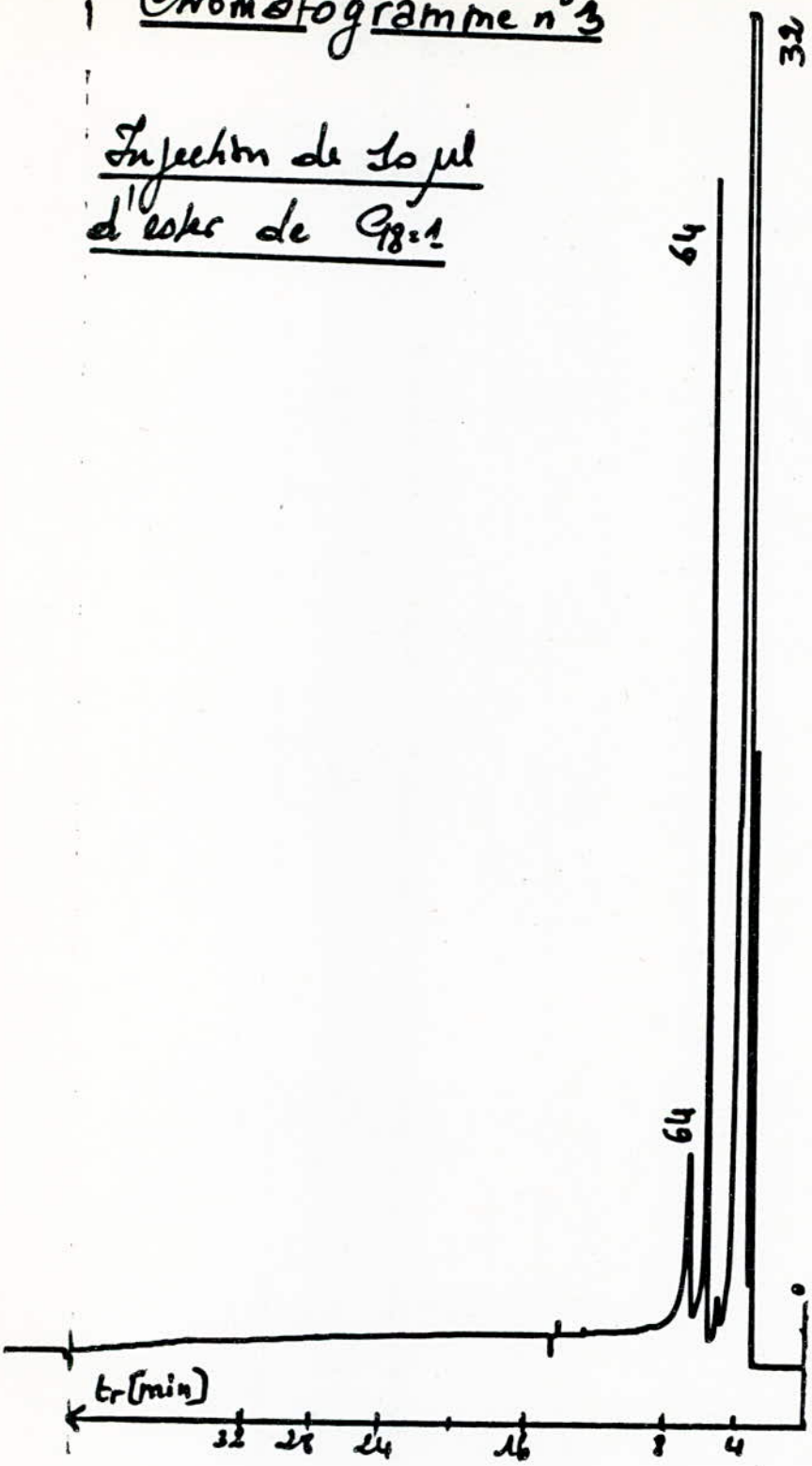
Chromatogramme n° 2

Injection de 10 µl
d'extrait de C18



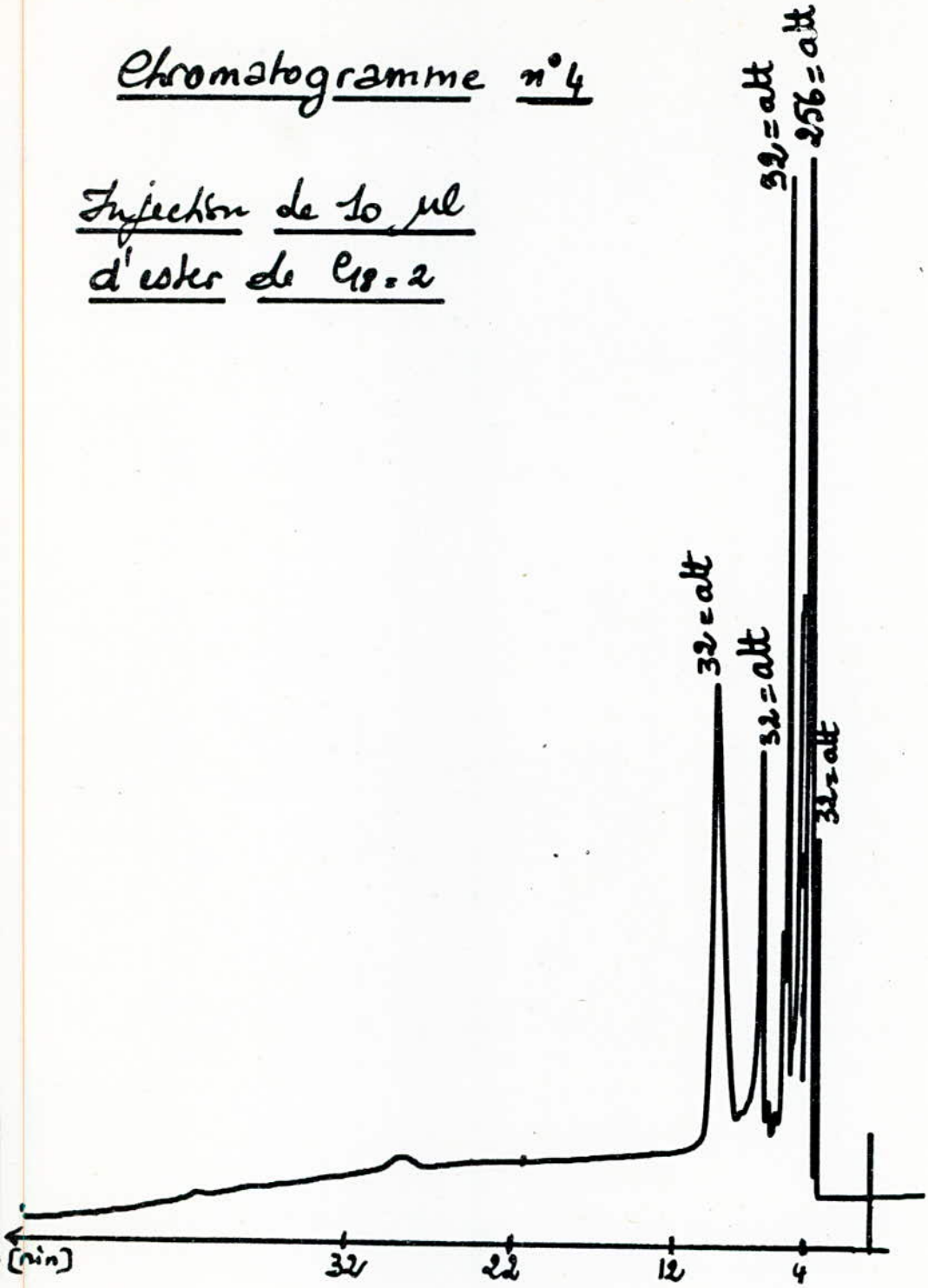
Chromatogramme n°3

Injection de 10 µl d'ester de $C_{18:1}$



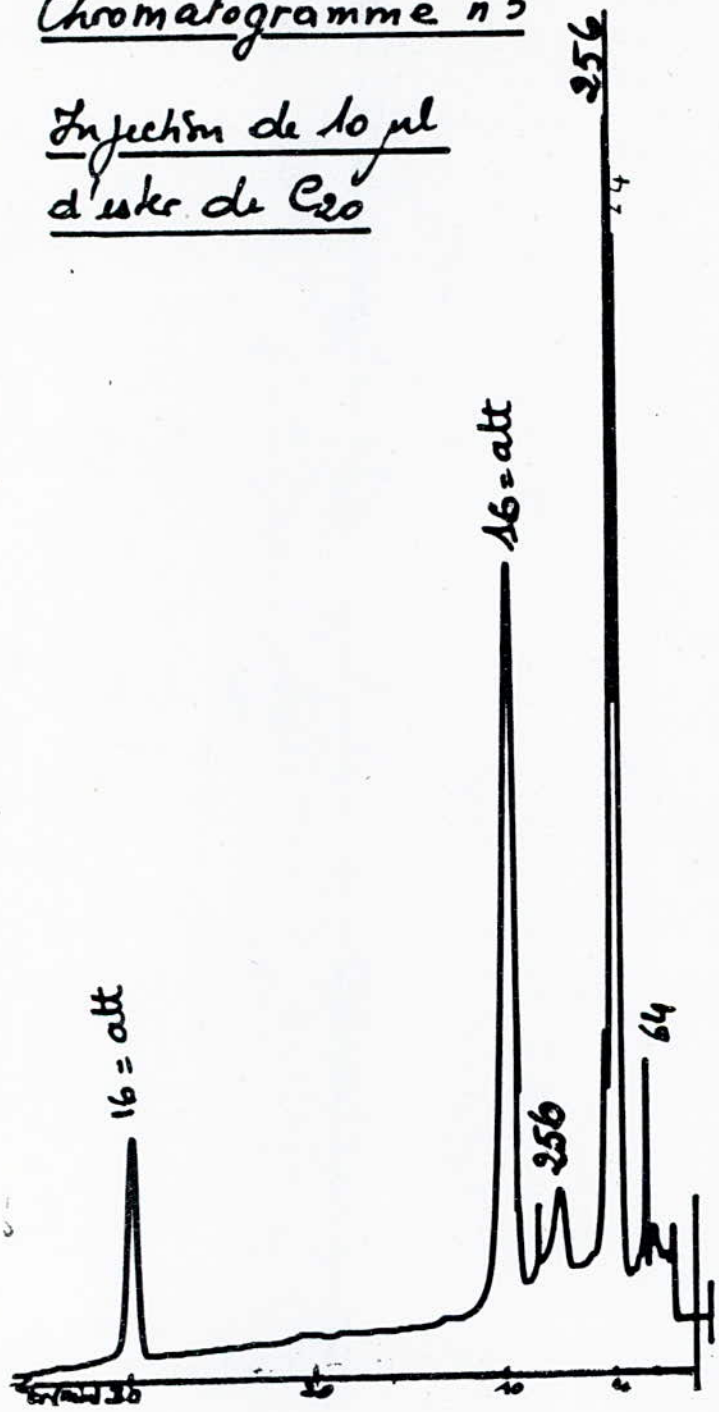
Chromatogramme n°4

Injection de 10 µl d'ester de $C_{18:2}$



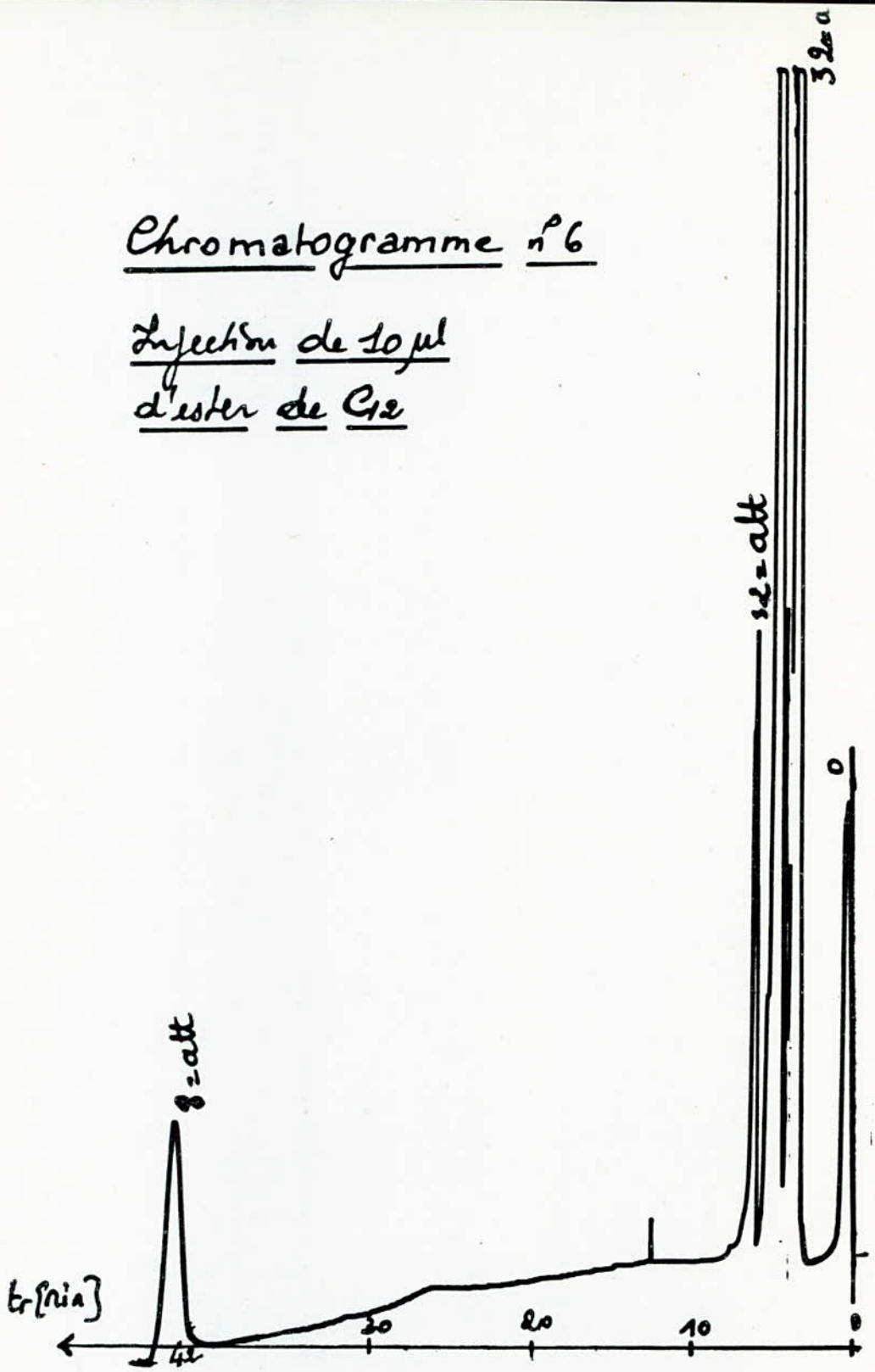
Chromatogramme n°5

Injection de 10 µl d'ester de C_{20}

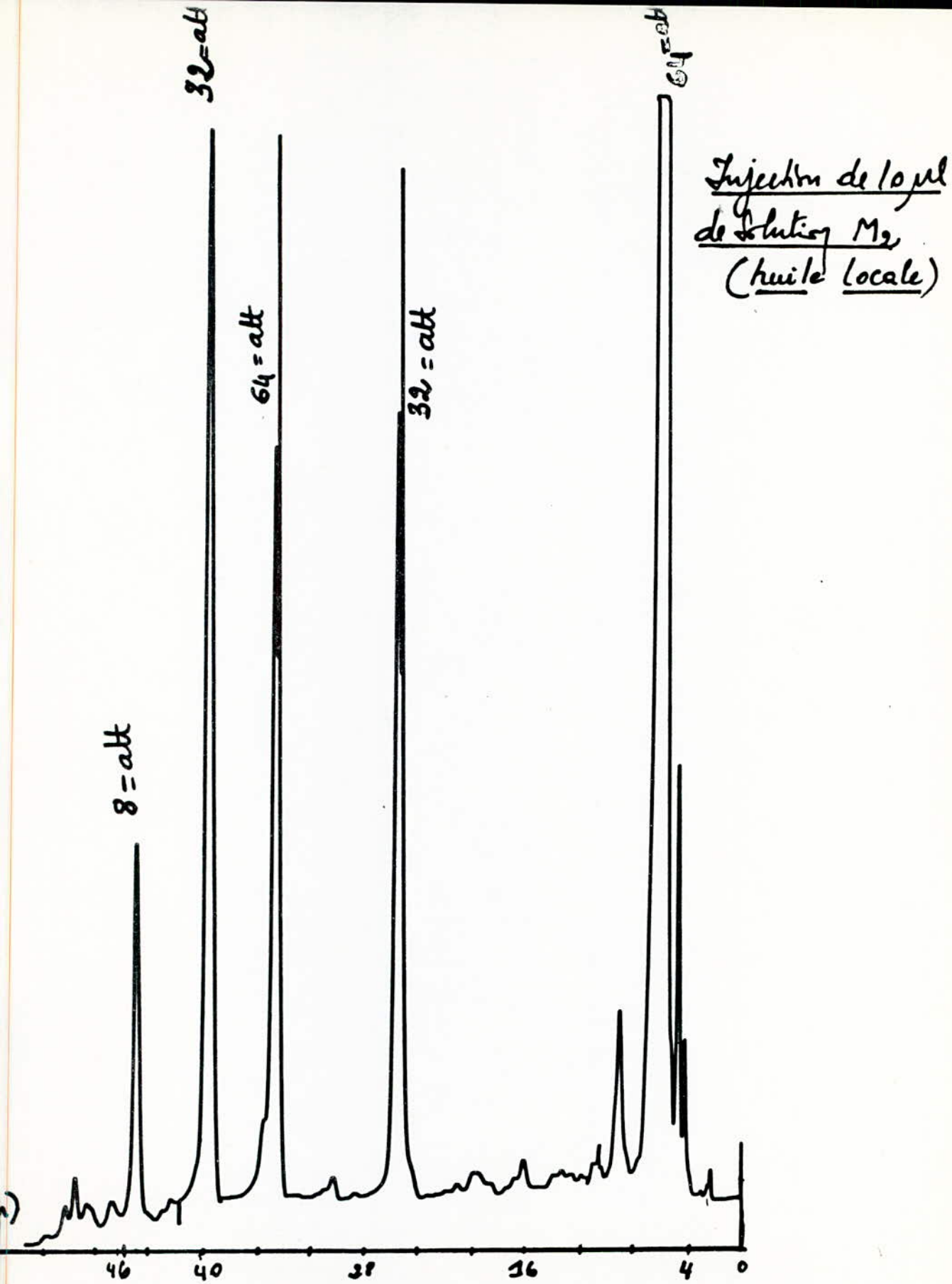


Chromatogramme n°6

Injection de 10 µl
d'ester de C12



Injection de
10 µl de Solution M1
64
32 = att
64 = att
32
16 = att
16 = att
40
30
20
10


Injection de 10 µl
de Solution M2
(huile locale)
8 = att
32 = att
64 = att
32 = att
64 = att
46
40
38
36
4
0

CONCLUSION

En conclusion nous avons pu faire une comparaison entre les deux techniques utilisées à savoir la chromatographie en phase liquide (HPLC) et la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et déduire de part les résultats qui se sont offerts à nous qu'indeniablement la CPG est la méthode la plus rapide tant en matière de temps d'analyse qu'en matière de préparation des échantillons et la plus performante quand aux résultats obtenus qui sont très satisfaisants.

Il faut noter néanmoins que pour mener à bien une telle analyse en HPLC il aurait fallu beaucoup plus de temps pour obtimiser les conditions d'expériences ou d'améliorer les méthodes de préparation des échantillons .

Ceci pouvant faire l'objet d'un travail ultérieur en effet ,parès avoir effectué et récolter toutes les informations concernant une huile de maïs, il s'agirait de poursuivre ce travail en essayant d'obtenir les meilleurs résultats en HPLC.

Toutefois il est à rappeler que d'autres méthodes existent pour analyser les acides gras d'une huile en utilisant un détecteur à indice de réfraction mais vu que le matériel que nous possédons et surtout les produits étalons que nous avions à notre disposition , nous avons opté pour cette méthode.

De plus nous voulions avoir une idée sur la composition des huiles par CPG ,avant d'entamer l'étude par la HPLC.
Il s'est avéré qu'elle était une technique qui avait besoin d'une mise au point précise et malheureusement le facteur temps n'était pas en notre faveur.
Nous souhaitons donc que ce travail puisse contribuer au developpement de l'analyse des matières graces par la chromatographie liquide à haute performance.

-oOo- B I B L I O G R A P H I E -oOo-

1 - Wolters associales liquid chromatography school.

2 - Les industries des Corps gras (Roger François). I P E (Industries, production - Ed technique et documentation environnement).

3 - Thamecopée française 1976.

4 - Renne Française des corp gras Mai 1981.

5 - Renne Française des corps gras Avril 1981.

6 - Thèse de magister (Alger), HADJ MEHI Guernati

Etude du comportement analytique des carbohydrates en chromatolique son haute fussion (APLC) et applications Avril 1980.

7 - Analusis : chimie analytique Fevrier 1977.

8 - Projet de fin d'études : G N Zounon.

Separation H C aromatiques par H P L C . Applications à des fonctions pétr. Juin 1980

9 - Cours de chimie analytique (par E bemillon)

10 - Wolts manuel d'analyse des corps gras Azoulay.

11 - CAVA. Chimi organique T 1

12 - La chromatographie en chimie organique et biologique.

Le Berar. Vol 1
Ed. Masson - Paris 1959.

13 - Techniques and applications of HPLC RJ Dolphin.

14 - Hand book of chimistray lang.
Ed - Mac Graw Hill 10 ème Ed - 1967

15 - Introduction à la biochimie et à la technologie des Aliments

Vol 1. Jean - Claude Cheftel et Henri Cheftel.

16 - Application de la chromatographie liquide haute performance à l'analyse des triglycérides des corps gras - mémoire Scientifique).

J - P Goiffon

17 - Journal of liquid chromatography 2 (3) - 407 - 416 (1979.

Cellular Fahyacid Composition of Vibrio Reversed - Phase High performance liquid chromatography.

18 - Méthodes générales d'analyses 275 a.

19 - Thèse 3ème Cycle : (Alger)

" Comportement analytique des acides gras pas chromatographie en phase gazeuse" S. SEBBIH Juin 1979.