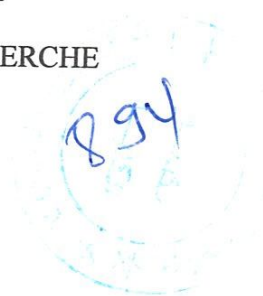


RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Mémoire du Projet de fin d'étude
2^{ème} Année Master



Département: Génie des Procédés
Spécialité : Génie chimique

Présenté par :

CHIHA Nada
BENMAMMAR Farida

**Dosage par HPLC-UV-DAD des méthylxantines
dans le thé vert**

Sous la Direction de :

Dr.BELGUIDOUM Karima

Juin 2018

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Mémoire du Projet de fin d'étude
2^{ème} Année Master



Département: Génie des Procédés
Spécialité : Génie chimique

Présenté par :

CHIHA Nada
BENMAMMAR Farida

**Dosage par HPLC-UV-DAD des méthylxantines
dans le thé vert**

Sous la Direction de :

Dr.BELGUIDOUM Karima

Juin 2018

Résumé

Dans ce travail, la chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrettes de diode (HPLC-UV-DAD) ; a été utilisée pour l'analyse des méthylxantines (la caféine, la théobromine et la théophylline), dans huit marques de thé vert achetées du marché local. Deux différentes méthodes d'extraction ont été prises en compte pour les analyses de thé : extraction multiple avec l'eau pure et le méthanol et extraction avec de l'eau bouillante (infusion) pendant 5 minutes.

Le mode de préparation des échantillons a une influence sur le rendement de l'extraction ; ainsi les rendements de l'extraction multiple par méthanol /eau, dans tous les échantillons sont supérieurs à ceux de l'infusion.

La concentration des méthylxantines totaux analysés dans les différentes marques de thé varie de $17,43 \pm 0,05$ mg/g à $38,58 \pm 0,06$ mg/g pour l'infusion et de $17,32 \pm 0,27$ mg/g à $26,12 \pm 0,32$ mg/g pour l'extraction multiple méthanol /eau. Ces différences en teneurs d'une marque à l'autre, sont certainement dues au sol où la plante est cultivée et même à la saison et au type de la cueillette.

Mots clés : Thé vert, caféine, méthylxantines, dosage, infusion, extraction hydrométhnolique, HPLC.

REMERCIEMENTS

Le présent travail dans ce mémoire a été mené à l'université de Guelma au laboratoire de Chimie Appliquée (LCA), et au laboratoire pédagogique de chimie.

*Nos premiers remerciements vont à notre encadreur **Dr. Karima BELGUIDOUM**, de qui nous avons beaucoup appris. Nous la remercions du fond du cœur pour toute l'aide et le soutien qu'elle nous a apportés du début jusqu'à la fin de notre mémoire, pour la confiance et la liberté qu'elle nous a accordées en acceptant d'encadrer ce travail de master, pour ses multiples conseils et pour toutes les heures qu'elle a consacrées afin de diriger cette étude de manière perfectionnée et minutieuse.*

*Nos remerciements sont aussi adressés à **Dr. Yamina BOULMOKH** ; enseignante au département de génie des procédés pour l'aide qu'elle nous a apportée au cours de la réalisation de ce travail.*

Nous exprimons notre gratitude aux membres de jury pour le temps consacré à lire et à juger notre travail.

*Nous tenons à remercier l'ingénieur de laboratoire pédagogique **M^{me} NEMOUCHI Zohra** et l'ingénieur de laboratoire de Chimie Appliquée **M^{me} BOULTIF Assia** pour toute l'aide qu'elles nous ont apportée à chaque fois que nous en avons besoin.*

Nous tenons également à remercier tous nos professeurs du département de génie des procédés de l'Université 08 Mai 1945– Guelma.

Nos remerciements vont aussi à toutes les personnes qui nous ont apporté de l'aide et que nous aurions malencontreusement oubliées.

Table des matières

TABLE DES MATIERES

Titre	Page
LISTE DES FIGURES	I
LISTE DES TABLEAUX	II
LISTE DES ABREVIATIONS	III
INTRODUCTION GENERALE	IV
Chapitre I : Généralités sur le thé vert	
I.1. Introduction	1
I.2. Histoire du thé vert	1
I.2.1. En Chine	1
I.2.2. En Japon	2
I.3. Origine du Camellia Sinensis	3
I.4. Description de Camellia Sinensis	3
I.4.1. La plante	3
I.4.2. La feuille	4
I.5. Culture et production du thé	4
I.5.1. La culture des plants de théiers	4
I.5.1.1. Les conditions géographiques et climatiques	4
I.5.1.2. La plantation et la taille des plants	5
I.5.2. La cueillette des feuilles	5
I.5.2.1. Les périodes de cueillette	5
I.5.2.2. Les types de cueillette	5
I.6. Les grades du thé vert	7
I.7. La production du thé vert	7
I.7.1. La cueillette	8
I.7.2. Le flétrissage	9
I.7.3. La torréfaction	10
I.7.4. Le roulage	10
I.7.5. Le séchage	11
I.8. La composition chimique de thé vert	11
I.8.1. Les polyphénols	11
I.8.1.1. Les flavonoïdes	11
I.8.1.2. Les acides phénoliques	11
I.8.1.3. Les tanins	12
I.8.2. Les alcaloïdes	12
I.8.3. Les acides aminés	12
I.8.4. Les vitamines	12
I.8.5. Les minéraux	13
I.8.6. Les glucides	13
I.8. Activités thérapeutiques du thé vert	13
I.8.1. Activité antioxydante	13
I.8.2. Prévention des maladies cardiovasculaires	14
I.8.3. Prévention du cancer	14
I.8.4. Activité antimicrobienne	15
I.8.5. Contre les maladies de Parkinson et d'Alzheimer	15
I.9. Toxicité	15
I.10. Qualité du thé vert	16

Chapitre II : La chromatographie liquide à haute performance	
II.1. Introduction	18
II.2. La théorie de la chromatographie en phase liquide	18
II.2.1. Définition	18
II.2.2. Principe	18
II.2.3. Les différents modes de séparation	19
II.2.3.1. La chromatographie d'adsorption	19
II.2.3.2. La chromatographie de partage	20
II.2.3.3. La chromatographie d'échange d'ions	20
II.2.3.4. La chromatographie d'exclusion	20
II.2.4. La polarité et chromatographie	20
II.2.4.1. Polarité d'une molécule	20
II.2.4.2. Interactions entre molécules	20
II.2.4.3. Notion de polarisabilité	21
II.2.4.4. Application à la chromatographie	21
II.2.5. Notions fondamentale	22
II.2.5.1. Phase mobile et stationnaire	22
II.2.5.2. Notion de temps	22
II.2.5.3. Notion de concentration	23
II.2.5.4. Notion d'efficacité	24
II.2.5.5. Qualité de la séparation	25
II.3. Appareillage	26
II.3.1. Réservoir de la phase mobile (solvant)	26
II.3.2. Pompe	27
II.3.3. Injecteur	27
II.3.4. Colonne	27
II.3.5. Détecteur	28
II.3.6. Intégrateur	28
II.4. Conclusion	29
Chapitre III : Matériels et méthodes	
III.1. Introduction	31
III.2. Matériels	31
III.3. Solvants et réactifs	31
III.4. Appareillage	31
III.4.1. Lyophilisateur	31
III.4.2. Chromatographie liquide à haute performance (Agilent, série 1260 Infinity)	33
III.5. Les données des composés étudiés	34
III.6. Echantillons de thés	35
III.7. Méthode de préparation et injection des standards	35
III.8. Méthodes de préparation et injection des échantillons de thé	36
III.8.1. Extraction multiple par méthanol/eau	36
III.8.2. Infusion	37
III.9. Calcul des rendements	37
III.10. Dosage par HPLC-UV-DAD des standards dans les échantillons de thé	38
III.10.1. Conditions d'analyse	38
III.10.2. Phase mobile	38
III.10.3. Phase stationnaire	38

III.10.4. Gradient	38
III.11. Validation de la méthode analytique	40
III.11.1. Courbes d'étalonnage	40
III.11.2. Détermination des limites de détection et de quantification	40
III.11.3. Détermination des taux de récupération	40
III.12. Injection	41
III.13. Conclusion	41
Chapitre IV : Résultats et discussions	
IV.1. Introduction	43
IV.2. Résultats	43
IV.2.1. Données chromatographiques des standards	43
IV.2.2. Validation de la méthode d'analyse	46
IV.2.2.1. Linéarité des courbes d'étalonnage et résolution des pics	46
IV.2.2.2. Limites de détection (LD) et de quantification (LQ)	46
IV.2.2.3. Taux de récupération	47
IV.2.3. Présentation des chromatogrammes des échantillons de thé vert	48
IV.2.4. Concentrations des méthylxantines étudiés dans les différents échantillons de thé	57
IV.2.5. Rendement des extractions (infusion et extraction hydrométhanolique)	58
IV.3. Discussion	58
IV.3.1. Concentrations des méthylxantines dans les échantillons du thé vert	58
IV.3.1.1. Selon la marque du thé	58
IV.3.1.2. Selon la méthode d'extraction	59
IV.3.2. Discussion des résultats des rendements	61
IV.4. Conclusion	62
CONCLUSION GENERALE	V
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	VI
ANNEXE	VII

*Liste des figures et des
tableaux*

Liste des figures

Numéro	Titre	Page
Chapitre I		
Figure I.1	Gâteau de thé	2
Figure I.2	Poudre de thé vert chinois	2
Figure I.3	Camellia Sinensis var. Sinensis	3
Figure I.4	Camellia Sinensis var. Assamica	3
Figure I.5	La plante Camellia Sinensis	4
Figure I.6	Les différentes cueillettes du thé	6
Figure I.7	Etapas de production du thé vert	8
Figure I.8	La cueillette manuelle	8
Figure I.9	La cueillette mécanique	9
Figure I.10	Flétrissage traditionnel sur plateau en bambou	9
Figure I.11	Torréfaction artisanale dans un wok	10
Figure I.12	Torréfaction à machine	10
Figure I.13	Roulage à la main	11
Figure I.14	Roulage mécanique	11
Figure I.15	Séchage traditionnel	11
Chapitre II		
Figure II.1	Principe de fonctionnement HPLC	19
Figure II.2	La phase stationnaire et la phase mobile	22
Figure II.3	La valeur de détection en fonction du temps avec un seul pic	22
Figure II.4	Types de temps pour un pic chromatographique	23
Figure II.5	La valeur de détection en fonction du temps avec deux pics	25
Figure II.6	Les organes d'une chaîne HPLC	26
Figure II.7	Quelques types de colonnes pour HPLC	27
Chapitre III		
Figure III.1	Lyophilisateur Alpha 1-2 LD plus (Laboratoire de Chimie Appliquée, Université de Guelma)	32
Figure III.2	HPLC (Agilent 1260) utilisé pour le dosage des méthylxanthines de thé vert. (Laboratoire de Chimie Appliquée, Université de Guelma)	33
Figure III.3	Structures des molécules étudiées en 3D. a) Caféine ; b) Théophylline ; c) Théobromine	34
Figure III.4	Echantillons des thés verts étudiés	35
Figure III.5	Protocole expérimental de l'extraction hydrométhanolique	36
Figure III.6	Gradient HPLC utilisé	39
Chapitre IV		
Figure IV.1	Chromatogramme HPLC de la caféine pur (T_R : 7,335 min, λ : 273 nm)	43
Figure IV.2	Courbe d'étalonnage de la caféine	44
Figure IV.3	Chromatogramme HPLC de la théobromine pur (T_R : 4,33 min, λ : 273 nm)	44
Figure IV.4	Courbe d'étalonnage de la théobromine	45

Figure IV.5	Chromatogramme HPLC de la théophylline pur (T_R : 6,258 min, λ : 273 nm)	45
Figure IV.6	Courbe d'étalonnage de la théophylline	46
Figure IV.7	Taux de récupération pour chaque composé, obtenu à partir d'un extrait du thé vert dopé	48
Figure IV.8	Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E1) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine, pic (3) : Théophylline	49
Figure IV.9	Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E2) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine, pic (3) : Théophylline	49
Figure IV.10	Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E3) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine, pic (3) : Théophylline	50
Figure IV.11	Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E4) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine, pic (3) : Théophylline	50
Figure IV.12	Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E5) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine, pic (3) : Théophylline	51
Figure IV.13	Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E6) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine, pic (3) : Théophylline	51
Figure IV.14	Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E7) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine, pic (3) : Théophylline	52
Figure IV.15	Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E8) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine, pic (3) : Théophylline	52
Figure IV.16	Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E1) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine	53
Figure IV.17	Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E2) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine	53
Figure IV.18	Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E3) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine, pic (3) : Théophylline	54
Figure IV.19	Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E4) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine, pic (3) : Théophylline	54
Figure IV.20	Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E5) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine, pic (3) : Théophylline	55
Figure IV.21	Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E6) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine	55
Figure IV.22	Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E7) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine	56
Figure IV.23	Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E8) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine	56
Figure IV.24	Les méthylxantines totaux dans les échantillons de thé vert	59
Figure IV.25	Concentrations de la caféine dans les échantillons de thé préparés par infusion et extraction hydrométhanolique	60
Figure IV.26	Concentrations de la théobromine dans les échantillons de thé préparés par infusion et extraction hydrométhanolique	60
Figure IV.27	Concentrations de la théophylline dans les échantillons de thé préparés par infusion et extraction hydrométhanolique	61
Figure IV.28	Rendements en fonction des marques du thé vert, des échantillons préparés par infusion	61
Figure IV.29	Rendements en fonction des marques du thé vert, des échantillons préparés par extraction hydrométhanolique	62

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
Chapitre I		
Tableau I.1	Composition chimique des feuilles de thé fraîches	13
Chapitre III		
Tableau III.1	Quelques caractéristiques des méthylxantines étudiés	34
Tableau III.2	Caractéristiques organoleptiques des échantillons de thé vert	35
Tableau III.3	Gradient HPLC pour l'analyse des trois méthylxantines du thé (La caféine, la théobromine et la théophylline)	39
Chapitre IV		
Tableau IV.1	Données HPLC pour la caféine	43
Tableau IV.2	Données HPLC pour la théobromine	44
Tableau IV.3	Données HPLC pour la théophylline	45
Tableau IV.4	Paramètres graphiques de la méthode analytique proposée, T_R : temps de rétention, LD : Limite de détection ; LQ : Limite de quantification	46
Tableau IV.5	Taux de récupération de la méthode analytique à trois niveaux d'enrichissement des différents composés standards.	47
Tableau IV.6	Concentrations des méthylxantines dans les échantillons de thé vert étudiés	57
Tableau IV.7	Rendements (%) de l'extraction (infusion et extraction multiple méthanol/eau)	58

Liste des abréviations

EGCg	Gallate d'épigallocatechine
ECg	Gallate d'épicatéchine
EGC	Epigallocatechine
EC	Epicatéchine
HPLC	Chromatographie liquide à haute pression
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
CCM	Chromatographie en couche mince
DAD	Détecteur à barrette de diodes (Diode Array Detector)
LD	Limite de détection
LQ	Limite de quantification
T _R	Temps de rétention
M	Masse molaire
Min	Minute
mm	Millimètre
ml	Millilitre
MeOH	Méthanol
R ²	Coefficient de corrélation
PS	Poids sec
MS	Matière sèche
nd	Non détecté
SD	Déviatoin standard
mAU	Mili arbitrary unit
MT	Méthylxantines totaux
°C	Degré Celsius
%	Pourcentage
H ₂ O	Eau
λ	Longueur d'onde
nm	Nanomètre

Introduction générale

Introduction générale

Le thé est une boisson aromatique utilisant des feuilles et des bourgeons de théier (*Camellia Sinensis*) un arbuste originaire d'Extrême-Orient, de la famille des Théacées.

Le thé est aujourd'hui la boisson la plus bue au monde après l'eau. Sa consommation peut prendre des formes très diverses : additionnée de lait et de sucre au Royaume-Uni, longuement bouillie avec des épices en Mongolie, bouillie avec des épices et du lait comme en Inde, préparée dans de minuscules théières par infusion dans une technique chinoise, battue comme au Japon et préparée par décoction en mettant un long temps jusqu'à l'obtention d'une boisson mousseuse au Sud algérien.

Le thé vert est un thé dont l'oxydation naturelle est rapidement stoppée après la cueillette. Il en résulte un thé non-oxydé. Parmi les ingrédients du thé vert, on trouve certaines xanthines (groupe chimique des alcaloïdes, dérivés de la purine) essentielles et connues, dont la caféine, l'alcaloïde principal, la théobromine et la théophylline. Il s'agit de substances organiques que l'on retrouve dans tous les types de thés, quelle qu'en soit la couleur.

La caféine est surtout appréciée et consommée pour ses effets éveillant et stimulants. La théophylline, a été longtemps utilisée comme antiasthmatique. La théobromine, développe qualitativement les mêmes effets que la caféine mais sur un mode moins intense et plus durable. Il lui est prêté des effets aphrodisiaques.

Il convient de souligner que les alcaloïdes dans le thé vert sont nettement mieux tolérés que dans les autres plantes où ils se trouvent car de nombreux autres ingrédients ont des effets positifs synergiques qui « harmonisent » leurs effets excitants sur l'organisme.

Vu l'ampleur de la consommation du thé vert dans notre société algérienne pour ses bienfaits sur la santé ce travail de fin d'études se focalisant sur le thé vert a été proposé.

L'objectif de ce travail est de déterminer la composition en trois méthylxantines (la caféine, la théobromine et la théophylline) de huit marques de thés vert préparés selon deux techniques d'extraction (infusion et extraction multiple méthanol/eau).

Parmi les méthodes de dosage des composés organiques présents dans les denrées alimentaires, l'HPLC est la plus appropriée, vu qu'elle est d'une grande précision, fiable et facile à mettre en œuvre. Ainsi, les teneurs en constituants du thé ont été mesurées par la

chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) couplée à un détecteur à barrettes de diode.

Ce mémoire s'articule autour de quatre chapitres précédés d'une introduction générale :

- Le premier chapitre consistera à présenter des généralités sur le thé vert.
- Le deuxième chapitre s'intéressera d'assez près à la chromatographie liquide à haute performance.
- Dans le troisième chapitre, sera présentée la méthode d'analyse utilisée dans ce travail ainsi que les modes opératoires mis en œuvre.
- Les résultats et les discussions étant le fruit de la partie expérimentale seront détaillés dans le dernier chapitre.
- Enfin une conclusion générale achèvera ce travail.

Chapitre I

Généralités sur le thé vert

I.1. Introduction

Un thé vert est un thé peu ou non oxydé lors de sa fabrication, conservant ainsi intactes ses propriétés.

Le thé vert est connu depuis plusieurs millénaires, en particulier dans les populations asiatiques qui lui attribuent des propriétés médicinales.

Après l'eau, le thé est la boisson la plus populaire dans le monde, il est consommé en raison de sa saveur, ses caractéristiques aromatiques et effets bénéfiques pour la santé.

Les recherches scientifiques récentes ont mis en évidence ses propriétés thérapeutiques liées, en particulier, à sa riche teneur en polyphénols, à l'action antioxydante et aussi en caféine [1].

I.2. Histoire du thé vert

I.2.1. En Chine

L'histoire du thé vert commence il y a environ 5000 ans en Chine. La légende raconte que c'est l'empereur Shennong qui aurait découvert le thé en premier.

A l'origine, il s'agissait d'arbres sauvages principalement dans les régions montagneuses du sud de la Chine qui servaient à produire le thé.

La découverte de son effet tonique et rafraichissant, mais aussi de ses puissantes propriétés médicinales ont participé au développement de son utilisation principalement par les moines bouddhistes, mais aussi par la classe supérieure chinoise.

Aux IV^{ème} et V^{ème} siècles de notre ère, le thé était transformé d'une manière totalement différente d'aujourd'hui. Les feuilles étaient trempées après la récolte, réduites dans un hachoir puis pressées en briques de thé compactes (aussi appelé gâteau de thé). Le thé était ensuite mélangé et cuit avec de nombreux autres ingrédients : riz, gingembre, sel, zestes d'orange, oignons, etc.

Pendant la dynastie Tang, c'était ainsi que l'on avait pour habitude d'utiliser le thé. Mais il existait aussi des pochettes de thé concassé que l'on utilisait contre les rhumatismes. C'est durant cette période que le thé connu sa première expansion majeure [2].



Figure I.1 : Gâteau de thé [2].

Une grosse impulsion à la culture du thé se produisit sous la dynastie Song. C'est à cette période que la première poudre de thé vert fut utilisée pour la cérémonie du thé et que ce produit commença à devenir un produit de consommation quotidienne dans cette région du monde (Chine et Japon).



Figure I.2 : Poudre de thé vert chinois [2].

Au XIII^{ème} siècle, les acquis en matière de thé furent détruits et presque totalement perdus du fait de la conquête et la domination des mongoles. Ces derniers étaient habitués à boire du thé totalement fermenté et n'avaient que très peu de curiosité pour la culture du thé sous dynastie Song.

De ce point de vue l'héritage Mongol fut durable. La poudre de thé vert ne réapparut que des siècles plus tard et ne joua malheureusement en Chine, contrairement au Japon, qu'un rôle mineur dans la culture du thé [2].

I.2.2. En Japon

Le thé vert arriva au Japon au VIII^{ème} siècle via des moines bouddhistes chinois. Ces moines auraient organisé des voyages dans ce but. Par ailleurs, il semblerait que des moines bouddhistes japonais seraient partis étudier «l'art du thé» en Chine et à leur retour auraient participé à rendre l'implantation de cette culture possible dans l'archipel.

Le thé vert était apprécié par les moines pour ses propriétés médicinales ainsi que pour son effet tonifiant et stimulant pour la concentration pendant de longues méditations.

En 1738, un certain Soen Nagatari inventa la méthode de roulage des feuilles de thé après la torréfaction à la vapeur d'eau. Cette méthode reçut un succès retentissant et est encore utilisée à ce jour.

En 1859, avec l'ouverture des ports commerciaux à plus grande échelle par les samouraïs que le thé devient une boisson de consommation quotidienne au Japon. Un peu plus tard, il se développe et prend une ampleur internationale grâce à l'utilisation de machines industrielles [2].

I.3. Origine du *Camellia Sinensis*

L'arbre ou arbuste à thé, *Camellia Sinensis*, est à l'origine de tous les types de thés. Le terme *Sinensis* indique l'origine géographique de la plante, en l'occurrence la Chine. De même, la variété *Assamica* prend son nom de la région d'Assam au Nord de l'Inde. Les thés de qualité supérieure viennent avant tout de la variété *Sinensis*. Il n'est pas encore fermement établi laquelle des deux variétés était réellement la variété de base de cette espèce, mais il semblerait que l'espèce d'origine soit le *Camellia Sinensis* provenant de la province de Yunnan en Chine [2].



Figure I.3 : *Camellia Sinensis* var. *Sinensis* [13].



Figure I.4 : *Camellia Sinensis* var. *Assamica* [12].

I.4. Description de *Camellia Sinensis*

I.4.1. La plante

A l'état naturel, le théier est un arbre très rameux, de 5 à 10 mètres de haut et pouvant atteindre 15 mètres.

Les fleurs sont odorantes, axillaires et solitaires. Leur taille varie et peut aller jusqu'à 3 centimètres (cm). Elles sont dialypétales (les pétales sont indépendants entre eux), pentamères (formées de cinq pétales), actinomorphes (l'agencement des pièces florales est symétrique par rapport à l'axe de la fleur). Les pétales sont blancs, légèrement adhérents à la base et forment une corolle spiralée. Le calice, formé de cinq sépales, est également spiralé.

Le fruit est une capsule loculicide trigone (avec trois loges uniséminées), ne renfermant qu'une ou deux graines oléagineuses, exalbuminées, entourées d'un tégument sans arille [1].



Figure I.5 : La plante *Camellia Sinensis* [11].

I.4.2. La feuille

Les feuilles du théier ont une longueur de 5 à 14 cm et une largeur de 1,9 à 5 cm. Elles sont persistantes, molles et duveteuses si elles sont jeunes, et deviennent glabres lorsqu'elles sont âgées.

Elles sont isolées, alternes, oblongues-ovales ou lancéolées, vert foncé, brillantes, à bord très dentelé et non stipulées. Les dents sont recourbées en forme de griffes, se terminant par des hydatodes.

Ces derniers sont constitués d'un stomate aquifère, associé à une chambre sous stomatique remplie de cellules parenchymateuses gorgées d'eau ou épithème, accueillant les extrémités terminales des nervures de la feuille [1].

I.5. Culture et production du thé

I.5.1. La culture des plants de théiers

I.5.1.1. Les conditions géographiques et climatiques

Les caractéristiques des sols de culture et les conditions climatiques sont des facteurs influençant la qualité des feuilles du théier.

Le sol ne doit être ni calcaire, ni argileux, mais acide et meuble afin de permettre à la racine centrale du théier de s'ancrer en profondeur. Il doit également être en pente pour éviter la stagnation de l'eau.

Les meilleures zones de culture se trouvent dans les régions tropicales et subtropicales, à une altitude de 1000 à 2500 mètres. On y trouve le climat optimal au développement de l'arbuste :

- Une température entre 10 et 30 °C (le théier meurt en dessous de -5 °C).
- Des nuits fraîches.

- Un ensoleillement de 5 heures par jour.
- Des vents réguliers.
- Des précipitations nocturnes de 200 mm³ par mois.

Les cultures se situent ainsi dans les montagnes de la province du Yunnan en Chine, de Darjeeling au nord de l'Inde, du Ceylan (Sri Lanka), ou encore du Kenya. Cependant, les plantations ont tendance à être délocalisées en plaine afin de permettre une mécanisation de la récolte [1].

I.5.1.2. La plantation et la taille des plants

Les théiers sont cultivés à partir de semences ou de boutures croissant en pépinière pendant 2 ans environ puis plantées en terre. Ces plantations sont appelées jardins et s'étendent sur plusieurs hectares.

Les théiers sont ensuite taillés afin de les garder à une hauteur facilitant l'accès aux feuilles, mais également pour limiter la floraison et augmenter le nombre de bourgeons [1].

I.5.2. La cueillette des feuilles

I.5.2.1. Les périodes de cueillette

La récolte se fait durant les périodes de croissance de l'arbuste appelées flush, de mars à novembre. L'hiver correspond à une période de dormance. Il est à noter que l'arôme du thé varie avec la saison. Ainsi, les thés printaniers, first flush, seront ceux de meilleure qualité suite à l'accumulation des nutriments et des substances aromatiques durant l'hiver.

Pour les jardins situés autour de l'équateur (Sri Lanka, Kenya), où les variations climatiques sont faibles, la cueillette peut se faire toute l'année [1].

I.5.2.2. Les types de cueillette

Idéalement la récolte se fait à la main, feuille par feuille. Le type de cueillette manuelle est défini par le nombre de feuilles récoltées en plus du bourgeon terminal.

Il s'agit d'un procédé essentiel qui conditionne la qualité du thé. En effet, les feuilles n'ont pas une composition équivalente : plus la feuille est située à l'extrémité de la tige, plus elle est concentrée en sève et donc plus elle est riche en composés chimiques [1].

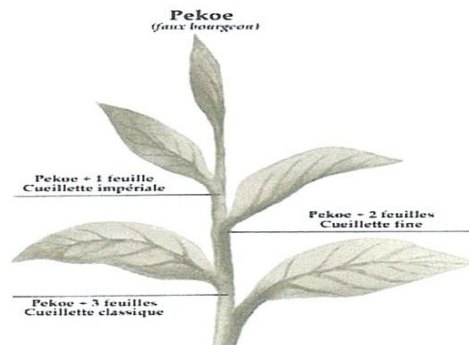


Figure I.6 : Les différentes cueillettes du thé [14].

a. La cueillette impériale ou P+1

On prélève le bourgeon terminal à peine déployé, ainsi que la première feuille qui suit. La qualité est excellente. C'était le thé que les Empereurs de Chine buvaient exclusivement [1].

b. La cueillette fine ou P+2

Lors de la récolte fine au printemps, considérée aujourd'hui comme donnant un thé de qualité supérieure, on prélève le bourgeon terminal non épanoui, et les 2 premières feuilles.

On appelle ce thé « pekoe » ou « flowery pekoe » ; « pekoe », le bourgeon terminal, dérive du chinois « pak ho », signifiant « cheveux », en raison du duvet blanc à la surface des bourgeons et des jeunes feuilles. Il faut également noter que ces pousses du printemps vert jade, sont les plus riches en tanins, théine (caféine) et autres composants conférant au thé son arôme [1].

c. La cueillette grossière ou P+3

Il s'agit de thé de qualité nettement inférieure, composé de la première pousse et des trois feuilles suivantes, voire plus, c'est ce qu'on appelle thé « souchong pekoe », sa qualité est légèrement inférieure au « pekoe ».

Le thé « souchong » est composé des quatrième et cinquième feuilles. C'est le thé le plus fréquemment vendu, à cause de son rendement de cueillette élevé.

On ne cueille pas les feuilles à la base de l'arbuste, car elles ne sont pas de bonne qualité, et elles sont indispensables à la survie du théier [1].

I.6. Les grades du thé vert

Les grades du thé vert ne sont pas basés sur le type de cueillette, mais propres à chaque pays.

En Chine on distingue plusieurs grades, dont les plus connus sont :

- Les Young Hyson, Fine Hyson et Hyson. Les premiers sont des thés assez rares, composés de petites feuilles cueillies au début du printemps et roulées avec soin.
- Les Hyson sont constitués de feuilles récoltées juste après celles des Young Hyson.
- Les Gunpowder ou « poudre à canon », formés de très jeunes feuilles, roulées entre les doigts de façon à obtenir de petites boules très serrées de quelques millimètres et à saveur très aromatique.
- Les Chun Mee ou « cils précieux » sont caractérisés par des feuilles roulées dans le sens de la longueur.

Concernant les grades japonais :

- Gyokuro de qualité très élevée, est formé des premières pousses du printemps récoltées après un ombrage des théiers de trois semaines, de qualité très élevée.
- Matcha : les feuilles sont de qualité identique à celles du Gyokuro, mais sont moulues afin d'obtenir une poudre.
- Sencha : ces feuilles, cueillies au printemps ou au début de l'été et non soumises à un ombrage, ressemblent à celles du thé Gyokuro, mais de plus petite taille.
- Bancha : il s'agit d'un thé de qualité moindre, pour lequel on utilise les feuilles à partir de la quatrième ou cinquième, ainsi que des morceaux de tiges [17].

I.7. La production du thé vert

Le thé vert est un thé dont les feuilles, après la cueillette, seront le plus souvent flétries et chauffées à haute température, afin de neutraliser les enzymes responsables de l'oxydation.

Elles seront ensuite roulées et séchées plusieurs fois afin d'obtenir une forme particulière.

On peut distinguer deux méthodes principales pour obtenir du thé vert. La méthode chinoise, d'une part, par laquelle les feuilles sont chauffées dans de grandes bassines de cuivre placées sur le feu ; la méthode japonaise, d'autre part, par laquelle les feuilles seront chauffées à la vapeur, très brièvement, en moins d'une minute, avant d'être roulées et séchées [17].

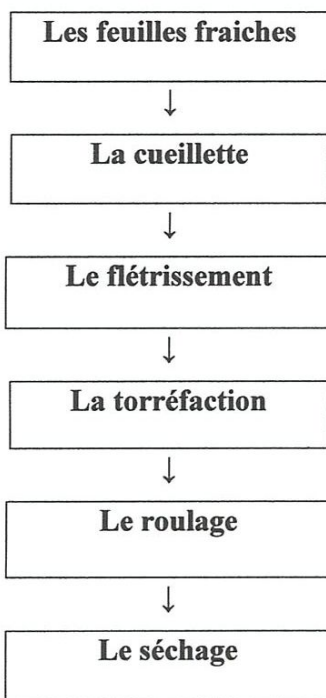


Figure I.7 : Etapes de production du thé vert [1].

I.7.1. La cueillette

Les thés verts sont fabriqués à partir de jeunes pousses. Les jeunes pousses de thé, de couleur vert clair et les feuilles âgées, plus foncées.

La cueillette est traditionnellement manuelle et obligatoirement effectuée par des mains expertes pour les thés verts de qualité. En effet, selon le grade désiré, les cueilleuses doivent sélectionner le bourgeon seul ou le bourgeon accompagné d'une, deux ou trois jeunes feuilles.



Figure I.8 : La cueillette manuelle [15].

Certains producteurs n'hésitent pas, aujourd'hui, à la mécaniser la cueillette. Ce type de récolte, de piètre qualité est généralement destiné à fabriquer du thé en sachet ou des extraits. [1].



Figure I.9 : La cueillette mécanique [1].

I.7.2. Le flétrissage

Le plus rapidement possible après la cueillette, les feuilles de thé vert sont étalées sur des plateaux de bambou et mises à sécher, le plus souvent en plein air. Le but du flétrissage est de réduire le plus rapidement la teneur en eau des feuilles afin de limiter les phénomènes d'oxydation



Figure I.10 : Flétrissage traditionnel sur plateau en bambou [1].

La durée de cette étape est variable selon la saison. A vu d'œil, on décide si les feuilles sont suffisamment flétries pour pouvoir subir la deuxième opération [1].

I.7.3. La torréfaction

Cette étape est sans doute la plus importante dans le processus de fabrication d'un thé vert. C'est elle qui va décider de la couleur, de l'odeur et du goût du thé vert.

En inactivant les enzymes présentes dans les feuilles fraîches, elle va définitivement arrêter l'oxydation enzymatique, préserver les précieux polyphénols et réduire, voire, éliminer la saveur végétale de la feuille fraîche et libérer les arômes.

Effectuée à la main, par petite quantité, dans un wok, pour les meilleurs thés verts, cette étape va encore réduire la teneur en eau des feuilles et des bourgeons et pour certains thés, donner un aspect caractéristique et faciliter l'avant dernière étape. Il existe aussi des machines à torréfier le thé [1].



Figure I.11 : Torréfaction artisanale dans un wok [1].

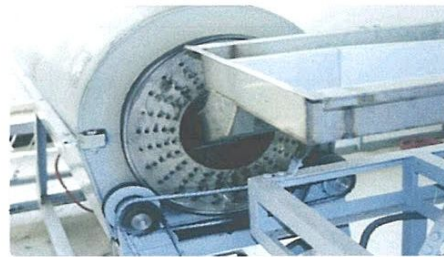


Figure I.12 : Torréfaction à machine [1].

I.7.4. Le roulage

Cette étape déterminera la forme finale de la feuille. On pourra choisir par exemple de rouler la feuille en boule dans le sens de la largeur ou en aiguille dans le sens de la longueur.

Le roulage traditionnel est habituellement effectué à la main dans une cuve chauffée au bois. Le roulage mécanique utilisera une rouleuse.

Cette étape permet également aux cellules des feuilles de se briser et de libérer les huiles essentielles qui agiront pour l'étape de fermentation. Seuls les thés blancs ne subissent pas de roulage pour leur fabrication [1].



Figure I.13 : Roulage à la main [1].

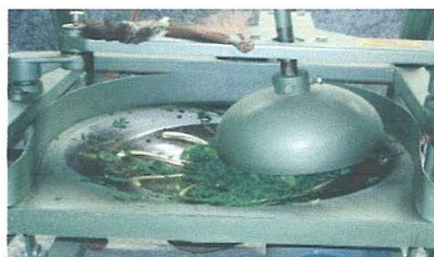


Figure I.14 : Roulage mécanique [1].

I.7.5. Le séchage

Les feuilles sont enfin séchées sur des claies dans des cuves ou des séchoirs avant d'être triées [1].



Figure I.15 : Séchage traditionnel [1].

I.8. La composition chimique de thé vert

La feuille du thé ne contient pas moins de 350 constituants. A l'état frais, le thé renferme 27 % de matières sèches [3].

Ses principaux constituants sont :

I.8.1. Les polyphénols

Ils sont présents dans tous les thés, quelle que soit leur couleur. Ce sont eux qui donnent au thé ses propriétés anti-oxydantes [3].

I.8.1.1. Les flavanoïdes

Sont présent dans des proportions similaires dans les thés oxydés ou non-oxydés. Ce qui varie, c'est le type des polyphénols présents. Par contre, les thés verts contiennent plus de catéchines [3].

I.8.1.2. Les acides phénoliques

En analysant la composition de la feuille de thé, on retrouve des teneurs d'environ 5 % d'acides-phénols. Leur importance pharmacologique est nettement moindre, par rapport à celle des autres polyphénols.

Tous les acides phénoliques sont extraits à l'aide d'un solvant organique, dans un milieu légèrement acide [1].

I.8.1.3. Les Tanins

Sont aussi des molécules de types phénols ou polyphénols liés par des amidons. Le goût astringent du thé provient des tannins [3].

I.8.2. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes ou méthylxanthines appartenant au groupe de la purine présents dans les feuilles de thé sont la caféine, la théobromine et la théophylline. La caféine découverte en 1819 et la théine découverte en 1837 ont été identifiées comme étant une seule et même molécule en 1838. La caféine représente entre 2 et 5 % de la matière sèche des feuilles de thé ; la théobromine entre 0,05 et 0,5 % et la théophylline est souvent inférieure à 0,5 %.

La structure chimique des méthylxanthines inclut un cycle purine, comme dans les nucléotides adénine et guanine. La position du groupement méthyle détermine les propriétés pharmacologiques de chacun des composés :

- La caféine est la 1, 3, 7 -triméthylxanthine.
- La théophylline est la 1, 3 –diméthylxanthine.
- La théobromine est la 3, 7 –diméthylxanthine [18].

I.8.3. Les acides aminés

Les composés azotés de la feuille de thé sont, entre autres, représentés par 19 acides aminés.

Seule la théanine est propre au thé, représentant presque la moitié des acides aminés de la feuille de thé vert, et peut servir à son identification.

Parmi les autres acides aminés isolés on peut citer : l'acide aspartique, la sérine, l'asparagine, l'arginine, l'acide glutamique, l'histidine, la leucine, la valine, la glutamine, la thréonine, l'alanine, le tryptophane, l'isoleucine, la phénylalanine, des traces de proline et de glycine [1].

I.8.4. Les vitamines

Le thé est riche en vitamines du groupe B telles que thiamine (B1), riboflavine (B2), niacine (B3). La vitamine C se trouve aussi en quantité significative dans le thé vert.

L'infusion de thé contient, de plus, la vitamine P qui favorise la perméabilité capillaire et l'élasticité de la paroi des vaisseaux sanguins [3].

I.8.5. Les minéraux

Les minéraux contenus en plus grande quantité dans les feuilles de thé vert sont le potassium, le calcium, le phosphore et le magnésium. Dans une moindre quantité le manganèse, le zinc, le cuivre et le fer [1].

I.8.6. Les glucides

15 à 23 % de protides et 2 à 3 % de lipides. Ces substances, peu solubles, sont faiblement extraites lors de l'infusion [3].

Tableau I.1 : Composition chimique des feuilles de thé fraîches [18].

<i>Composé chimique</i>	<i>Pourcentage de matière sèche %</i>
<i>Les Polyphénols</i>	20 à 30 %
-Flavanoïdes	25 %
-Acide phénols	4 %
-Tanins	3 %
<i>Les bases puriques</i>	
-Caféine	2 à 4 %
-Théobromine	0,15 à 0,2 %
-Théophylline	0,02 à 0,04 %
<i>Acides aminés</i>	3 à 4 %
-Théanine	3 %
<i>Glucides</i>	
<i>Minéraux</i>	3 à 5 %

I.8. Activités thérapeutiques du thé vert

De nombreuses propriétés pharmacologiques du thé vert ont été démontrées par plusieurs chercheurs [1].

I.8.4. Activité antioxydante

Les antioxydants sont des molécules qui contribuent à la protection de notre corps contre des substances potentiellement dangereuses que l'on appelle radicaux libres. Le thé en est une source très importante notamment de flavonoïdes dont le rôle est la neutralisation des radicaux libres.

L'activité bénéfique de thé vert sur la santé est essentiellement attribuée aux propriétés antioxydantes de ses polyphénols. Cet effet thérapeutique est dû à la présence des groupes

hydroxyles du noyau B des catéchines non gallate (EC) et (EGC) et aussi des hydroxyles du noyau B et D des catéchines gallate (ECg) et (EGCg).

La présence de trihydroxyl sur le noyau B a montré une activité antioxydant très importante. Il est capable de piéger et neutraliser les radicaux libres.

Les polyphénols du thé vert sont capables d'inhiber le stress oxydant non seulement en piégeant les espèces oxygénées réactives (EOR) par transfert d'électron ou d'atome d'hydrogène, mais aussi, en chélatent les ions des métaux de transition sous des complexes inertes.

De nombreux travaux scientifiques ont rapporté que les catéchines du thé vert ont un pouvoir antioxydant plus puissant que celui de la vitamine C et E [1].

I.8.2. Prévention des maladies cardiovasculaires

Les agents qui inhibent l'agrégation anormale des plaquettes réduisent aussi les risques de maladies cardiaques. Plusieurs études épidémiologiques ont montré que la consommation du thé est liée à une baisse importante des maladies cardiovasculaires.

Le thé inhibe l'agrégation des plaquettes et aussi le facteur d'activation des plaquettes (PAF).

Des études de laboratoire ont montré que les flavonols et particulièrement l'épigallocatechin-3-gallate (EGCG) de thé réduisent le taux de cholestérol et inhibe l'oxydation des lipoprotéines.

Le thé vert peut aussi diminuer la tension artérielle en inhibant l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) [1].

I.8.3. Prévention du cancer

Ces dernières années, de très nombreux travaux publiés dans les revues scientifiques internationales ont fait état d'une activité préventive contre les maladies cancéreuses. Des recherches plus récentes ont montré que la consommation du thé pourrait avoir un effet protecteur contre le cancer de la prostate, de la peau, du colon et du pancréas.

Des travaux expérimentaux sont actuellement en cours sur de nombreux modèles de tumeurs provoquées chez l'animal, ils ont montré un effet préventif du thé et précisément le gallate d'épigallocatechine (EGCG) contre certaines tumeurs du sein, de la peau, de la prostate, et du poumon.

Des expériences sur l'animal ont démontré que le thé vert et l'EGCG peuvent empêcher la carcinogénèse à toutes les étapes, à savoir initiation, propagation et terminaison.

Le gallate d'épigallocatechine-3 (EGCG), est un catéchol qui bloque l'enzyme l'urokinase. Or cette enzyme est produite en quantité importante par la cellule.

L'inhibition de l'urokinase par l'EGCG empêche la tumeur de produire des métastases.

On sait que les crèmes solaires protègent contre les coups du soleil, mais pas contre les modifications cellulaires pouvant entraîner le développement de mélanome.

Les résultats de laboratoire révèlent que l'application topique ou la consommation orale de l'EGCG inhibent la cancérogenèse provoquée par les radiations ultraviolettes.

Ainsi des travaux ont montré clairement une activité inhibitrice du thé vert sur les lésions cutanées dues aux rayons ultraviolets B induit chez les souris.

Le thé vert piège les radicaux libres, ce qui pourrait expliquer en partie ses effets préventifs dans la survenue de cancers [1].

I.8.4. Activité antimicrobienne

Des études scientifiques ont révélé que le thé vert a de puissants effets antimicrobiens sur les bactéries de la bouche, lesquelles sont communément incriminées dans la carie dentaire et le tartre [1].

I.8.5. Contre les maladies de Parkinson et d'Alzheimer

Plusieurs chercheurs ont commencé à s'intéresser aux propriétés du thé vert à la suite d'études épidémiologiques montrant que des personnes qui consommaient plus de trois tasses par jour avaient moins de risque de développer les maladies de Parkinson et d'Alzheimer.

Des études *in vivo* ont montré que l'accumulation d'une grande concentration de fer dans le cerveau est parmi les causes des maladies neurodégénératives.

Une attention particulière a été portée sur l'étude des catéchines du thé vert et en particulier sur l'épigallocatechine-3-gallate qui possède une capacité antioxydante remarquable ainsi que la propriété de chélater les ions du fer [1].

I.9. Toxicité

La consommation régulière du thé, sous forme d'infusion ou de décoction, comme c'est le cas dans les populations sahariennes, peut créer une intoxication chronique et le théisme qui se manifestent par de l'insomnie, de l'anorexie, de la perte de poids, de la constipation et des troubles nerveux [1].

I.10. Qualité du thé vert

Les facteurs fondamentaux qui influent sur la qualité du thé sont :

- Sélection d'une bonne plante (variété Sinensis).
- Lieu et climat (climat extrême, altitude « high grown tea », ample exposition solaire, pluies fréquentes, pas de sols à humidité stagnante, qualité du sol).
- Le rythme de la croissance de la plante.
- Label d'agriculture biodynamique (pas de produit chimique depuis plus de 15 ans).
- Pas de pollution radioactive.
- Une récolte et un processus de transformation rapides et respectueux (récolte à la main dans certain cas).
- Un emballage 100 % étanche et opaque.
- Fraicheur du thé (pour le Shinya transporté par avion).
- Pureté du thé et confiance dans le producteur (mélange avec des qualités inférieures pour augmenter le volume).

Les facteurs cités ci-dessus permettent principalement de distinguer les éventuelles qualités médicinales recherchées dans le thé. En termes de saveur et de prix, il y a encore d'autres facteurs à prendre en compte :

- Maturité et amertume de la cueillette (bourgeon et jeune pousses).
- Première, deuxième, troisième, ou quatrième récolte de la saison.
- Le thé d'ombre est significativement plus coûteux [1].

Chapitre II

Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

II.1. Introduction

La chromatographie est un ensemble de procédés, applicables à des mélanges moléculaires ou ioniques, basés sur des différences de distribution des solutés entre une phase stationnaire, généralement dispersée, et une phase mobile continue, les deux phases étant mises en contact intime et à contre-courant. Il existe trois principaux types de chromatographie :

- La chromatographie en phase gazeuse (CPG).
- La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).
- La chromatographie en couche mince (CCM).

La Chromatographie Liquide Haute Performance ou Haute Pression (HPLC) est une amélioration technologique de la chromatographie liquide [16].

II.2. La théorie de la chromatographie en phase liquide

II.2.1. Définition

La chromatographie permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification. La chromatographie en phase liquide a permis de réaliser des analyses qui n'étaient auparavant pas possible avec les techniques sur couche mince ou en phase gazeuse.

A l'origine la chromatographie en phase liquide se faisait sur des colonnes en verre. Le liquide traversait la phase stationnaire par gravité ou sous faible pression. Puis pour augmenter le débit, des manipulations ont été réalisées sous pression plus forte. C'est ce que l'on a appelé la chromatographie liquide sous haute pression (HPLC). Très rapidement le P de pression est devenu le P de performance lorsque l'on a optimisé la technique (diminution de la taille de particules de la phase stationnaire c'est-à-dire la régularité de cette phase) [5].

II.2.2. Principe

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme [5].

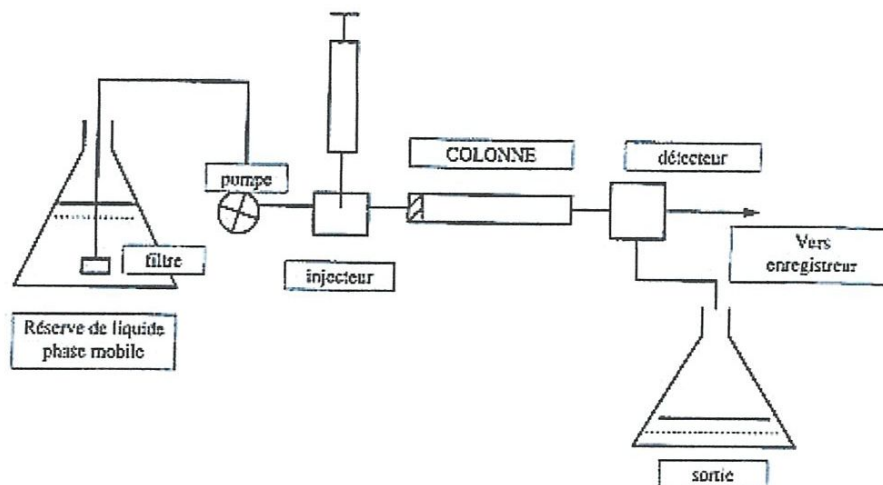


Figure II.1 : Principe de fonctionnement HPLC [4].

II.2.3. Les différents modes de séparation

Il existe différents modes de séparation en chromatographie en phase liquide :

- l'adsorption.
- le partage (80 % des séparations).
- l'échange d'ions.
- l'exclusion.

Les trois premiers types utilisent la polarité des solutés pour les séparer [6].

II.2.3.1. La chromatographie d'adsorption

La chromatographie d'adsorption met en œuvre des phases stationnaires ayant des propriétés adsorbantes, principalement les gels de silice poreuse et les gels d'alumine. On parle aussi de chromatographie liquide-solide. La chromatographie liquide d'adsorption s'applique surtout à la séparation des composés organiques relativement non polaires, insolubles dans l'eau et dont les masses molaires sont inférieures à environ 5000 g mol^{-1} . Sur ces phases, les molécules polaires sont souvent adsorbées de façon irréversible.

Cette technique est utilisée essentiellement pour fractionner les mélanges de composés présentant des groupements fonctionnels différents et des isomères de position tels que les dérivés du benzène substitués en méta et en para [6].

II.2.3.2. La chromatographie de partage

C'est la technique chromatographique la plus utilisée de toutes les méthodes chromatographiques en phase liquide. Elle met en œuvre des phases stationnaires greffées. La séparation des solutés dépend des différences de solubilité des solutés dans la phase mobile, et des différentes interactions des solutés avec la phase stationnaire (force de Van der Waals, forces électrostatiques). La phase stationnaire est un liquide immobilisé par greffage sur gel de silice. La phase mobile est un liquide dont les interactions avec la phase stationnaire doivent être faibles, ce qui est obtenu lorsque leurs polarités sont différentes [6].

II.2.3.3. La chromatographie d'échange d'ions

La phase stationnaire est un échangeur d'ions constitué par une résine porteuse de groupements ionisés négativement ou positivement exerçant des interactions de type électrostatique avec les solutés ioniques du milieu [16].

II.2.3.4. La chromatographie d'exclusion

Elle est encore appelée chromatographie d'exclusion-diffusion, tamisage moléculaire, gel-filtration, permutation de gel. La phase stationnaire est un solide poreux : les grosses particules sont exclues de la phase fixe, en revanche les petites particules incluses diffusent dans les pores du gel [16].

II.2.4. Polarité et chromatographie

II.2.4.1. Polarité d'une molécule

La polarité d'une molécule est une notion intrinsèque. Certaines molécules étant dissymétriques, les électrons ne sont pas uniformément répartis autour d'elles. De ce fait il existe un moment dipolaire permanent qui crée un champ électrique local. Ces molécules sont dites polaires [5].

II.2.4.2. Interactions entre molécules [5]

Dans la nature, les molécules ne sont pas isolées. Entre elles il existe différents types d'interactions :

- Les interactions diélectriques ou ioniques ;
- Les liaisons " hydrogène " ;
- Les forces de Van Der Waals.

II.2.4.3. Notion de polarisabilité

Sur certaines molécules isolées qui ne possèdent pas de moment dipolaire permanent, un champ électrique peut créer un champ dipolaire induit, en déformant les orbitales électroniques ou en modifiant la position relative des atomes. Ces molécules sont dites polarisables [5].

II.2.4.4. Application à la chromatographie

Il existe des échelles de polarité, mais de manière on utilise la notion de polarité comme une donnée comparative entre molécules. On dit que tel composé est plus polaire ou moins polaire qu'un autre. De même on dit que la phase mobile et la phase stationnaire sont polaires, peu polaires ou apolaires.

Pour qu'il y ait séparation chromatographique de composés, il faut que leurs molécules interagissent de manières différentes avec au moins une des phases (stationnaire et mobile). Ces phases doivent avoir des polarités différentes. On peut appliquer la règle "qui se ressemble s'assemble" à l'ensemble soluté - phase stationnaire [5].

- Si la phase stationnaire est polaire, les composés polaires seront plus retenus que les composés non polaires.
- Si la phase stationnaire est apolaire, les composés apolaires seront plus retenus que les composés polaires.

✓ *Polarité de phase*

A l'origine, les colonnes étaient remplies de silice (phase stationnaire polaire). Pour que la séparation soit efficace, la phase mobile doit alors être peu polaire. L'ensemble "phase stationnaire polaire et phase mobile peu polaire" forme la chromatographie à polarité de phase normale.

Par la suite, les particules de silice (support) ont été enrobées de paraffine en C 18 pour faire une phase apolaire. Dans ce cas, pour que la séparation soit efficace, la phase mobile est polaire (généralement à base d'eau). L'ensemble "phase stationnaire apolaire et phase mobile polaire" forme la chromatographie à polarité de phase inversée [5].

✓ *Composition de la phase mobile*

Dans la pratique, chaque séparation nécessite une polarité de la phase mobile qui lui est propre. Chaque solvant ayant une polarité donnée, on ajuste la polarité globale de la phase mobile en mélangeant plusieurs solvants miscibles. A cette composition de phase mobile correspond une force éluante qui caractérise le pouvoir d'entraîner les solutés.

Il faut ajuster la force éluante en fonction des solutés à séparer. Pour cela, on peut utiliser un solvant pur ou un mélange de solvants : on dit travailler en mode isocratique. Dans certains cas il est utile de faire varier la force éluante au cours de l'analyse. Si le mélange de différents solvants varie au cours de la séparation, on réalise alors un gradient d'éluant, car la meilleure force éluante pour le début de l'analyse n'est pas forcément adaptée pour une bonne séparation des solutés sortant en fin de chromatogramme. Ces 2 modes sont utilisés pour des analyses en chromatographie à polarité de phase normale ou inversée [5].

II.2.5. Notions fondamentales

II.2.5.1. Phases mobile et stationnaire

La phase stationnaire est un support plus ou moins poreux recouvert d'un gel (liquide greffé) qui a les propriétés désirées pour retenir les molécules de solutés. La phase mobile ou éluant est un liquide qui entraîne les solutés à travers la colonne [5].

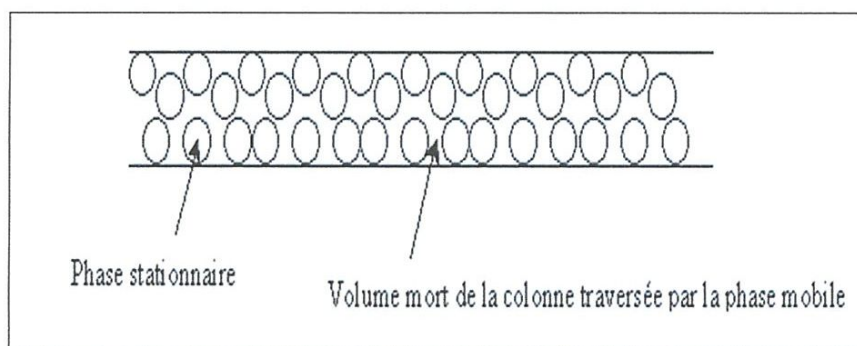


Figure II.2 : La phase stationnaire et la phase mobile [5].

II.2.5.2. Notion de temps [5]

En chromatographie, le temps est un paramètre important pour l'analyse qualitative d'un mélange de différents solutés.

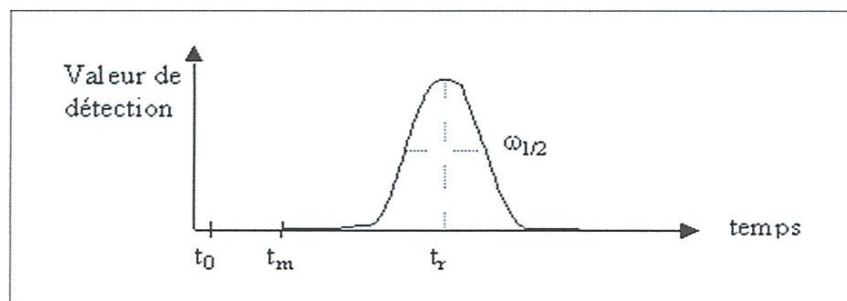


Figure II.3 : La valeur de détection en fonction du temps avec un seul pic [5].

- t_0 est le temps du début de l'injection.
- t_m (le temps mort) qui est le temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire pour traverser la colonne (temps passé dans la phase mobile).
- t_r (le temps de rétention) est le temps mis par un soluté pour traverser la colonne. C'est le temps passé dans la phase stationnaire et dans le volume mort de la colonne. Ce temps est caractéristique d'un soluté dans des conditions d'analyse donnée. La surface du pic est fonction de la quantité du constituant étudié.
- Le temps de rétention réduit t'_r est le temps passé par un soluté dans la phase stationnaire, soit :

$$t'_r = t_r - t_m \quad (\text{II.1})$$

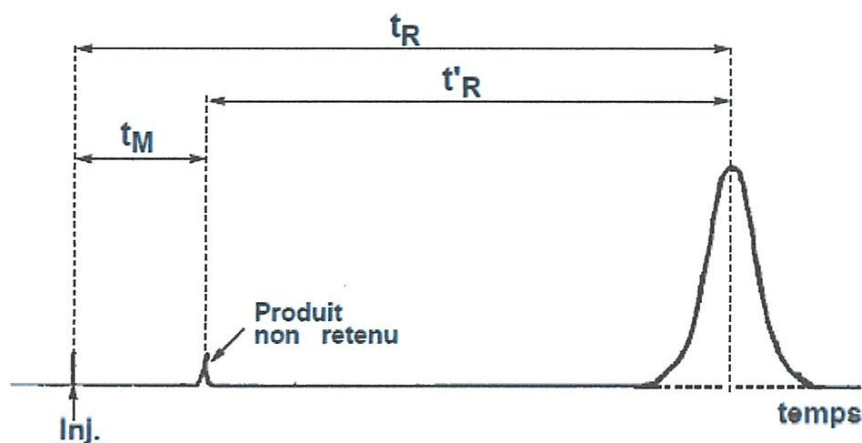


Figure II.4 : Types de temps pour un pic chromatographique [5].

II.2.5.3. Notion de concentration

- **Le coefficient de partage K**

A un instant donné, le soluté est à la concentration C_m dans la phase mobile et C_s dans la phase stationnaire. Leur rapport à l'équilibre est appelé coefficient de partage K [5].

$$K = C_s / C_m \quad (\text{II.2})$$

Ce coefficient est fonction de 2 types d'affinités :

- Celle entre le soluté et la phase mobile.

- Celle entre le soluté et la phase stationnaire.

➤ **Le facteur de capacité K'**

Le facteur de capacité K' est le rapport de la quantité d'un soluté dans la phase stationnaire et dans la phase mobile.

$$K' = \frac{C_s \times V_s}{C_m \times V_m} = K \times \frac{V_s}{V_m} \quad (\text{II.3})$$

V_s : volume de la phase stationnaire.

V_m : volume de la phase mobile ou volume mort.

K' est aussi le rapport du temps passé par un soluté dans la phase stationnaire sur le temps passé par ce même soluté dans la phase mobile [5].

$$K' = \frac{t_r - t_m}{t_m} \quad (\text{II.4})$$

II.2.5.4. Notion d'efficacité [5]

La largeur d'un pic est caractéristique de l'efficacité de la séparation : plus le pic est fin plus la chromatographie est efficace. L'efficacité est mesurée par :

- **Le nombre de plateaux théoriques N_{th}**

$$N_{th} = 5,54 \left[\frac{t_r}{\omega_{1/2}} \right]^2 \quad (\text{II.5})$$

t_r : temps de rétention.

$\omega_{1/2}$: largeur du pic à mi-hauteur.

- **La hauteur équivalente à un plateau théorique : HEPT**, qui est défini comme :

$$\text{HEPT} = \frac{L}{N_{th}} \quad (\text{II.6})$$

L : Longueur de la colonne.

N_{th} : Nombre de plateaux théoriques [5].

II.2.5.5. Qualité de la séparation [6]

Supposons un mélange liquide de deux constituants, analysé par chromatographie liquide. Le schéma ci-dessous représente le chromatogramme correspondant :

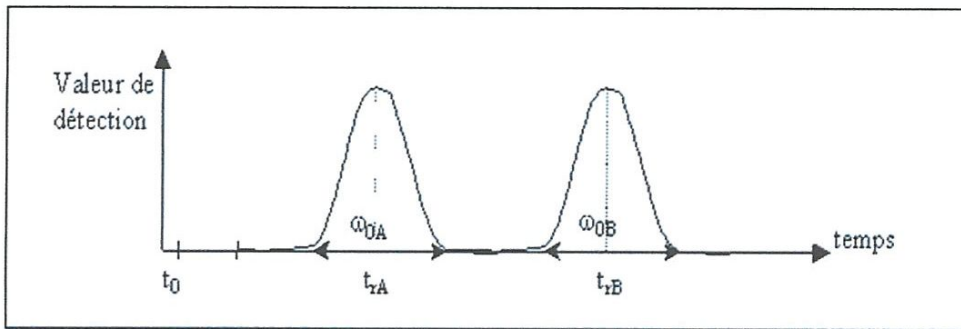


Figure II.5 : La valeur de détection en fonction du temps avec deux pics [6].

- **La sélectivité (α)**

Elle est définie comme le rapport des temps de rétention réduits. α est toujours > 1 car on choisit $t'_{rB} > t'_{rA}$.

A et B : Solutés dans le mélange à analyser [6].

$$\alpha = \frac{t'_{rB}}{t'_{rA}} \tag{II.7}$$

- **La résolution (R)**

Elle quantifie la qualité de la séparation en caractérisant le fait qu'il y ait ou non chevauchement de 2 pics contigus.

$$R = \frac{(t'_{rB} - t'_{rA})}{(\omega_{0B} + \omega_{0A})} \tag{II.8}$$

ω_{0A} et ω_{0B} sont les largeurs des pics des composés A et B respectivement.

$R < 1$: mauvaise résolution.

$1 < R < 1,4$: résolution acceptable.

$1,4 < R < 1,6$: résolution optimale.

$R > 1,6$: résolution trop bonne car le temps d'analyse est allongé [6].

II.3. Appareillage

En raison de sa polyvalence et du vaste domaine de ses applications, la chromatographie liquide haute performance (CLHP ou HPLC) est actuellement la plus utilisée de toutes les techniques de séparation. Le champ d'application de ce type de chromatographie recouvre une grande partie du domaine de la chromatographie en phase gazeuse auquel s'ajoute l'analyse :

- Des composés thermosensibles ;
- des composés très polaires ;
- ainsi que des composés de masses molaires élevées.

Un appareil d'HPLC comprend différents modules : un réservoir à solvant contenant la phase mobile, un système de pompage permettant d'effectuer des éluions graduées, un injecteur, une colonne, un détecteur et un système d'acquisition de données [6].

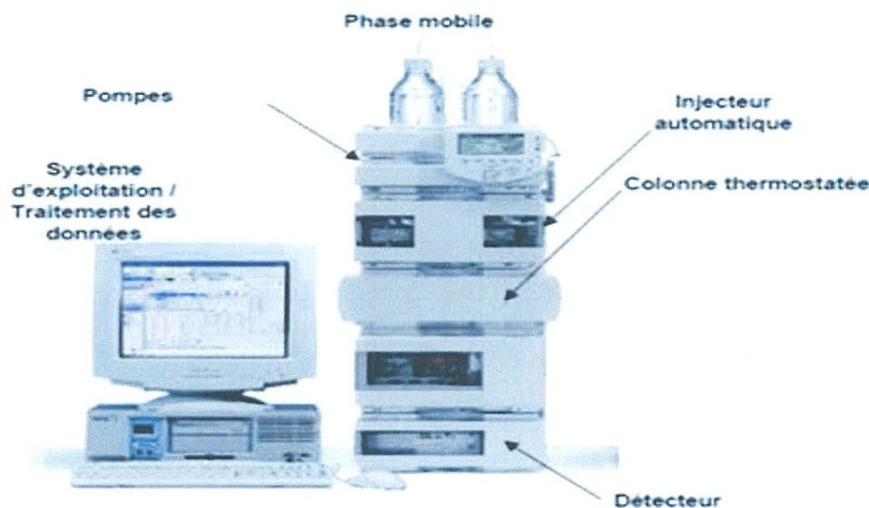


Figure II.6 : Les organes d'une chaîne HPLC [8].

II.3.1. Réservoir de la phase mobile (solvant)

Le plus souvent ce réservoir est une bouteille en verre dans lequel plonge un tube avec une extrémité filtrante en téflon. Le dégazage de la phase mobile (solvants) est indispensable avant de commencer une analyse par HPLC [6].

II.3.2. Pompe

Elle délivre en continu la phase mobile. Elle est définie par la pression qu'elle permet d'atteindre dans la colonne, son débit, et la stabilité du flux [6].

II.3.3. Injecteur

Le type d'injecteur le plus couramment utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe (10, 20, 50 μL ...). Cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne.

➤ *Vanne à boucle d'échantillonnage*

Elle possède 2 positions. La première permet le remplissage de la boucle d'injection de volume fixe (load), la seconde permet la mise en circulation de l'échantillon dans le système chromatographique (inject).

Le remplissage de la boucle d'injection se fait à l'aide d'une seringue. Actuellement, les appareils pour HPLC sont munis des auto échantillonneurs et injecteurs, le volume injecté est programmé [6].

II.3.4. Colonne

En mode analytique, les colonnes en inox ont généralement un diamètre interne inférieur ou égal à 4,6 mm. La longueur est de 5, 10, 15, ou 25 cm. Le remplissage (en silice, silice greffée ou particules polymériques) a une granulométrie de 3, 5, ou 10 μm ou même moins. Si des substances pures doivent être collectées en fin de chromatogramme des colonnes de gros diamètre seront nécessaires [6].



Figure II.7 : Quelques types de colonnes pour HPLC [6].

II.3.5. Détecteur

Le détecteur suit en continu l'apparition des solutés. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps. Généralement, on compare le signal obtenu pour la phase mobile et le soluté à celui de la phase mobile seule. Le détecteur le plus utilisé en HPLC est un spectrophotomètre d'absorption UV-visible (190-600 nm) relié à la sortie de colonne.

Il existe d'autres détecteurs :

- Réfractomètre différentiel.
- UV à barrette de diodes.
- Electrochimique.
- Fluorimétrie.

Ainsi, il existe aussi différents types de couplage:

- Spectrométrie infrarouge.
- Spectrométrie de masse.
- Résonance magnétique nucléaire [6].

II.3.6. Intégrateur

La chromatographie est une méthode de séparation utilisée en vue d'un dosage. Il faut donc avant tout chercher à séparer correctement les pics avant de les intégrer. Une intégration consiste à mesurer la surface sous un pic. La détection d'un pic chromatographique par l'intégrateur, dépend de 2 paramètres :

- ✓ La largeur attendue des pics.
- ✓ Le seuil d'intégration (sensibilité).

La largeur de pic est à peu près prévisible en fonctions de la technique d'analyse et des conditions opératoires. Elle détermine la fréquence d'échantillonnage du signal. Le pic est alors découpé en tranches. Le seuil d'intégration est la valeur du signal à partir de laquelle le calculateur repère un début de pic.

II.4. Conclusion

A partir des informations exposées dans ce chapitre, on peut conclure que :

- La chromatographie de partage est la plus usuelle et permet la mise en œuvre de deux types de phase stationnaire :
 - Une phase stationnaire normale (polaire) : qui nécessite l'utilisation d'une phase mobile peu polaire (hydrocarbures).
 - Une phase stationnaire inverse ou greffée (non polaire) : qui nécessite l'utilisation d'une phase mobile polaire (mélanges : eau-méthanol ; eau-acétonitrile ; eau-tétrahydrofuranne).
- Dans tout appareil de chromatographie liquide à haute performance, on retrouvera toujours les éléments de base suivant : réservoir de la phase mobile, pompe, injecteur, colonne, détecteur et intégrateur.

Chapitre III
Matériels et méthodes

III.1. Introduction

Nous présenterons dans ce qui suit : le matériel, les réactifs, les modes opératoires et la méthode analytique mise en œuvre pour le dosage des méthylxantines ; en l'occurrence la caféine, la théobromine et la théophylline dans le thé vert vendu dans le marché Algérien.

III.2. Matériel

Dans ce travail, différents matériels et appareils ont été utilisés dont les plus importants :

- Verrerie usuelle de laboratoire.
- Agitateur magnétique.
- Balance technique.
- Évaporateur sous pression réduite (Laborota – 4000)
- Lyophilisateur (Alpha 1-2 LD plus).
- Bac à ultrasons (Nahita ultrason cleaner).
- Centrifugeuse (EBA III Pehich).
- HPLC-DAD du type Agilent, série 1260 Infinity.

III.3. Solvants et réactifs

Tous les solvants que nous avons utilisés en chromatographie sont de grade HPLC. Le méthanol, l'acide formique, la caféine, la théobromine et la théophylline ont été achetés auprès de Sigma Aldrich (Sigma, Allemagne). Les molécules standards sont d'une pureté supérieure à 99 %. L'eau a été bidistillée et filtrée deux fois.

III.4. Appareillage

III.4.1. Lyophilisateur

- **Principe de fonctionnement**

La lyophilisation est une méthode de dessiccation sous vide, à basse température, de produits liquides préalablement congelés, par passage à la phase vapeur, sans passer par la phase liquide. Ce changement d'état s'appelle la sublimation [9].

- **Les étapes du processus de lyophilisation**

- a) **Congélation**

La première étape consiste à congeler les aliments pour que l'eau qu'ils contiennent soit transformée en glace. La température doit rester plus basse que $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ tout au long du processus de lyophilisation [9].

b) Lyophilisation primaire

Elle doit se dérouler sans décongeler le produit avec une pression partielle inférieure à la tension de vapeur de la glace (conditionnée par la température). Plus cette température sera basse et plus le vide devra être bas [9].

c) Lyophilisation secondaire

Destiné à éliminer les dernières traces d'eau retenues par absorption ou pour assurer une quantité d'eau résiduelle la plus faible possible.

La chauffe ne doit pas conduire à la destruction partielle ou totale par dénaturation du produit [9].



Figure III.1 : Lyophilisateur Alpha 1-2 LD plus (Laboratoire de Chimie Appliquée, Université de Guelma).

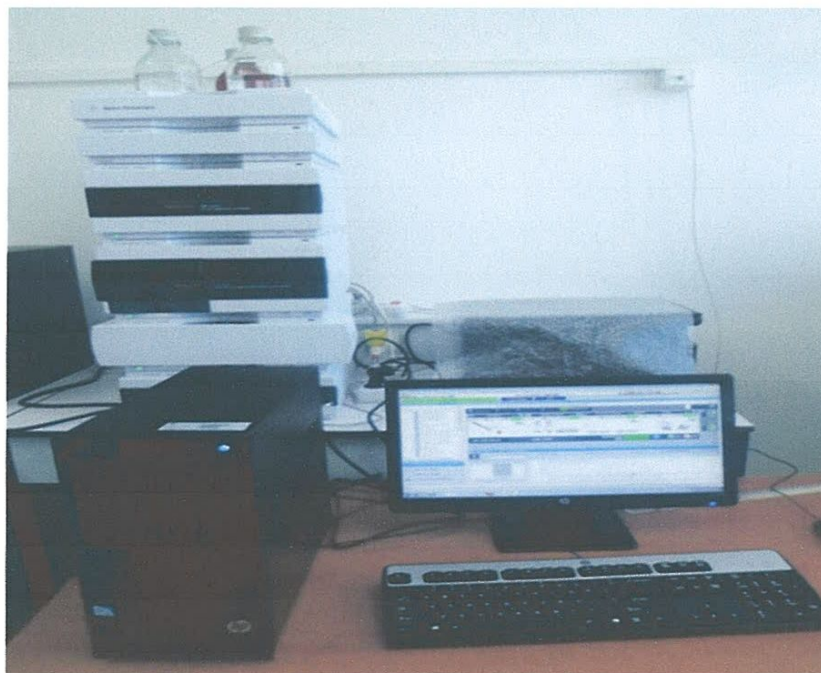
• Caractéristiques

- Performance 2 kg de glace par 24 h.
- Piège -55 °C en acier inox 316, volume 2,5 kg de glace.
- Affichage numérique température condenseur et pression.
- Contrôleur de vide et microvanne pour casser le vide.
- Chambre transparente avec 8 embouts pour robinets.
- Kit de tubulure pour raccordement DN16 pour pompe à vide livrée avec 8 flacons Pour lyophilisation sur manifold ayant :

- Un volume 75 ml.
- Un col large 49 mm.
- Filtre retenant le lyophilisat.
- Stérilisable à 121 °C.
- Diamètre 60 mm.
- Hauteur 87 mm.
- Poids 130 g.

III.4.2. Chromatographie liquide à haute performance (Agilent, série 1260 Infinity)

Un appareil HPLC-DAD de type Agilent, série 1260 Infinity (**Figure III.2**) est muni d'un réservoir contenant la phase mobile, d'une pompe quaternaire, d'un dégazeur (G1354A), d'un auto-échantillonneur (G1313A), d'un compartiment de colonne thermostatée (G1316A) et d'un détecteur à barrette de photodiodes (G1315B). La colonne de type C18 à silice greffée. Les données ont été analysées en utilisant le logiciel de chromatographie ChemStation. Les appareils à barrette de diodes donnent la lecture simultanée des intensités lumineuses sur tout le spectre et permettent l'obtention de chromatogrammes en trois dimensions.



*Figure III.2 : HPLC (Agilent 1260) utilisé pour le dosage des méthylxantines de thé vert.
(Laboratoire de Chimie Appliquée, Université de Guelma).*

III.6. Echantillons de thés

Des marques différentes de thés verts ont été achetées du marché local dans la ville de Guelma et utilisées dans cette étude (Figure III.4).



Figure III.4 : Echantillons des thés verts étudiés.

Tableau III.2 : Caractéristiques organoleptiques des échantillons de thé vert [1].

Thé	Origine	Couleur	Forme
E1	Chine	Vert clair	Oblongue
E2	Chine	Vert très foncé	Oblongue
E3	Chine	Vert clair	Oblongue + courbée + petits grains
E4	Chine	Vert foncé	Oblongue + courbée
E5	Chine	Vert foncé	Oblongue + courbée + petits grains
E6	Chine	Vert foncé	Oblongue
E7	Chine	Vert clair	Oblongue + courbée
E8	Chine	Vert très foncé	Oblongue + petits grains

III.7. Méthode de préparation et injection des standards

Le but de cette étape est de construire les courbes d'étalonnage des composés purs (standards) qu'on veut doser, ultérieurement, dans les différents échantillons de thé vert.

La solution mère est préparée à partir de 1mg de chacun des standards purs dans 15 ml de méthanol. Par la suite, des dilutions successives ont été effectuées, selon la nécessité. Les courbes étalons ont, ensuite, été tracées pour chacun des standards.

Des concentrations de : 0,025 mg/ml ; 0,05 mg/ml ; 0,075 mg/ml ; 0,1 mg/ml de chaque solution standard ont été injectées en triplicata dans l'appareil HPLC.

Les courbes étalons sont des droites (tracée en utilisant Microsoft Excel 2016) qui donnent la variation des aires des pics en fonction des concentrations.

La teneur de chaque constituant dosé dans différents échantillons a été calculée en utilisant l'équation de régression de la meilleure ligne d'ajustement.

III.8. Méthodes de préparation et injection des échantillons de thé

III.8.1. Extraction multiple par méthanol/eau

Le protocole expérimental (Figure III.5) utilisé pour l'extraction des composés étudiés à partir des échantillons solides est basé sur les conditions préalablement optimisées par un article publié en 2011 [21].

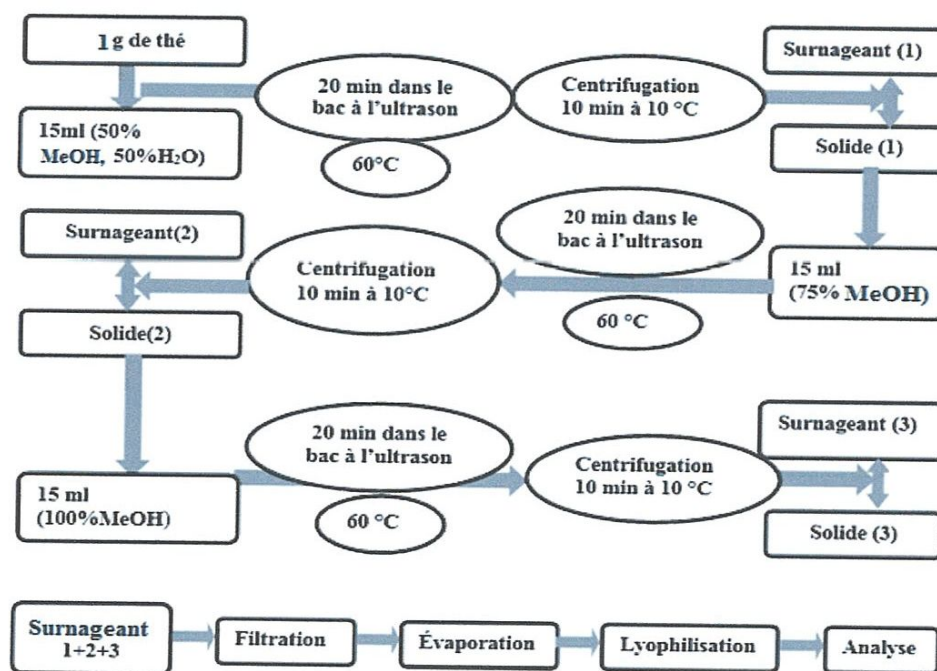


Figure III.5 : Protocole expérimental de l'extraction hydrométhanolique [21].

En bref, la méthode d'extraction multiple a consisté en l'extraction séquentielle avec un volume de 15 ml d'eau bidistillée filtrée deux fois et de méthanol de 1 g de thé, d'abord le

méthanol à 50 %, ensuite à 75 %, et enfin à 100 % en utilisant à chaque fois un bac à ultrasons pendant 20 min à 60 °C. Après chaque étape d'extraction, l'échantillon est centrifugé pendant 10 min, à une température de 10 °C et à raison de 4000 tours par minute à l'aide d'une centrifugeuse. Le surnageant est recueilli, et le solide est soumis à l'étape suivante d'extraction. Après la dernière extraction, les surnageants ont été combinés, et mis en place dans une fiole en complétant avec de l'eau pure jusqu'au volume de 100 ml, l'extrait ainsi obtenu a été filtré, vaporisé à l'aide d'un évaporateur rotatif et lyophilisé pendant deux jours.

Une quantité de 1 mg du produit obtenu a été prélevée et incorporée dans une solution de 10 ml (50 % méthanol, 50 % eau). Un volume de 20 µl de chaque échantillon a été, ensuite, injecté dans l'appareil HPLC [21].

III.8.2. Infusion

Une quantité de 5 g de chaque échantillon de thé a été infusée dans 80 ml d'eau pure et bouillie pendant 5 minutes avec agitation en complétant ensuite les volumes des solutions obtenues jusqu'à 100 ml [1].

Avant de les faire passer au lyophilisateur, les extraits ont été filtrés avec un papier filtre. Une quantité de 1 mg de la masse obtenue par lyophilisation a été dissoute dans 15 ml d'eau pure.

Pour l'analyse par HPLC, des dilutions des solutions ont été effectuées et des volumes de 20 µl ont été injectés en triplicata.

III.9. Calcul des rendements [20]

Les rendements montrent l'efficacité des méthodes d'extraction (infusion et extraction multiple) utilisés dans notre étude. Pour le calcul des rendements, la formule ci-dessous a été appliquée :

$$R = \frac{mf}{mi} \times 100$$

(III.1)

Avec :

mf : masse du produit final (g).

mi : masse du produit initial (g).

R : le rendement

III.10. Dosage par HPLC-UV-DAD des standards dans les échantillons de thé

III.10.1. Conditions de l'analyse

Pour ce dosage, le débit de la phase mobile a été fixé à 1 ml/min. L'extraction des composés a été réalisée à 273 nm la longueur d'onde maximale d'absorption de la caféine, la théobromine et la théophylline.

La séparation a été réalisée en mode gradient et en phase inverse avec un temps d'acquisition de 37 minutes.

III.10.2. Phase mobile

Les solvants de la phase mobile utilisés dans le dosage de la caféine, de la théobromine et de la théophylline sont :

Solvant A : Eau / acide formique (0,5 %).

Solvant B : Méthanol / acide formique (0,5 %).

III.10.3. Phase stationnaire

Le matériau de la phase stationnaire est la silice greffée avec C18. Ce matériau est contenu dans une colonne de marque, Zorbax Eclipse Plus, de longueur 250 mm et de diamètre intérieur de 4,6 mm. Les particules de la phase stationnaire ayant une taille de 5 μm .

III.10.4. Gradient

Après plusieurs essais de séparation pour les différents échantillons de thé, nous avons constaté qu'une bonne séparation est obtenue pour un gradient établi sur 37 min avec un pourcentage initial de 75 % du solvant A (**Tableau III.3**).

**Tableau III.3 : Gradient HPLC pour l'analyse des trois méthylxantines du thé
(La caféine, la théobromine et la théophylline).**

<i>Temps (min)</i>	<i>Composition volumique du solvant A (%)</i>	<i>Composition volumique du solvant B (%)</i>
0	75	25
10	55	45
20	50	50
30	0	100
31	0	100
35	75	25
37	75	25

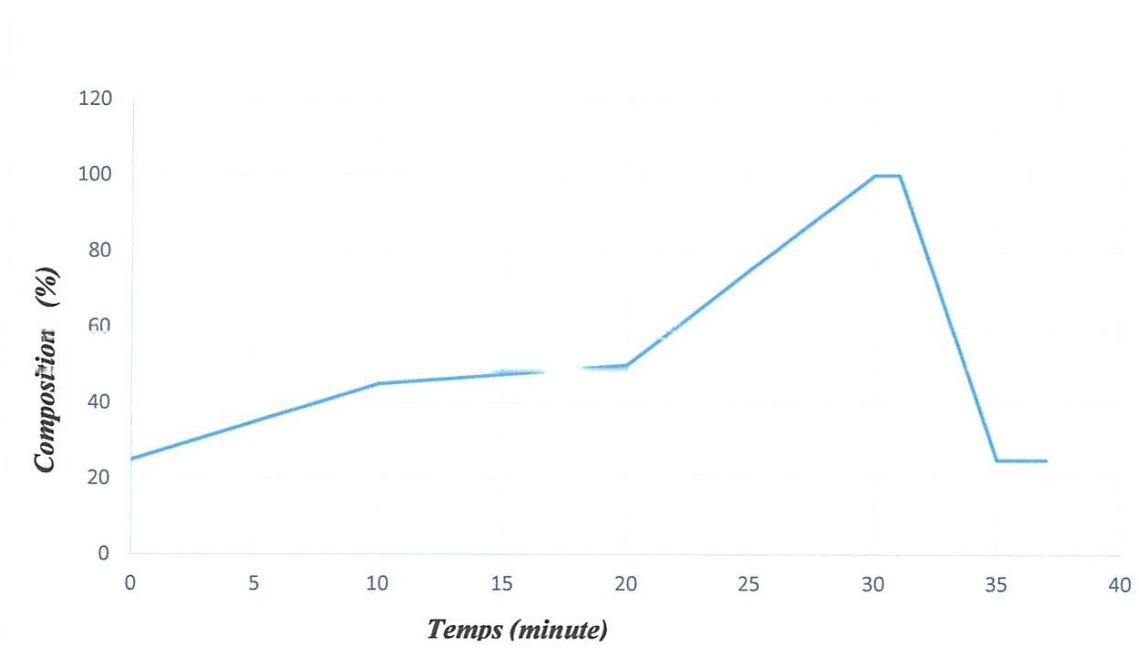


Figure III.6 : Gradient HPLC utilisé.

III.11. Validation de la méthode analytique

III.11.1. Courbes d'étalonnage

Les trois molécules ont été dosées par la méthode du standard externe. La gamme de concentrations injectées était de 0,025 à 0,1 mg/ml. Les courbes d'étalonnage ont été tracées en représentant les aires des pics (Y) par rapport aux concentrations (X, mg/ml) pour quatre concentrations différentes, chaque point étant la valeur moyenne de trois mesures de surface indépendantes.

III.11.2. Détermination des limites de détection et de quantification

La limite de détection (LD) est la plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être détectée. Alors que, la limite de quantification (LQ) est la plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être quantifiée, bien entendu, dans les conditions expérimentales de la colonne.

Les limites de détection (LD) ont été calculées en considérant une valeur égale à trois fois l'écart type des trois essais effectués pour tracer la courbe d'étalonnage, divisée par la pente de la courbe.

Les limites de quantification (LQ) ont été déterminées en tenant compte d'une valeur égale à dix fois l'écart type obtenue, divisée par la pente de la courbe [19].

Les LD et LQ sont déterminés comme suit :

$$LD = 3. \text{ Ecart type/Pente}$$

(III.2)

$$LQ = 10. \text{ Ecart type/Pente}$$

III.11.3. Détermination des taux de récupération [20]

Le pourcentage de récupération permet d'identifier, pour un échantillon donné ou un type de matrice donnée et à un niveau de concentration donné, la présence d'interférence potentielle lors du processus d'analyse.

Le taux de récupération correspond à la différence (en pourcentage) entre la concentration mesurée d'un échantillon enrichi et la concentration mesurée du même échantillon non enrichi, divisée par la concentration de la substance ajoutée.

Afin de déterminer les taux des récupérations des standards, une solution de thé vert préparée par infusion a été enrichie par des quantités connues en standards, puis analysée dans les mêmes conditions. Quatre répétitions sont réalisées par échantillon.

$$\text{Taux de récupération (\%)} = \frac{(C_e - C)}{C_a} \cdot 100$$

(III.3)

Où :

C_e : Concentration mesurée d'un échantillon enrichi.

C : Concentration mesurée d'un échantillon non enrichi.

C_a : Concentration de la substance ajoutée.

III.12. Injection

L'appareil HPLC-UV-DAD analytique est équipé d'un injecteur automatique, les échantillons ont été préparés dans des cupules spéciales et injectés dans la colonne. Le volume d'injection était de 20 μ l. L'appareil HPLC a été programmé pour exécuter une série de trois analyses consécutives.

III.13. Conclusion

Après le détail des matériels et des méthodes mises en œuvre dans ce chapitre, nous pouvons constater que la méthode d'analyse choisie pour notre étude est une méthode simple, efficace et adéquate ; en fait, elle a permis d'identifier et de doser avec une grande précision, la caféine, la théophylline et la théobromine dans le thé vert. Cette méthode a été convenablement validée.

Chapitre IV

Résultats et discussions

IV.1. Introduction

Dans ce chapitre, nous présenterons, les courbes des standards, les chromatogrammes, les rendements d'extraction et les résultats du dosage des échantillons de huit marques de thé vert du marché de la ville de Guelma. Les constituants de thé qui ont été dosés sont : la caféine, la théobromine et la théophylline. La méthode analytique utilisée est : L'HPLC- UV-DAD. Dans ce travail, les marques de thé sont désignées par : E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 et E8.

IV.2. Résultats

IV.2.1. Données chromatographiques des standards

Les figures de (IV.1) à (IV.6) représentent les chromatogrammes par HPLC et les courbes étalons des composés purs dosés, et les tableaux (IV. 1) à (IV. 3) montrent les données pour construire les courbes d'étalonnage.

- Données de la caféine

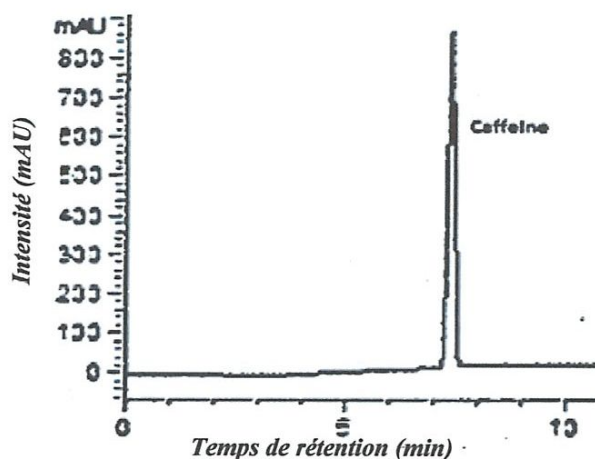


Figure IV.1 : Chromatogramme HPLC de la caféine pur (T_R : 7,335 min, λ : 273 nm).

Tableau IV.1 : Données HPLC pour la caféine.

Concentrations en mg/ml	Aires			Moyenne	Écart type
	1	2	3		
0,025	57793,1	57780,4	57791,7	577884	6,96
0,05	43333,6	43320,1	43333,3	43329	7,70
0,075	28890,5	28888,4	28916	28898,3	15,36
0,1	14430,2	14424,5	14456,6	14437,1	17,12

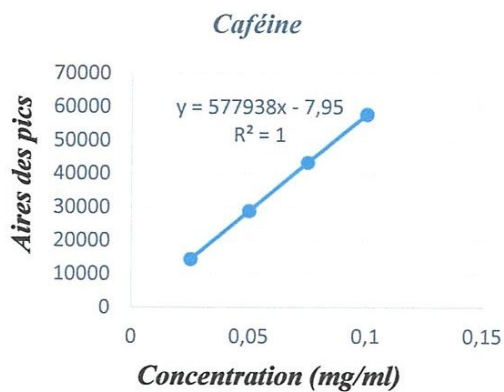


Figure IV.2 : Courbe d'étalonnage de la caféine.

- Données de la théobromine

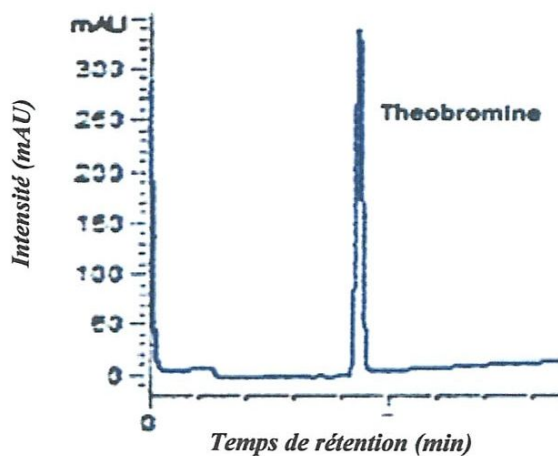


Figure IV.3 : Chromatogramme HPLC de la théobromine pur (T_R : 4,33 min, λ : 273 nm).

Tableau IV.2 : Données HPLC pour la théobromine.

Concentrations en mg/ml	Aires			Moyenne	Écart type
	1	2	3		
0,025	7863,9	7839,2	7840,9	7848	13,79
0,05	5892,8	5889,7	5898,9	5893,8	4,68
0,075	3926,9	3930,2	3918,2	3925,1	6,19
0,1	1959,7	1962	1955,9	1959,2	3,08

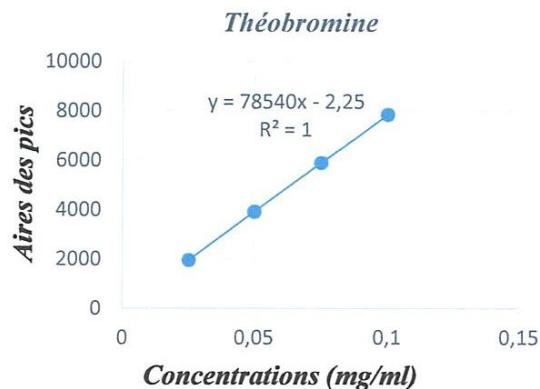


Figure IV.4 : Courbe d'étalonnage de la théobromine.

- Données de la théophylline

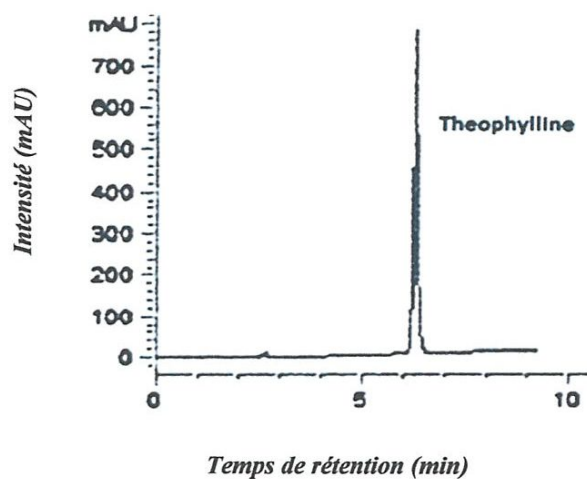


Figure IV.5 : Chromatogramme HPLC de la théophylline pur (T_R : 6,258 min, λ : 273 nm).

Tableau IV.3 : Données HPLC pour la théophylline.

Concentrations en mg/ml	Aires			Moyenne	Écart type
	1	2	3		
0,025	13274,6	13308,1	13317,9	13300,2	22,70
0,05	9962,3	9965,8	9979,2	9969,1	8,92
0,075	6649,3	6652,1	6674,4	6658,6	13,75
0,1	3313,9	3325,2	3321,8	3320,3	5,79

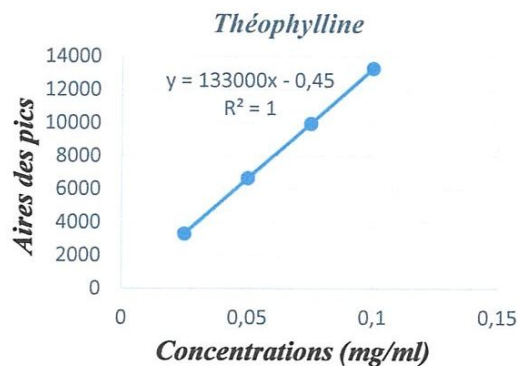


Figure IV.6 : Courbe d'étalonnage de la théophylline.

IV.2.2. Validation de la méthode d'analyse

IV.2.2.1. Linéarité des courbes d'étalonnage et résolution des pics

Comme nous l'avons vu précédemment, les courbes d'étalonnage étaient linéaires et un facteur de régression, ($R^2 = 1$) a été obtenu pour les solutions des composés standards et la résolution des pics était acceptable.

IV.2.2.2. Limites de détection (LD) et de quantification (LQ)

Nous avons calculé pour chaque standard les concentrations détectables et quantifiables dans les échantillons de thés étudiés. Les valeurs estimées et qui sont tout à fait acceptables sont récapitulées dans le tableau ci-dessous.

Tableau IV.4 : Paramètres graphiques de la méthode analytique proposée, T_R : temps de rétention, LD : Limite de détection, LQ : Limite de quantification.

Composé	T_R (min)	LD ($\mu\text{g/ml}$)	LQ ($\mu\text{g/ml}$)
Caféine	7,33	0,13	0,40
Théobromine	6,25	0,05	0,15
Théophylline	4,33	0,36	1,09

IV.2.2.3. Taux de récupération

Les taux de récupération de la méthode ont été évalués par dopage de l'échantillon (E3) de thé vert préparé par infusion avec trois concentrations différentes des standards 0,005 mg/ml, 0,01 mg/ml et 0,02 mg/ml. Les résultats sont rassemblés dans le tableau (IV.5) et représentés par la figure (IV.7).

Tableau IV.5 : Taux de récupération de la méthode analytique à trois niveaux d'enrichissement des différents composés standards. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± SD.

Composé	Concentrations ajoutées (mg/ml)	n	Récupération (%)
Caféine	0,005	4	100,4 ± 2,0
	0,01	4	102,6 ± 2,3
	0,02	4	99,3 ± 1,8
Théophylline	0,005	4	100,3 ± 1,4
	0,01	4	98,2 ± 1,3
	0,02	4	102,6 ± 4,3
Théobromine	0,005	4	99,7 ± 1,1
	0,01	4	99,1 ± 1,1
	0,02	4	97,2 ± 1,8

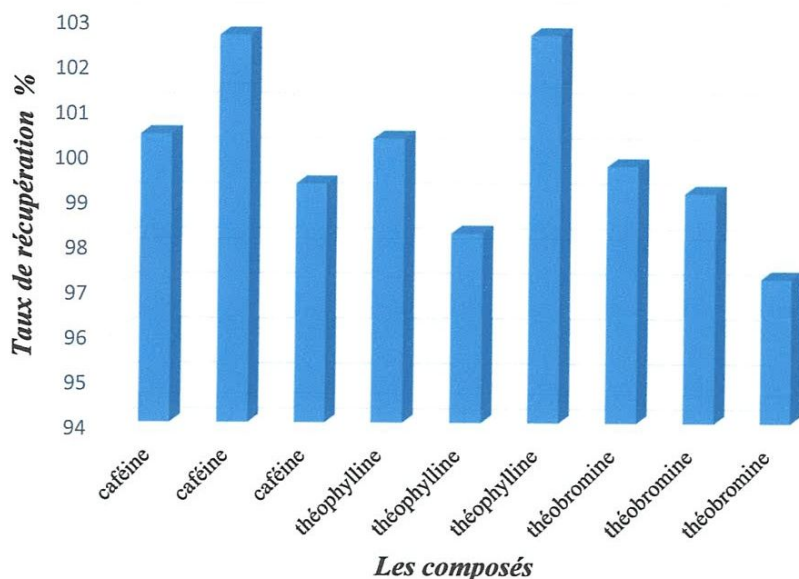


Figure IV.7 : Taux de récupération pour chaque composé, obtenu à partir d'un extrait du thé vert dopé.

Les résultats du dopage réalisé, présentent de très bons rendements. La récupération moyenne est supérieure à 97 % pour toutes les molécules et elle varie de $97 \pm 1,8$ à $102,6 \pm 4,3$ % ; ceci fait apparaître l'efficacité de la méthode utilisée. En effet, les taux de récupération des standards ajoutés aux échantillons testés à des différentes concentrations sont reproductibles, et ont des valeurs très satisfaisantes.

IV.2.3. Présentation des chromatogrammes des échantillons de thé vert

Nous représentons dans les figures (IV. 8) à (IV. 23) les chromatogrammes HPLC des échantillons du thé vert obtenus par infusion pendant 5 minutes et par extraction multiple (MeOH / H₂O).

- Infusion pendant 5 minutes

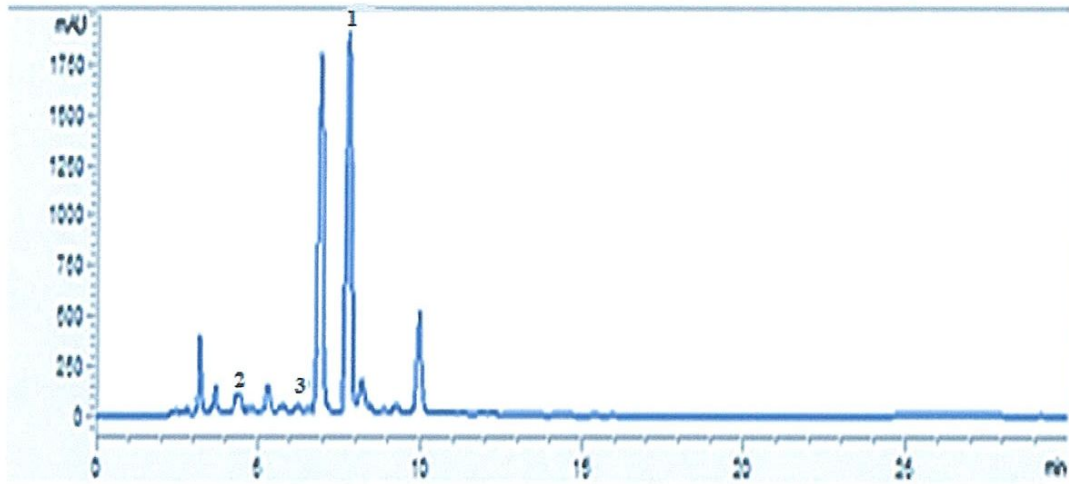


Figure IV.8 : Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E1) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine, pic (3) : Théophylline.

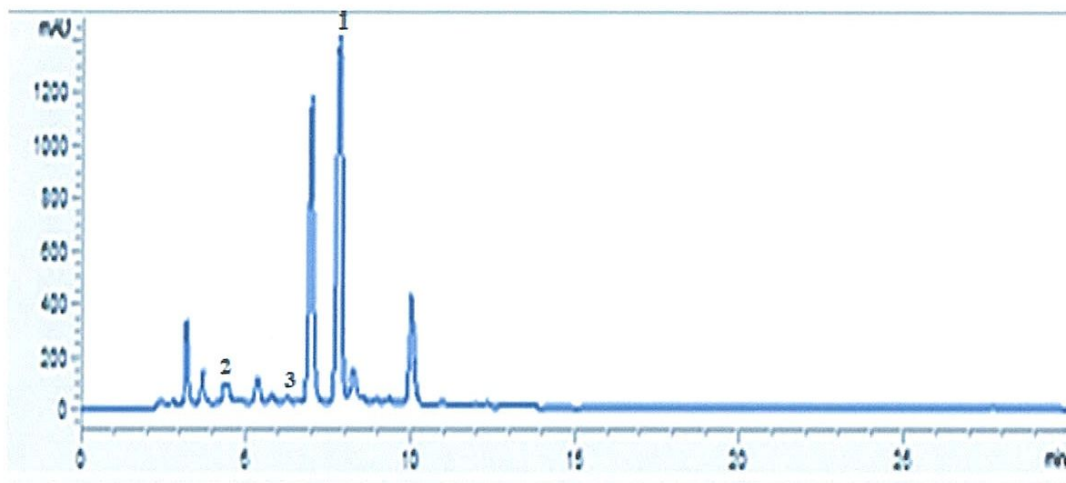


Figure IV.9 : Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E2) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine, pic (3) : Théophylline.

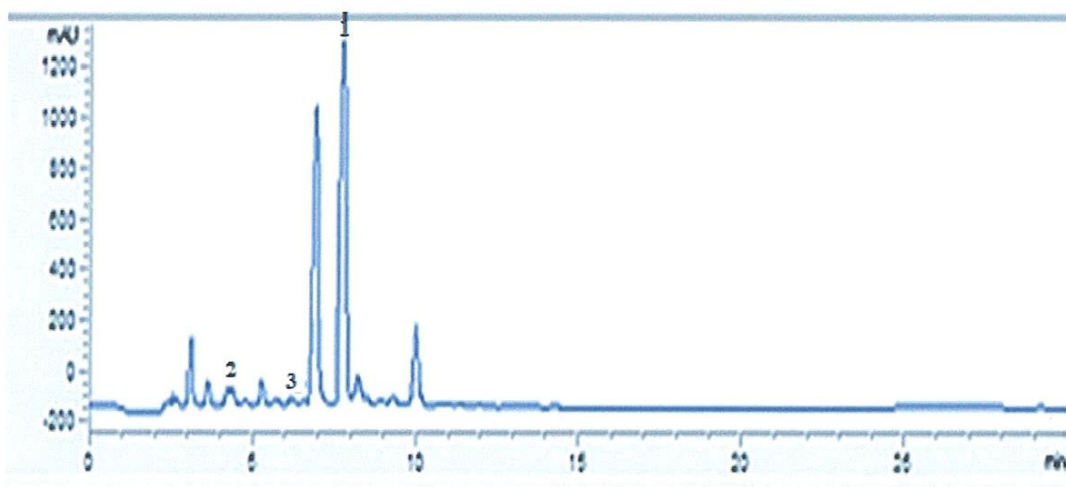


Figure IV.10 : Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E3) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine, pic (3) : Théophylline.

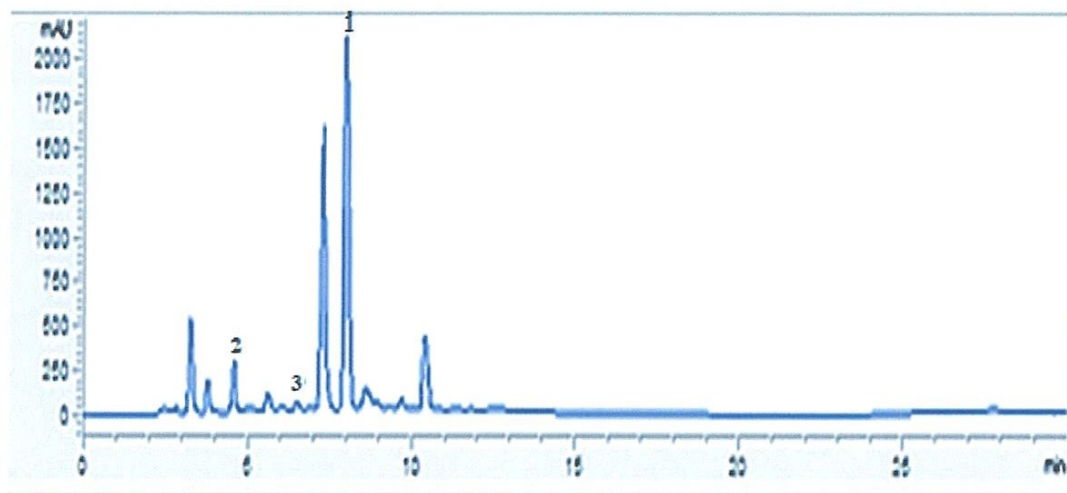


Figure IV.11 : Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E4) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine, pic (3) : Théophylline.

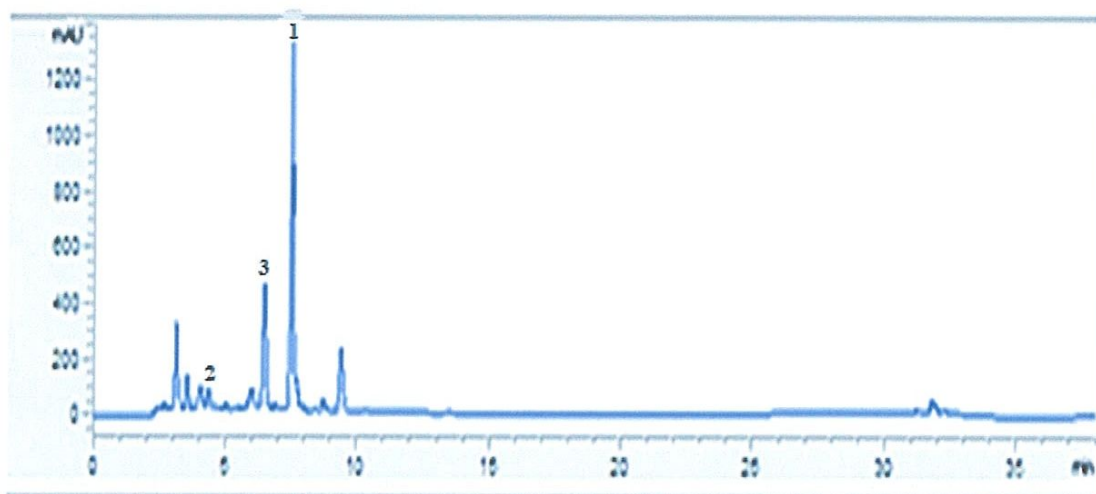


Figure IV.12 : Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E5) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine, pic (3) : Théophylline.

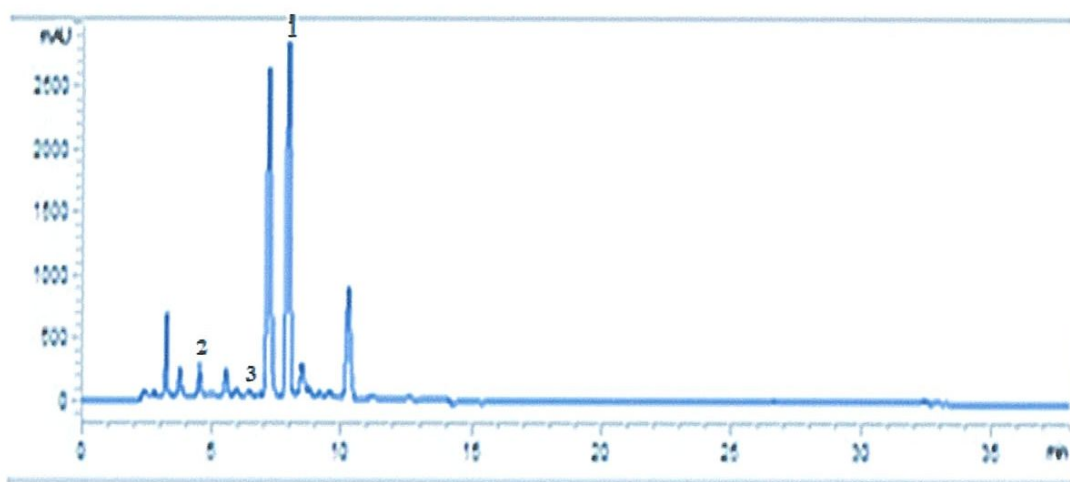


Figure IV.13 : Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E6) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine, pic (3) : Théophylline.

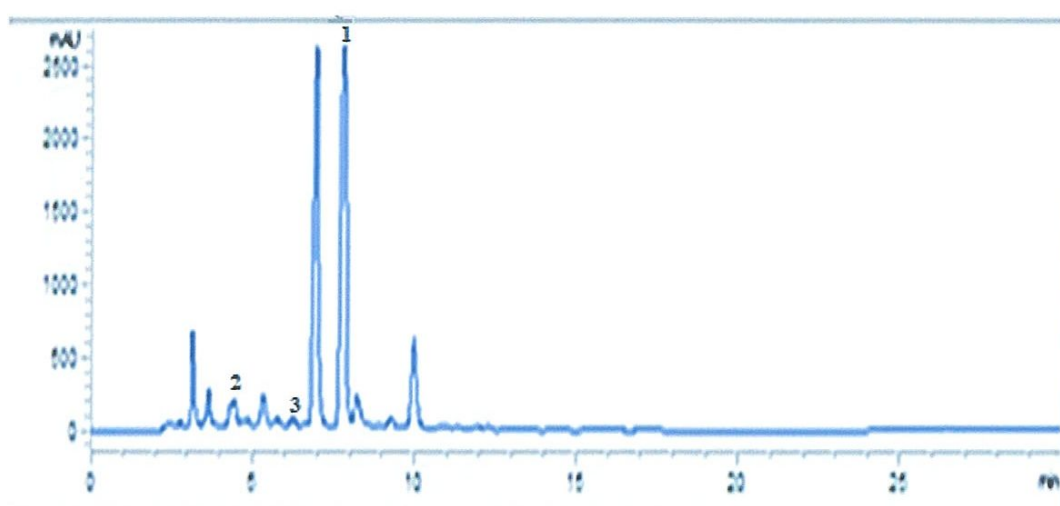


Figure IV.14 : Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E7) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine, pic (3) : Théophylline.

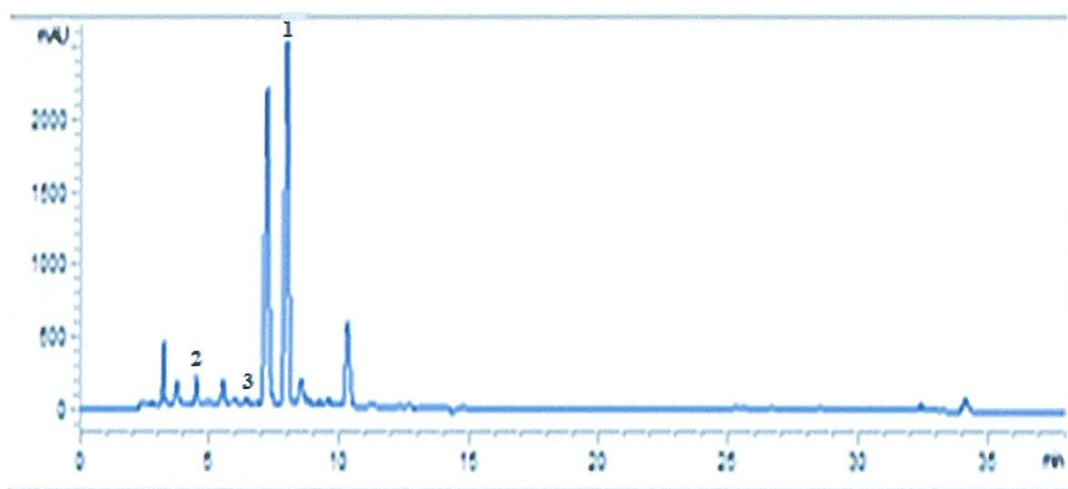


Figure IV.15 : Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E8) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine, pic (3) : Théophylline.

- Extraction hydrométhanolique

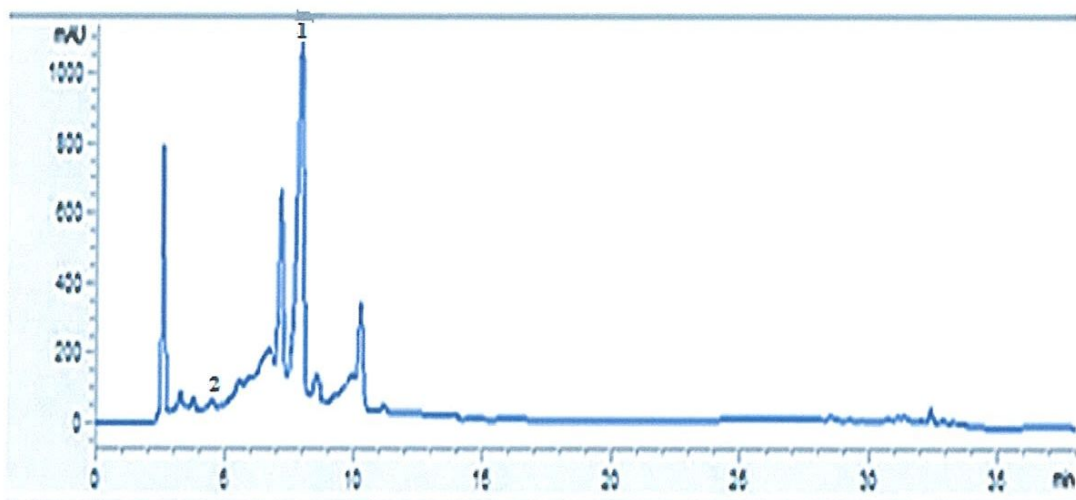


Figure IV.16 : Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E1) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine.

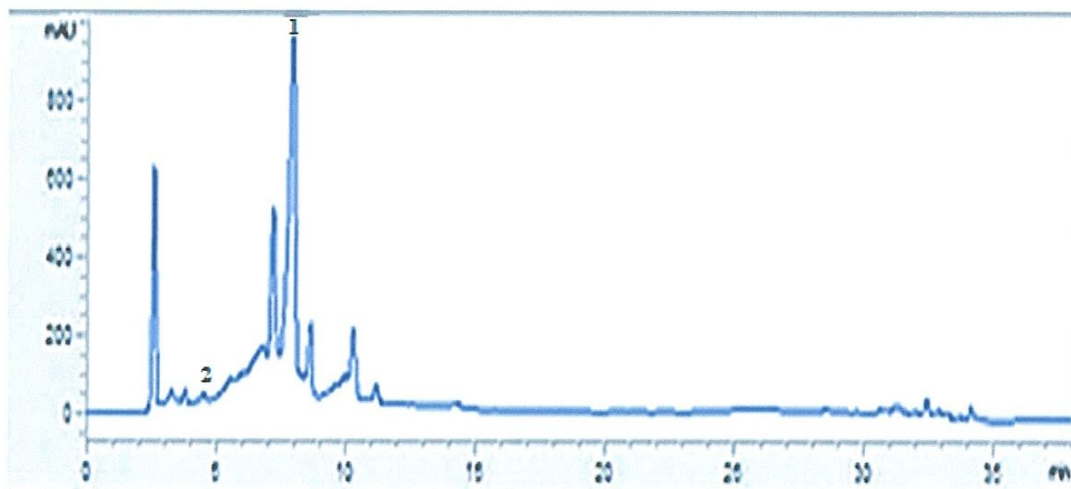


Figure IV.17 : Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E2) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine.

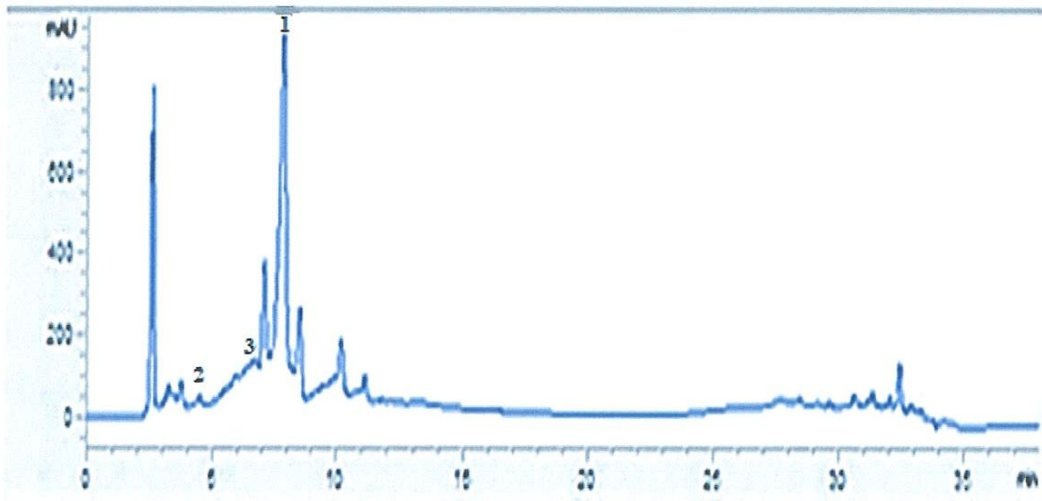


Figure IV.18 : Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E3) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine, pic (3) : Théophylline.

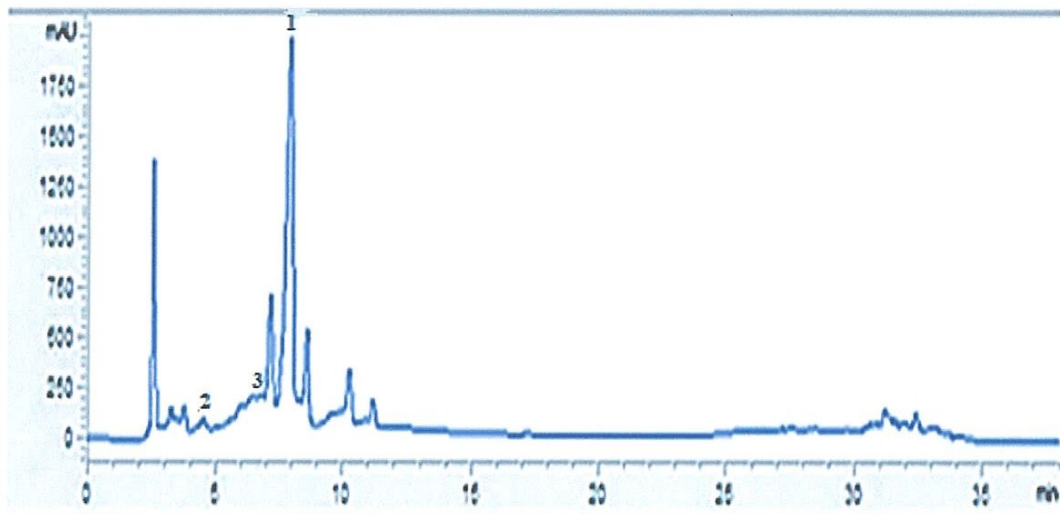


Figure IV.19 : Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E4) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine, pic (3) : Théophylline.

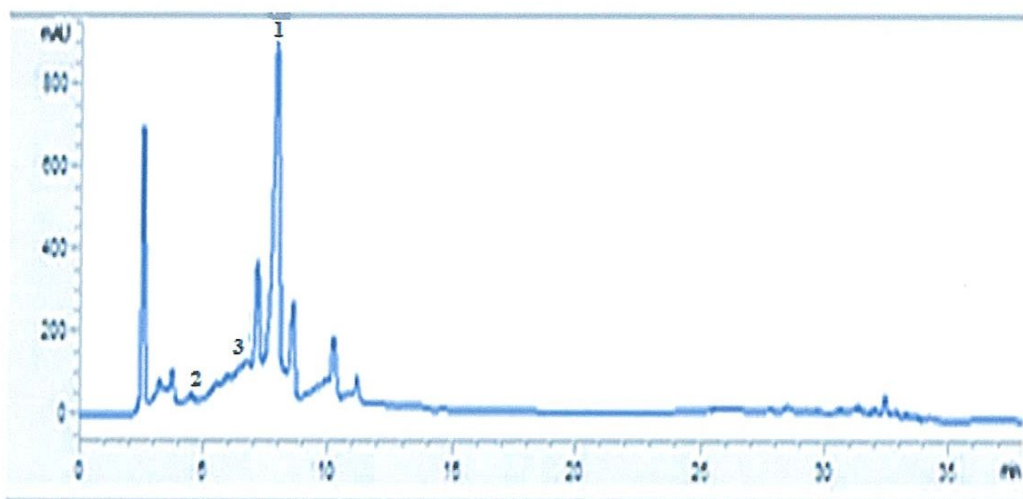


Figure IV.20 : Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E5) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine, pic (3) : Théophylline.

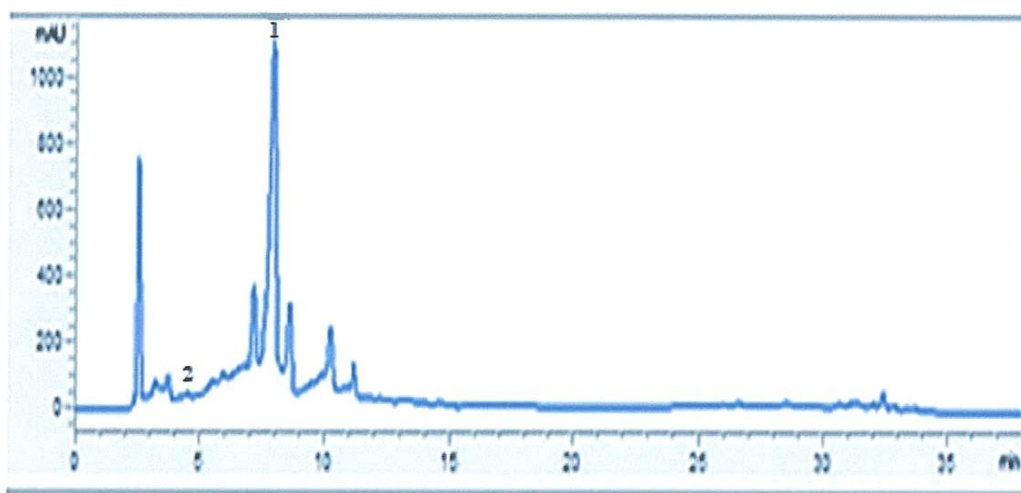


Figure IV.21 : Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E6) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine, pic (3) : Théophylline

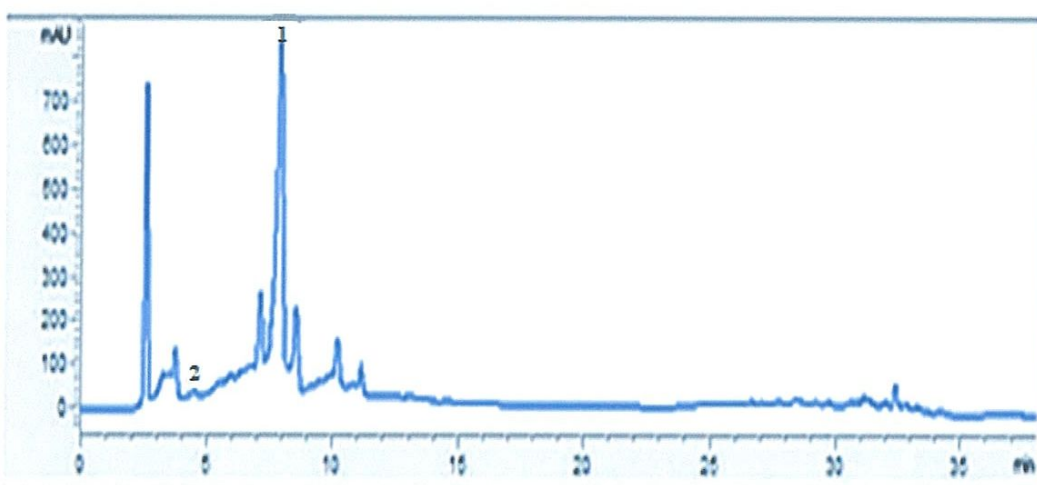


Figure IV.22 : Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E7) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine, pic (3) : Théophylline.

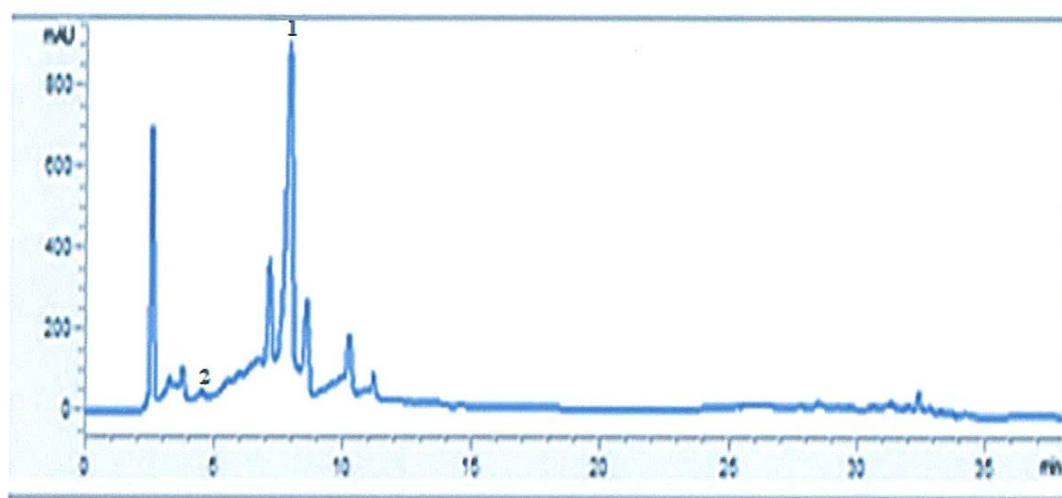


Figure IV.23 : Chromatogramme HPLC de l'échantillon (E8) ; Pic (1) : Caféine, Pic (2) : Théobromine, pic (3) : Théophylline.

IV.2.4. Concentrations des méthylxantines étudiés dans les différents échantillons de thé

Les concentrations de la caféine, de la théobromine et de la théophylline ont été déterminées par HPLC-UV-DAD pour les différentes marques de thé vert et la séparation des composés a été réalisée en 37 minutes.

Les concentrations en mg. g⁻¹ (PS) des composés analysés sont résumées dans le tableau (IV.6) pour l'extraction hydrométhanolique et l'infusion.

Tableau IV.6 : Concentrations des méthylxantines dans les échantillons de thé vert étudiés.

Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± SD.

Echantillons	Caféine	Théophylline	Théobromine	MT
<i>Extraction hydrométhanolique, concentration mg/g</i>				
E1	20,98 ± 0,05	nd	2,95 ± 0,14	23,93 ± 0,19
E2	16,32 ± 0,03	nd	1,92 ± 0,18	18,24 ± 0,21
E3	15,07 ± 0,03	0,82 ± 0,08	2,56 ± 0,25	18,45 ± 0,36
E4	20,25 ± 0,02	0,30 ± 0,14	5,57 ± 0,15	26,12 ± 0,32
E5	12,71 ± 0,03	0,19 ± 0,12	5,28 ± 0,17	18,18 ± 0,33
E6	17,44 ± 0,04	nd	3,69 ± 0,21	21,13 ± 0,25
E7	14,01 ± 0,04	nd	3,31 ± 0,23	17,32 ± 0,27
E8	19,76 ± 0,03	nd	2,95 ± 0,15	22,71 ± 0,18
<i>Extraction par infusion, concentration en mg/g</i>				
E1	29,88 ± 0,01	0,91 ± 0,01	2,93 ± 0,01	33,72 ± 0,03
E2	19,68 ± 0,02	0,86 ± 0,01	2,30 ± 0,01	22,84 ± 0,04
E3	18,24 ± 0,03	0,73 ± 0,01	2,19 ± 0,02	21,16 ± 0,06
E4	26,53 ± 0,05	0,23 ± 0,01	7,54 ± 0,02	34,30 ± 0,08
E5	14,19 ± 0,03	0,64 ± 0,01	2,60 ± 0,01	17,43 ± 0,05
E6	28,13 ± 0,01	1,35 ± 0,07	9,10 ± 0,02	38,58 ± 0,06
E7	20,51 ± 0,01	0,73 ± 0,01	1,78 ± 0,01	23,02 ± 0,04
E8	25,18 ± 0,11	1,07 ± 0,03	6,81 ± 0,18	33,06 ± 0,32

IV.2.5. Rendement des extractions (infusion et extraction hydrométhanolique)

Dans le tableau (IV.7), nous présentons les résultats des rendements des deux méthodes d'extraction (infusion et extraction hydrométhanolique) réalisées dans cette étude.

Tableau IV.7 : Rendements (%) de l'extraction (infusion et extraction multiple méthanol /eau).

Echantillons	Rendement d'infusion (%)	Rendement d'extraction multiple (%)
E1	15	21,5
E2	10	16
E3	14	17
E4	9,8	15,7
E5	9,6	13
E6	13	15,2
E7	6,4	11,5
E8	11,4	16,3

IV.3. Discussion**IV.3.1. Concentrations des méthylxantines dans les échantillons du thé vert****IV.3.1.1. Selon la marque du thé**

Notre étude a été portée sur des différentes marques de thé vert d'origine chinoise. Néanmoins, les théiers peuvent être plantés dans des régions différentes c'est-à-dire, les feuilles de la plante sont cultivées de différents sols. Ainsi, La quantité de caféine varie considérablement dans les échantillons étudiés. C'est le composé prédominant dans tous les échantillons, Les teneurs moyennes de la caféine, ou 1,3,7-triméthylxanthine dans les échantillons préparés par infusion varient entre 14,19 à 29,88 mg g⁻¹ de la matière sèche.

La théophylline, ou 1,3-diméthylxanthine n'est présente qu'en faible quantité dans les échantillons étudiés. Sa teneur varie de 0,73 à 1,35 mg g⁻¹ de la matière sèche.

La théobromine ou 3,7-diméthylxanthine, est retrouvée en faible quantité, légèrement supérieure à celle de théophylline. On a trouvé des teneurs de 1,78 à 9,10 mg g⁻¹ par rapport au poids sec.

Il faut souligner que les différentes marques de thé vert étudiées possèdent des niveaux de méthylxantines très différents. Cela provient entre autres, de l'utilisation des différentes parties de la plante (bourgeons, feuilles, nervure des feuilles), différentes méthodes de récolte et processus de transformation (dont la mise à l'ombre, la poudre de thé, le roulage des feuilles, les moyens de fertilisation et la torréfaction) et le moment de la récolte (1ère à 4ème récolte) [23].

Enfin, les méthylxantines totaux (**Figure IV. 24**) ont été déterminés par la somme des concentrations de chaque standard qui varie de 17,43 ± 0,05 mg/g (E5) à 38,58 ± 0,06 mg/g (E6)

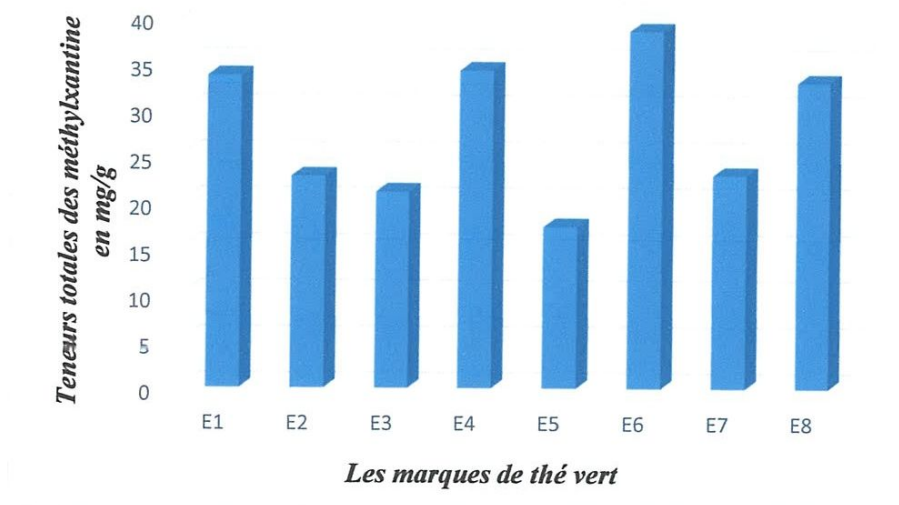


Figure IV.24 : Les méthylxantines totaux dans les échantillons de thé vert.

IV.3.1.2. Selon la méthode d'extraction

Une remarquable augmentation des taux des méthylxantines des infusions par rapport aux extraits hydrométhanoliques a été observée pour les huit échantillons (**Figures (IV.25) à (IV.27)**). Ceci s'explique par la grande solubilité des bases puriques dans l'eau chaude qui favorise leurs passages de la feuille de thé vers l'infusé ; à tenir en compte que 80 % des

méthylxantines sont libérés dans la première minute d'infusion chaude ; les longues durées d'infusion détérioreraient les molécules [22].

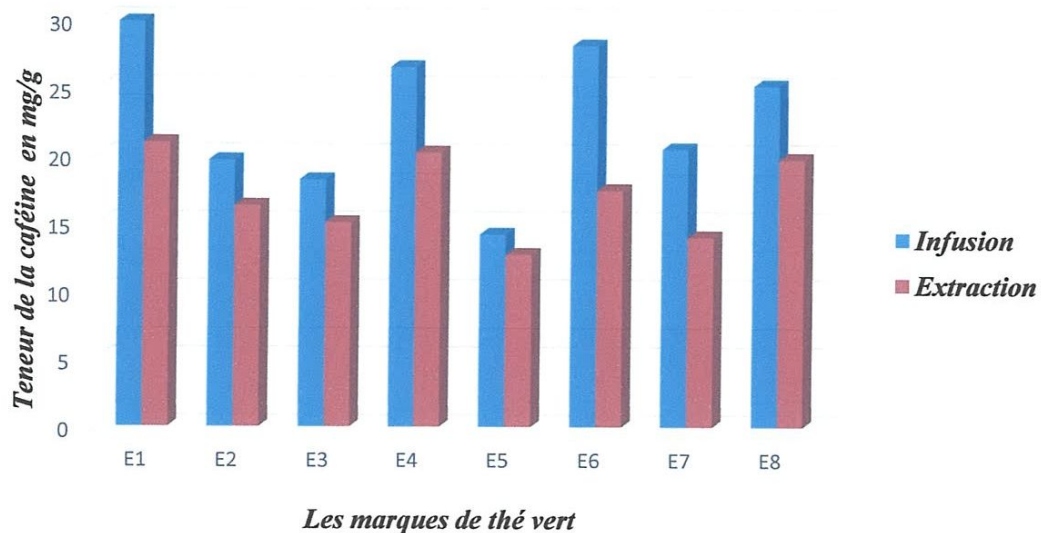


Figure IV.25 : Concentrations de la caféine dans les échantillons de thé préparés par infusion et extraction hydrométhanolique.

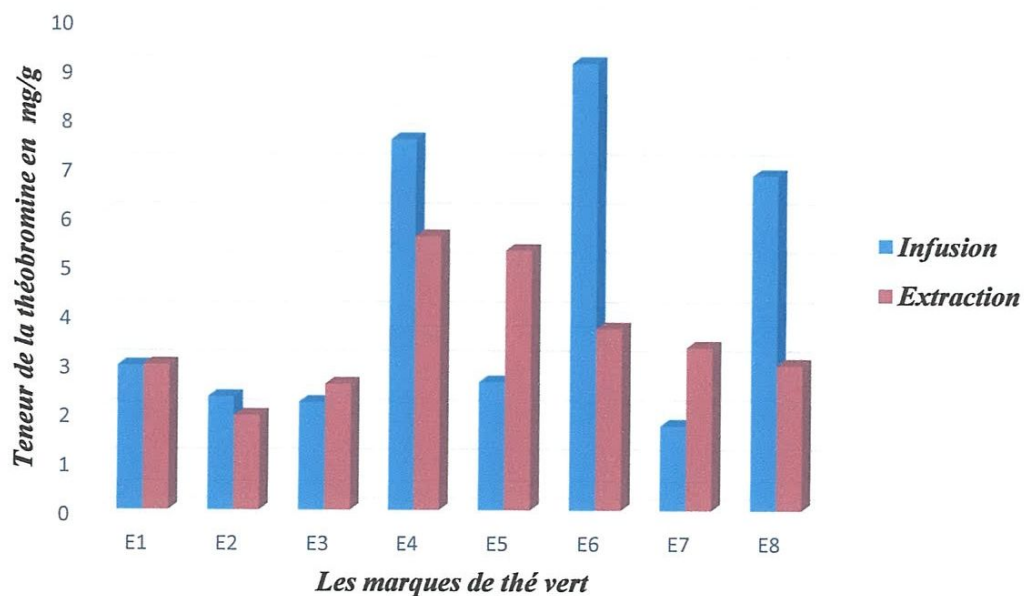


Figure IV.26 : Concentrations de la théobromine dans les échantillons de thé préparés par infusion et extraction hydrométhanolique.

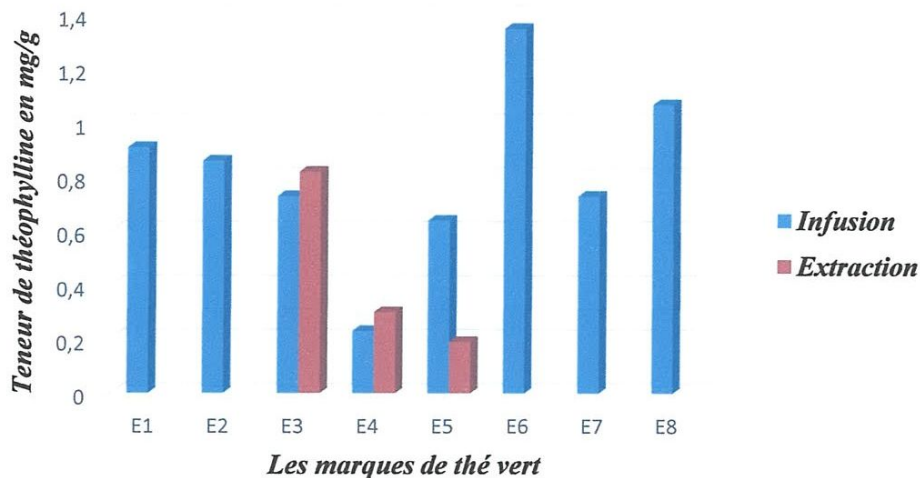


Figure IV.27 : Concentrations de la théophylline dans les échantillons de thé préparés par infusion et extraction hydrométhanolique.

Il est à signaler que la théophylline n’a pas été détectée dans la plupart des échantillons préparés par extraction hydrométhanolique.

IV.3.2. Discussion des résultats des rendements

Les valeurs des rendements de l’extraction par infusion et par extraction hydrométhanolique pour les marques du thé vert étudiées sont entre 6,4 % et 15 % et 11,5 % et 21,5 % respectivement (Figures (IV.28) et (IV.29)), ce résultat paraît logique parce que la solubilité des composés chimiques qui constituent le thé et parmi lesquels (les polyphénols, les bases puriques, les acides aminés...) est partielle.

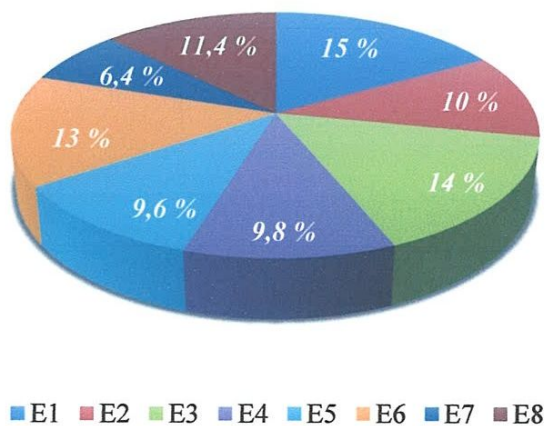


Figure IV.28 : Rendements en fonction des marques du thé vert, des échantillons préparés par infusion.

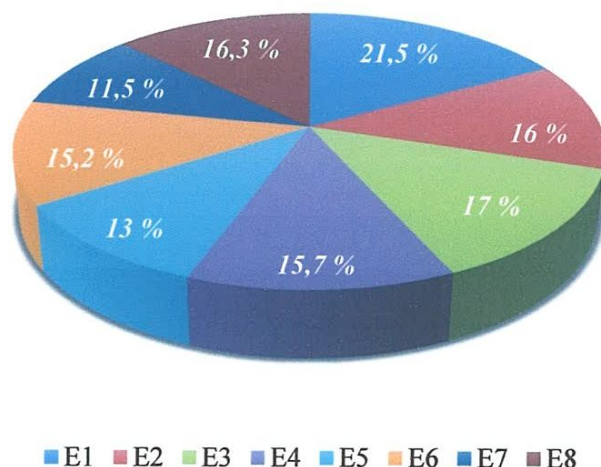


Figure IV.29 : Rendements en fonction des marques du thé vert, des échantillons préparés par extraction hydrométhanolique.

Il ressort à travers l'observation des rendements, que l'extraction hydrométhanolique donne le meilleur rendement soit une moyenne de 15,77 % sur huit échantillons, versus 11,15 % pour l'infusion. Ce résultat est expliqué par la solubilité des composés phénoliques (substances majoritaires du thé) dans le méthanol parce que, La plupart des phénols simples présents dans le thé peuvent aisément être extraits par des alcools comme le méthanol et l'éthanol. Cependant les acides phénoliques extrêmement polaires (acides benzoïque, cinnamique) peuvent ne pas être entièrement extraits par ces solvants organiques purs, des mélanges d'alcools - eau sont recommandées [22].

IV.4. Conclusion

Cette étude est menée sur le thé vert du marché algérien afin d'identifier et déterminer sa composition en méthylxantines (caféine, théobromine et théophylline) et pour cela des analyses en HPLC-UV-DAD ont été réalisées.

Les résultats obtenus indiquent que la composition en méthylxantines est affectée par la méthode d'extraction. Leurs concentrations dans l'infusion sont supérieures à celles de l'extraction aqueuse par le méthanol.

Le mode de préparation des échantillons a une influence sur le rendement de l'extraction ; ainsi les rendements de l'extraction multiple dans tous les échantillons sont supérieurs à ceux de l'infusion.

Conclusion générale

Conclusion générale

Dans ce travail, nous avons étudié un produit très populaire à travers le monde ; le thé dont la boisson est classée la deuxième à consommer après l'eau.

L'étude est portée sur l'analyse qualitative et quantitative de différentes marques du thé du marché de la ville de Guelma.

Beaucoup de composés et éléments chimiques sont contenus dans le thé, nous nous sommes limités aux méthylxantines à savoir : La caféine, la théophylline et la théobromine.

Deux méthodes de préparation des échantillons de thé ont été effectuées : une extraction multiple par méthanol/eau et une infusion à 90 °C pendant 5 minutes.

L'analyse a été réalisée par la chromatographie HPLC- UV-DAD.

Les résultats obtenus, nous ont permis de tirer les conclusions suivantes :

- Les différentes marques de thé vert étudiées possèdent des niveaux de méthylxantines très différents. Les teneurs moyennes de la caféine composant majeur de cette famille chimique dans tous les échantillons, varient entre $14,19 \pm 0,03$ et $29,88 \pm 0,01$ mg g⁻¹ de la matière sèche. La théophylline et la théobromine en concentrations nettement inférieures, leurs teneurs varient de $0,23 \pm 0,01$ à $1,35 \pm 0,07$ mg g⁻¹ et de $1,78 \pm 0,01$ à $9,10 \pm 0,02$ mg g⁻¹ respectivement.
- La différence des teneurs des composés étudiés d'une marque à une autre est essentiellement due au sol où la plante est cultivée et même à la saison et au type de la cueillette.
- La composition en méthylxantines est affectée par la méthode d'extraction ; leurs concentrations dans l'infusion sont supérieures à celles de l'extraction aqueuse par le méthanol. Ceci s'explique par la grande solubilité des bases puriques dans l'eau chaude.
- Le mode de préparation des échantillons a une influence sur le rendement de l'extraction. En effet, l'extraction hydrométhanolique donne le meilleur rendement soit une moyenne de 15,77 % sur huit échantillons, versus 11,15 % pour l'infusion. Ce résultat est expliqué par la solubilité des composés phénoliques (substances majoritaires du thé) dans le méthanol.
- Enfin, ce travail qui a mis au clair l'une des boissons les plus populaires avec l'une des familles chimique (méthylxantines) ayant des effets thérapeutiques considérable, peut être

suivi par d'autres études ultérieures mettant au point d'autres composés chimiques bénéfiques pour la santé humaine.

Références

Références

- [1] **N. ATAMENIA**, Dosage par HPLC de la caféine et étude de l'acidité des boissons des thés verts du marché Algérien, Mémoire de master, Université de Guelma, **2016**.
- [2] <http://www.thevert.com/histoire/>.
- [3] **I. NACER** et **S. BOURAS**, Thé vert, catéchine, Mémoire de licence, Université de Ouargla, **2014**.
- [4] http://www4.ac-nancy-metz.fr/physique/liens/Jumber/pdf_chimie/HPLC.pdf
- [5] http://biotech.spip.ac-rouen.fr/IMG/article_PDF/HPLC-Principe-et-appareillage_a9.pdf.
- [6] **B. SLIMANI**, Analyse par HPLC de l'épigallocatechine gallate et mesure de l'acidité des boissons de thé vert, rouge et noir du marché de la ville de Guelma : Etude cinétique, Mémoire de master, Université de Guelma, **2016**.
- [7] ChemIDplus, Base de données, consulté le 17 Mai 2018, <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/chemidheavy.jsp>.
- [8] http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/46/051/46051966.pdf.
- [9] **I. YAHAMDI** et **F. BOUKHDENNA**, Analyse qualitative et quantitative de différentes marques de thé du marché local en ses deux principaux constituants : La caféine et la catéchine, Mémoire de master, Université de Guelma, **2014**.
- [10] <http://fr.dreamstime.com/photo-stock-alcaloïdes-caféine-théobromine-théophylline-image-23518760>.
- [11] <http://www.photomazza.com/Camellia-sinensisleng=fr>.
- [12] <https://jasetea.com/2017/01/05/tea-plant-varietal-for-pu-erh/>.
- [13] <http://luirig.altervista.org/flora/taxa/floranam.php?genere=Camellia>.
- [14] http://chathe.fr/THE_Culture.html.
- [15] https://chine.in/actualite/photos-saison-recolte-the-vert_40699.html.
- [16] **N. Benchanaa** et **I. Boukerche**, Etude de l'influence de degré de torréfaction du café sur la formation de l'acrylamide par chromatographie liquide a haute performance, Mémoire de master, Université de Guelma, **2017**.

- [17] **M. Krieps**, Le thé vert : Origine, Actualité et Potentialités, Thèse de doctorat, Université Henri Poincaré-Nancy 1, **2009**.
- [18] **B. Chloé**, Consommation de thé et de médicaments : Que doit savoir le pharmacien à l'officine ? Thèse de doctorat, Université de Nantes, **2014**.
- [19] [http://ead.univvangers.fr/%7ejaspard/page2/cours/6cours deust/chromatographie/1cho](http://ead.univvangers.fr/%7ejaspard/page2/cours/6cours%20deust/chromatographie/1cho).
- [20] **C. Ducauze, G. A. Baillet, T. X. Buit**. Choix et validation d'une méthode d'analyse. Agrosparitech Ed, Paris, Agrosparitech, 30 p.
- [21] **MA. Rostagno, N. Manchona, MD. Arrigoa, E. Guillamona, A. Villares, A. Garcia-Lafuentea**. Fast and simultaneous determination of phenolic compounds and caffeine in teas, mate, instant coffee, soft drink and energetic drink by high-performance liquid chromatography using a fused-core column. *J Anal Chim Acta* **2011**.
- [22] **S. MAHMOUDI, M. KHALI, N. MAHMOUDI**, Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.), *Revue « Nat & Tech »*. B- Sciences Agronomiques et Biologiques, /**2013**.
- [23] <http://www.thevert.com/alcaloides/>.

Annexe

Annexe : Différents appareils utilisés pour l'extraction

- **Ultrason**

Les bains à ultrasons plutôt destinés au nettoyage de pièces fines (joaillerie, lunetterie, dentaire, bijoux, ...), ils sont aussi utilisés en laboratoire pour :

- le nettoyage de petites pièces
- Dégazage de solutions (HPLC, ...)
- Aération de liquides semi-visqueux

Le nettoyage par ultrasons nécessite l'emploi de détergents spécifiques et souvent un léger chauffage (entre 60 et 80 °C).



Figure 1 : Ultrason (Laboratoire de Chimie Appliquée, Université de Guelma).

- **Centrifugeuse**

Une centrifugeuse est un appareil destiné à imprimer une accélération, grâce à un mouvement de rotation, à un mélange liquide-solide (par exemple, un colloïde). Le plus souvent, le mélange est déposé dans un récipient perforé de multiples orifices, la taille de ceux-ci étant suffisamment grande pour laisser passer le liquide et assez petite pour empêcher le passage du solide. Ce type d'appareil peut aussi servir à séparer les mélanges constitués de parties ayant une densité différente.

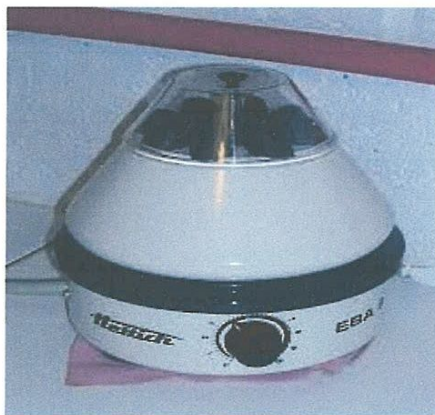


Figure 2 : Centrifugeuse (Laboratoire de Chimie Appliquée, Université de Guelma).

- **L'évaporateur rotatif**

- ✓ Principe de fonctionnement

Un appareil couramment utilisé pour éliminer un solvant d'un mélange, est l'évaporateur rotatif (appelé souvent "rotavapor"). Le mélange de solvant et de soluté est placé dans le ballon de droite. Celui-ci est plongé dans un bain-marie. Il est incliné et animé d'un mouvement de rotation de manière à créer un film de liquide et ainsi accroître la surface d'évaporation du solvant. La pression à l'intérieur du montage est abaissée au moyen d'une pompe à vide ce qui augmente la vitesse d'évaporation. Après condensation dans le réfrigérant, le solvant est récupéré dans le ballon de gauche.



Figure 3 : Evaporateur rotatif ; Heidolph-Laborota 4000 (Laboratoire de Chimie Appliquée, Université de Guelma).

