

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	1
I. INTRODUCTION.....	2
A. Choix du thème du didacticiel	2
B. Population cible.....	3
C. Buts pédagogiques fixés.....	3
II. LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE	4
A. Présentation de la chromatographie en phase liquide	4
B. Principe de la technique.....	4
C. Vocabulaire utilisé.....	5
III. L'ORDINATEUR ET L'ENSEIGNEMENT	8
A. Interactivité.....	8
1. Pédagogie interactive.....	9
2. La simulation.....	11
3. Les outils d'interaction.....	12
B. Les animations.....	14
C. Prévision de la place de l'E.A.O.....	14
D. Le coût d'un didacticiel.....	15
E. Les limitations d'un didacticiel.....	15
IV. CONTENU DU DIDACTICIEL.....	17
A. Présentation	17
B. Aspects généraux de la chromatographie en phase liquide.....	17
1. La chromatographie en phase liquide moderne	17
2. Polarité et chromatographie	20
3. Différents modes de séparation	25
4. Variation de la phase mobile.....	26
5. Différences avec la chromatographie en phase gazeuse	26
C. La CHROMATOGRAPHIE de PARTAGE.....	32
1. Principe	32
2. Phase stationnaire	32
3. Mécanismes de rétention	34
D. La CHROMATOGRAPHIE d'EXCLUSION.....	36
1. Principe	36
2. Phase stationnaire	37
3. Etalonnage.....	38
4. Applications.....	44
E. La CHROMATOGRAPHIE d'ADSORPTION.....	45
1. Principe.....	45

2. Phase stationnaire	45
3. Mécanismes de rétention	46
F. La CHROMATOGRAPHIE IONIQUE	47
1. Principe	47
2. Chromatographie d'échange d'ions.....	47
3. Chromatographie d'appariement d'ions.....	48
4. Chromatographie d'échange d'ions avec supprimeur	49
G. La simulation.....	53
H. Choix du mode de C.L.H.P.	56
I. Notions d'appareillage	56
1. Schéma de principe d'une chaîne de CLHP	56
2. La colonne.....	56
3. La vanne d'injection.....	56
4. Le détecteur	57
5. La pompe	59
V. CONCEPTION DU DIDACTICIEL.....	63
1. Conception	63
2. Réalisation	63
3. Utilisation.....	63
A. Conception	64
B. Réalisation ou médiatisation	65
C. Structure générale:	66
1. Subdivision en sous-programmes	66
2. La marche arrière.....	71
3. Les utilitaires	72
4. Analyse d'une réponse numérique.....	73
5. Suivi pédagogique et modifications futures.....	75
VI. CONCLUSIONS.....	79
VII. ANNEXES.....	81
A. Utilisation du Didacticiel	81
1. Installation	81
2. Liste des fichiers	82
3. Utilisation.....	83
B. Lexiques.....	85
1. Lexique Général.....	85
2. Lexique G.P.C.....	88
C. Simulation	91
1. Obtention des fichiers de calcul	91
2. Conditions optimales de simulation.....	97
D. Exemple de la construction d'un graphe	99

VIII. REFERENCES	101
------------------------	-----

Ce que l'on conçoit bien s'énonce clairement,
Et les mots pour le dire arrivent aisément.

Nicolas BOILEAU
L'Art Poétique, Chant I.

I. INTRODUCTION

"Un didacticiel est un produit pédagogique. Il assure, grâce à un système informatique, l'interactivité entre les apprenants et les enseignants dans le cadre d'un objectif global déterminé." [1].

Le didacticiel portant sur la chromatographie en phase liquide, fait partie d'un ensemble de projets d'enseignement à distance (E.A.D) des Méthodes physico-chimiques d'analyse (M.P.C.A.), qui correspond à un appel d'offre de l'Éducation Nationale datant de 1988. Ce projet a pour objet la réalisation de produits pédagogiques "multimédia" d'auto-formation pour les techniques analytiques. [2].

Le laboratoire d'Enseignement Assisté par Ordinateur (E.A.O.) de la chaire de M.P.C.A. du C.N.A.M. a déjà à son actif la réalisation de plusieurs didacticiels sur des techniques physico-chimiques: la spectrométrie de fluorescence X (en partenariat avec IBM France) [3, 4, 5, 6], Méthodes de décroissance radioactives [7] (en partenariat avec l'Université de Paris-VII), plus récemment les généralités de la chromatographie (en partenariat avec le Laboratoire Central de la Préfecture de Police) [8] ainsi que la simulation de la chromatographie en phase gazeuse [9]. Le laboratoire a été associé au Centre Documentaire Informatique pour l'Enseignement de la Chimie (C.D.I.E.C.) de l'Université de Nice pour le développement d'un didacticiel de Spectrométrie Infrarouge [10].

A. CHOIX DU THÈME DU DIDACTICIEL

Le thème de ce didacticiel "Chromatographie en phase liquide" a été choisi en fonction de mon expérience professionnelle, par le Professeur GENTY. C'est le troisième module d'un ensemble de 4 parties :

- 1- Généralités de la chromatographie
- 2- Chromatographie en phase gazeuse (C.P.G.)
- 3- Chromatographie en phase liquide
- 4- Chromatographie planaire ou sur couche mince (C.C.M.)

Ce mémoire a été réalisé dans le cadre d'un accord avec le FONGECIF (FONds de GEstion des Congés Individuels de Formation en Ile-de-France), au laboratoire de Méthodes physico-chimiques d'analyse (M.P.C.A.) du Conservatoire National des Arts et Métiers (C.N.A.M.).

B. POPULATION CIBLE

"L'auteur d'un didacticiel exerce sa créativité dans le contexte d'un besoin précis, d'un public-cible déterminé, d'un sujet bien défini et d'une situation pédagogique donnée." [1].

Ce didacticiel est destiné à des techniciens souhaitant une formation sur la chromatographie en phase liquide. Le niveau requis est celui d'un baccalauréat scientifique ou "Bac + 2" (BTS ou DUT). De plus, l'utilisateur est supposé posséder les bases de cette technique, soit par expérience professionnelle, soit en s'étant formé avec le didacticiel sur les généralités de la chromatographie [8], premier module de l'ensemble dont fait partie ce travail. Ce produit est utilisable en entreprise sans que l'apprenant soit nécessairement encadré.

C. BUTS PÉDAGOGIQUES FIXÉS

L'objectif de formation est d'initier à la chromatographie en phase liquide. A la fin de son parcours, l'élève devra posséder les principales bases de la théorie de la chromatographie de partage (chromatographie liquide-liquide C.L.L.), de la chromatographie d'exclusion (gel permeation chromatography G.P.C.), et avoir des notions sur les autres techniques que sont les chromatographies ionique et d'adsorption. Le didacticiel doit préparer l'apprenant à une utilisation rationnelle de la chromatographie en phase liquide. Il sera capable d'optimiser une séparation. Un des objectifs les plus délicat à atteindre est de faire comprendre ce qu'est la polarité d'une molécule et le rôle primordial qu'elle joue en chromatographie en phase liquide.

II. LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE

A. PRÉSENTATION DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE

La CHROMATOGRAPHIE est une technique analytique dont les premières expériences, celles de TSWETT datent de 1903 [11]. Elle permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange pour leur identification et leur quantification.

La forme moderne de la chromatographie en phase liquide est arrivée dans les laboratoires industriels à la fin des années soixante-dix, bien après la chromatographie en phase gazeuse ou celle sur couche mince (planaire). Ses performances ont permis des analyses qui n'étaient pas possibles auparavant. Les exigences de qualité étant de plus en plus strictes, cette méthode s'est rapidement répandue dans toutes les industries chimiques, para chimiques, cosmétiques, pharmaceutiques... Ce marché considérable a entraîné des développements rapides et aujourd'hui la chromatographie en phase liquide est une des principales méthodes d'analyse dans ces industries. Elle a atteint un haut degré de fiabilité et de performance. La Chromatographie Liquide Haute Performance (C.L.H.P.) permet de réaliser assez facilement des séparations et des analyses qui seraient difficiles ou impossibles par d'autres techniques chromatographiques [12].

B. PRINCIPE DE LA TECHNIQUE.

La chromatographie en phase liquide est une méthode physico-chimique basée sur des différences d'interactions. Les molécules des produits à séparer (**solutés**) sont mises 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** contenue dans un tube appelé **colonne** chromatographique. Ces interactions provoquent des échanges qui aboutissent à la séparation désirée.

La phase mobile poussée par une **pompe sous haute pression**, parcourt en permanence le système chromatographique . Le mélange, dissous dans un solvant, est injecté par l'intermédiaire d'une vanne, puis transporté au travers du système chromatographique, dont fait partie la colonne. Les composés en solution se répartissent suivant leur affinité, entre la phase mobile et la phase stationnaire. La théorie de la séparation montre que le signal enregistré à la sortie d'un **détecteur** approprié en fin de colonne a la forme d'un **pic**. Chaque pic représente un constituant du mélange à séparer.

C. VOCABULAIRE UTILISÉ.

Le temps de sortie, ou temps de rétention¹ t_r , est caractéristique du constituant, pour des conditions d'analyse données. La surface d'un pic est fonction de la quantité de constituant dont il est la trace.

Le temps 0 est le temps du début de l'injection.

On appelle temps mort t_m le temps que met une molécule, n'ayant aucune affinité avec la phase stationnaire, pour parcourir la distance reliant l'injecteur au détecteur.

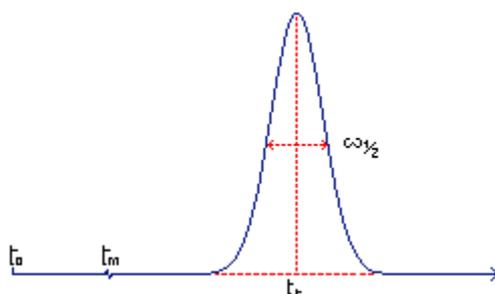


Fig.2.1 Pic de chromatogramme et ses caractéristiques.

La largeur d'un pic est caractéristique de l'efficacité de la séparation. L'**efficacité** est mesurée par le nombre de plateaux théoriques N_{th} (par analogie avec la distillation):

¹dans le didacticiel, le vocabulaire est disponible en permanence en cliquant sur la partie supérieure de l'écran (dans la barre de menu). Les définitions des mots sont présentés en Annexe B-2.

$$N_{th} = 5,54 \times \left(\frac{t_r}{\omega_{1/2}} \right)^2$$

avec $\omega_{1/2}$ largeur du pic à mi-hauteur, exprimée en unité de temps.

Si dans certaines conditions, deux constituants sortent à des temps proches, leurs pics risquent de se chevaucher. En optimisant les conditions analytiques, il est possible d'améliorer l'allure du chromatogramme¹. Le paramètre de **résolution R** quantifie la qualité de cette séparation.

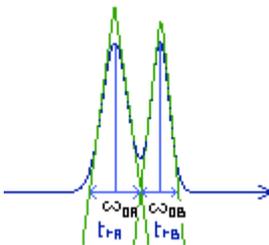


Fig.2.2 Deux pics de chromatogramme et leur résolution.

$$R = 2 \times \frac{(t_{rB} - t_{rA})}{(\omega_{0B} + \omega_{0A})}$$

avec t_r , temps de rétention des 2 pics contigus
et ω_0 , largeur de ces pics à leur base.

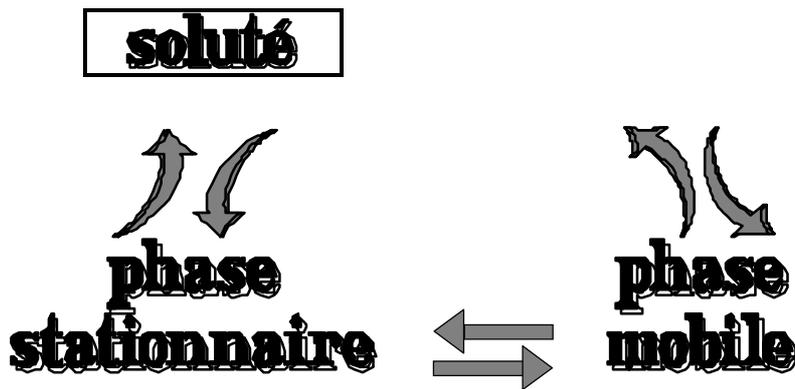
si $R < 1$ la résolution est mauvaise
si $1 < R < 1,5$ la résolution est acceptable
si $R > 1,5$ la résolution est bonne.

Le temps de rétention t_r d'un soluté est fonction de son affinité avec l'éluant d'une part, et avec la phase stationnaire, d'autre part. A un instant t , le soluté est à la concentration C_m dans la phase mobile et à la concentration C_s dans la phase stationnaire. Leur rapport est appelé **coefficient de partage K**.

¹Enregistrement du signal du détecteur.

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

Le coefficient de partage est fonction de trois types d'affinités:
celle entre le soluté et la phase mobile,
celle entre le soluté et la phase stationnaire,
mais aussi celle entre les phases stationnaire et mobile.



Lorsque le soluté n'a aucune affinité avec la phase stationnaire, C_s est nulle, donc $K = 0$. Le soluté n'est pas retenu dans la colonne. Si la phase mobile est très différente du solvant d'injection, il y a un risque de faire précipiter le soluté en tête de colonne, donc de la boucher. Dans ce cas, le soluté peut ne jamais sortir du système chromatographique.

Ces différentes interactions mettent en jeu des forces qui caractérisent ce que les chromatographistes appellent la polarité (du soluté, des phases mobile et stationnaire). (Cf. chapitre IV Contenu du didacticiel).

Une revue des différentes théorie et méthodologie de la chromatographie en phase liquide a été publiée par DORSEY et col. [13]. Elle rassemble un grand nombre de publications et présente de nouvelles approches sur le traitement des données issues de la chromatographie.

III. L'ORDINATEUR ET L'ENSEIGNEMENT

"Tout individu est confronté à l'informatique en tant qu'utilisateur. S'il ne veut pas rester passif en subissant la technique, une certaine forme de connaissance lui est indispensable, même si elle reste extérieure à la technique informatique." [1]. L'Enseignement Assisté par Ordinateur (E.A.O.) apporte plus que les connaissances techniques du sujet pour lequel il a été créé. C'est aussi l'occasion de se retrouver face à un ordinateur, à ce côté "impitoyable" de la logique informatique qui veut que ce soit l'élève qui se plie au système et non l'inverse. Il appartient au concepteur de minimiser cet obstacle. A part l'aspect "Tout nouveau tout beau" [14], l'E.A.O. offre l'occasion de se familiariser avec un clavier (et dans ce cas précis avec la souris puisque ce didacticiel fonctionne à partir de l'interface graphique WINDOWS).

L'E.A.O. met "à disposition (...de l'apprenant...) tout ce que l'informatique permet : mémoriser, afficher, manipuler, analyser, calculer, rechercher, dialoguer, commander toutes sortes de périphériques d'entrée, de sortie et de stockage des informations... La caractéristique essentielle de l'E.A.O. est de rendre l'apprenant actif; ce qui diffère d'une situation de cours traditionnel dans laquelle il lui est possible d'être tout à fait inactif." [1].

A. INTERACTIVITÉ

C'est le **point essentiel** de l'E.A.O. et en particulier **de ce didacticiel**. Pour que cette méthode d'enseignement soit efficace, il faut impérativement que l'utilisateur soit actif, que son avis soit très souvent sollicité.

Globalement un didacticiel est basé sur les trois points suivants:

- ENVOI** d'informations par le programme,

- SOLLICITATION** de l'apprenant, c'est à dire attente d'une action de sa part, partant du principe que **l'erreur a un rôle de formation** [15].

- ANALYSE DE LA RÉPONSE DE L'ÉLEVÉ.**

Ces trois étapes se renouvellent suivant des enchaînements différents suivant la réponse de l'élève.

Certains envois peuvent être réalisés de manière dynamique, c'est à dire **animés**. La plupart des phénomènes à expliquer en chromatographie étant dynamiques, les animations apportent une meilleure compréhension.

Le didacticiel qui a été réalisé, se distingue de ceux présents sur le marché par une très grande "liberté de mouvement" de l'utilisateur. Il offre une **interactivité la plus importante possible** suivant le principe suivant : plus l'élève est sollicité, plus il est forcé de réfléchir, meilleur alors sera son apprentissage.

"L'interactivité engendre un transfert d'attitude. Pour éviter les messages d'erreur qui l'agacent, l'apprenant prend l'habitude de réfléchir avant de taper, de se relire. Une fois prise, cette habitude de soin, d'attention, s'étend-elle aux autres domaines ?" Plusieurs chercheurs et enseignants l'affirment. [16].

1. Pédagogie interactive

Pour solliciter l'élève, nous avons utilisé plusieurs types de questions. Plutôt que de présenter une information sur un écran contenant du texte, un mode d'interactivité peut être de répondre à un *questionnaire à choix multiple* (Q.C.M.) : l'apprenant doit sélectionner la (ou les) réponse(s) qu'il suppose correcte(s), soit avec la souris, soit à l'aide du clavier. Dans ce type d'interaction, l'auteur prévoit facilement toutes les combinaisons de réponses possibles, puisqu'elles sont limitées. Nous pensons que les Q.C.M. sont utiles pour faire passer des notions de logiques, par exemple "vrai" ou "faux".

L'interactivité peut aussi consister à faire remplir un questionnaire à trous (lacunaire). Dans ce cas, pour chaque mot manquant, une aide peut proposer soit une explication, soit la liste de tous les mots qui doivent être remplacés dans le texte. Souvent, l'utilisateur ne se sert pas de l'aide et répond par un mot de sens voisin. L'analyse alors se complique.

Un type similaire de question est celle où l'on attend une réponse numérique consécutive à un calcul. Pour l'auteur, il s'agit d'analyser la valeur, en répondant à l'élève que son résultat est dans l'intervalle admis, est trop faible, ou est trop élevé. L'apprenant peut alors refaire son calcul.

Pour les questions "ouvertes", l'apprenant doit répondre par l'intermédiaire du clavier en écrivant un mot ou une phrase. L'analyse de réponse devient alors très vite extrêmement complexe. La probabilité de reconnaissance des réponses par le système n'est pas égale à 100%. L'apprenant ayant répondu correctement, mais avec un mot ou une phrase non prévu par le concepteur du didacticiel, peut avoir la tentation d'éteindre l'ordinateur par dépit. L'auteur doit donc prévoir un grand nombre de cas. "La liberté de syntaxe des réponses de l'apprenant implique d'accepter plusieurs formulations équivalentes d'un même message et de définir des classes de réponses attendues, de manière à pouvoir donner automatiquement une réaction adéquate à un éventail de messages aussi large que possible" [1]. Pour cela, on utilise la technique des mots clés. La réponse sous forme textuelle est considérée comme une suite ordonnée de mots qui sont analysés. Il faut définir des équivalences syntaxiques du type "faute d'orthographe" ou "faute de frappe", mais aussi des synonymes. Pour que la réponse soit classée par le système comme étant bonne ou fautive, un mot (ou une série de mots) doit être obligatoirement présent ou absent.

Comparée à un Q.C.M., une question ouverte de type "réponse par un mot ou par une phrase" a l'avantage de ne pas présenter la bonne réponse, donc de faire réfléchir davantage l'apprenant face à une situation donnée. L'inconvénient majeur est que l'auteur ne puisse pratiquement pas prévoir toutes les réponses puisque l'utilisateur peut, dans un cas extrême, formuler une réponse n'ayant aucune relation avec la question, soit pour se distraire, soit par manque de compréhension. De plus, le temps de mise au point d'une interaction (donc du didacticiel) est fonction du nombre de cas prévus dans l'analyse de réponse. L'exploitation du fichier d'enregistrement des réponses des utilisateurs doit permettre à l'avenir, d'améliorer les commentaires associés à chaque cas.

Dans ce didacticiel, nous avons présenté le plus d'informations possibles de manière interactive, soit à l'aide de Q.C.M., soit à l'aide de questionnaires lacunaires. Nous avons réservé l'utilisation de ces derniers à la vérification de

l'acquisition de notions anciennes ou à celle venant d'être présentées. En écrivant à l'aide du clavier le ou les mots attendus, ceux-ci devraient être plus facilement retenus à long terme.

Le didacticiel sollicite beaucoup la réflexion de l'apprenant qui est actif devant l'ordinateur. Il permet aussi à l'élève d'exercer sa mémoire visuelle par l'intégration dans la partie "cours" de graphiques animés, d'images réelles (photographies) ou plus tard peut-être de séquences filmées.

2. La simulation

C'est un outil très puissant. La simulation permet à l'apprenant de visualiser en un temps très bref, l'influence des différents paramètres qui lui sont proposés. **Seul l'ordinateur est capable d'effectuer les calculs nécessaires à la simulation.** Bien souvent, il est risqué lors de l'apprentissage pratique de laisser l'élève seul aux commandes d'un matériel d'utilisation complexe et dont les conséquences, en cas de fausse manoeuvre, seraient importantes. La simulation permet d'effectuer un grand nombre d'essais à un moindre coût et sans risque.

Il existe différents types de simulations [15]:

- la simulation méthodologique dans laquelle l'apprenant étudie la validité du modèle. (exemple: méthode des surfaces de réponse)
- la simulation opérationnelle dans laquelle l'apprenant conduit un modèle (exemple: formation des pilotes de ligne)
- la simulation "modélisante", dans laquelle le modèle est inconnu de l'étudiant qui doit le découvrir. (exemple: relation entre une variable et son effet)
- la simulation dynamique dans laquelle l'apprenant connaissant le modèle, étudie l'influence des paramètres. (exemple simulation de chromatogrammes [8, 9,17].)

Il nous a paru indispensable d'incorporer cet outil très puissant qu'est la simulation, comme méthode d'enseignement. Nous utilisons les deux derniers types de simulation, car les équations qui régissent les phénomènes chromatographiques sont en partie à découvrir et en partie données à l'élève.

La simulation permet à l'élève de placer son appareillage virtuel dans des conditions différentes et de voir apparaître à l'écran les effets de son action. Le résultat est obtenu beaucoup plus rapidement que dans la réalité. Prenons l'exemple d'une séparation chromatographique qui dure 15 minutes. En changeant la composition de la phase mobile, cette même séparation durerait 10 minutes. Dans la réalité, l'élève aurait obtenu le résultat de cette modification dans un minimum de $15 + 10 = 25$ minutes (sans tenir compte du temps d'équilibre du système chromatographique). La simulation donne les deux résultats en moins d'une minute. Elle ne présente bien évidemment aucun danger et son utilisation ne consomme pas de solvant. Finalement en apprentissage, elle donne à l'élève une bonne notion de l'influence des paramètres ("force éluante" dans cet exemple).

Malgré tout la simulation ne peut pas toujours remplacer l'expérience pratique, mais permet d'appréhender les notions principales qu'il faut connaître.

Nous présentons le contenu de la partie "Simulation" dans le paragraphe IV.G et la façon dont nous l'avons conçu dans le paragraphe V.C.8.

3. Les outils d'interaction

Les outils utilisés répondent au souci d'interactivité souhaité tout en étant pour le réalisateur non informaticien d'un emploi assez aisé.

Prenons l'exemple de deux machines de niveaux d'interactivité extrêmes : le Minitel et le CD-I (disque compact interactif). Le Minitel a un niveau d'interactivité faible; en effet du début à la fin du programme l'utilisateur répond à des questions qui se suivent, il est alors fortement guidé. A l'opposé, le CD-I est une machine qui laisse naviguer son utilisateur librement à l'intérieur du programme : l'apprenant peut choisir de voir le chapitre 2 ou le chapitre 15 et par exemple, revenir au chapitre 3. Pour le réalisateur, ceci peut devenir une difficulté que nous évoquerons dans le chapitre VI "Conception du didacticiel".

Outre ces deux types de machines dédiées, l'ordinateur est d'une utilisation plus variée. Il peut notamment s'utiliser comme une machine interactive.

a. L'ordinateur et son interface

La série de didacticiels des méthodes physico-chimiques d'analyse est développée sur des micro-ordinateurs de type PC qui sont très répandus dans les laboratoires industriels. La première interface ergonomique intégrant des fenêtres a été Visi-On de la société VISICORP en 1982. Puis MICROSOFT, sa rivale, a présenté MS-WIN qui a évolué en WINDOWS [16] avec ses accessoires: souris, boîtes, ascenseur, ... rendant l'ordinateur plus facile d'utilisation par tous. Pour cette raison, le logiciel de développement du didacticiel est conçu pour être utilisé avec WINDOWS.

L'intérêt de cette interface graphique est de prendre en compte les problèmes de l'utilisateur moyen. WINDOWS est doté de fonctions, qui ont demandé une programmation probablement longue et complexe, mais qui permettent aujourd'hui de développer une application d'une manière très intuitive. Par exemple, lors de l'affichage d'un dessin ou d'un commentaire, il suffit de sélectionner l'objet à déplacer et de le positionner à l'endroit désiré. Automatiquement sa position est enregistrée et au prochain affichage, l'objet réapparaîtra à cet endroit précis.

Pour réaliser ce didacticiel, nous avons utilisé le logiciel AUTHORWARE PROFESSIONAL 1.0 de la société MACROMEDIA. Il utilise les fonctions de WINDOWS, c'est à dire qu' il est possible d'y introduire très facilement du texte ou des images, des zones "boutons" sur lesquelles il faut "cliquer"¹, de créer des zones sensibles ou des mouvements d'objets.

Bien que ce ne soit pas la panacée (la machine idéale étant celle obéirait au doigt et à la voix; elle existe, mais n'est pas encore très répandue), l'interface graphique WINDOWS utilise intensément la souris. C'est un outil très utilisé avec les systèmes modernes de micro-informatique. Certaines interactions peuvent être par exemple : prendre un objet avec la souris et le déplacer pour le positionner dans une zone "correcte", ceci afin de vérifier que l'élève a bien saisi l'information qui lui a été précédemment transmise. Mais, la souris est surtout utilisée pour faire un choix dans une liste en permanence à l'écran (menu fixe) ou affiché à la demande (menu déroulant), pour passer à l'écran suivant ou précédent.

¹ Appuyer sur le bouton de gauche de la souris lorsque son curseur-flèche se trouve dans cette zone.

b. Une machine dédiée : le CD-I disque compact interactif

Bien que le didacticiel n'utilise pas ce support, son emploi est appelé à prendre un essor important dans un avenir proche. Sa commercialisation par PHILIPS, en France, date de septembre 1992. Ce produit s'annonce capable de lire des C.D. musicaux et "photo", des C.D. ROM, des vidéodisques. Il a donc des chances de se développer rapidement, d'autant que, dès sa mise en vente, il était proposé avec un catalogue de 50 titres comprenant entre autres certains jeux qui sont par principe interactifs. Actuellement, il est difficile de s'orienter vers ce type de support, puisqu'il n'est pas encore répandu et qu'il est proposé à un tarif très voisin d'un micro-ordinateur qui lui, peut être utilisé à d'autres fins (surtout dans le laboratoire d'analyse d'une entreprise). Les principaux avantages du CD-I reposent sur la simplicité de son appareillage et sur la simplicité de son installation. Ayant été conçu pour le grand public, le CD-I ne devrait pas lui faire peur, contrairement à un micro-ordinateur et ses multiples périphériques dont les possibilités d'interactions sont beaucoup plus nombreuses que la simple flèche cliquant sur une zone active ou que les touches de la télécommande. L'ordinateur possède un clavier, une souris, une manette de jeu et parfois un écran tactile. Le CD-I et l'ordinateur peuvent l'un et l'autre, lire des images stockées sur C.D..

B. LES ANIMATIONS

Ce sont des moyens très performants pour l'enseignement technique et scientifique. Dans le cas qui nous concerne, les animations permettent d'expliquer clairement ce qui se produit à l'intérieur d'un détecteur ou de la colonne de chromatographie. Elles offrent sous un aspect plaisant, une image schématique de ce qui se produit effectivement. Bien souvent, ce qu'elles représentent serait invisible et par conséquent, la réalité ne pourrait même pas être présentée ou filmée. Là encore l'informatique apporte un avantage, par rapport à un autre média (livre, vidéo...) par la possibilité de revoir facilement (autant de fois qu'il est nécessaire) l'animation.

C. PRÉVISION DE LA PLACE DE L'E.A.O.

Dès ses débuts, dans les années 1960, l'E.A.O. a rencontré des oppositions, ses détracteurs considéraient que: "...remplacer les enseignants par des machines est une démission...", et que cela revenait "... à abandonner les élèves à eux-mêmes..."[18]. A la fin des années 1980, l'idée de renforcer la formation traditionnelle qui manque cruellement d'enseignants par l'E.A.O. s'est développée. On se tourne avec espoir vers les nouvelles technologies que sont l'ordinateur et le compact-disc interactif (CD-I). Certains pensent maintenant que "... le CD-I donnera le vrai départ de l'E.A.O. dont on parle depuis de nombreuses années, mais pour lequel la micro-informatique traditionnelle n'apportait pas vraiment de concept nouveau par rapport à l'enseignement classique." [19]. ALFONSI [18] prévoit même un bel avenir à ce type de support, en présentant, comme argument majeur, le manque critique d'enseignants à l'horizon de l'an 2000.

Lorsque des phénomènes ayant lieu dans différentes conditions peuvent être corrélés par des équations mathématiques, il est possible, à partir de ces dernières, de calculer ce qui se produirait dans d'autres conditions voisines mais non étudiées dans la réalité. Là, l'informatique s'impose sans conteste dès qu'il s'agit de faire des calculs.

D. LE COÛT D'UN DIDACTICIEL

"Si vous trouvez que l'E.A.O. coûte cher, essayez l'ignorance" [14].

VAUTIER [20] prétend que: "Pour un programme d'E.A.O. classique, le coût de création est d'environ 2 hommes-mois, pour une heure de déroulement élève. Par ailleurs, il faut noter qu'une heure d'E.A.O. correspond à 2 ou 4 heures de formation classique".

Ce didacticiel de chromatographie nécessite un temps minimal de 6 heures pour être suivi (compris ??) par un utilisateur ayant une bonne maîtrise des généralités de la chromatographie. Ce temps est une estimation. Il a fallu un an à temps complet pour réaliser ce travail.

E. LES LIMITATIONS D'UN DIDACTICIEL

L'aide à l'apprentissage, que représente l'utilisation d'un didacticiel, ne peut remplacer en aucun cas l'expérience réelle. C'est un outils supplémentaire pour l'enseignement qui s'adapte au rythme de l'élève.

IV. CONTENU DU DIDACTICIEL

A. PRÉSENTATION

Ce chapitre permet de citer les sources du contenu du didacticiel. Une partie du didacticiel y est présentée ainsi que certaines interactions et quelques graphiques. D'autres interactions sont présentées en détail dans le chapitre V "*Conception*".

Le plan du didacticiel est le suivant :

- Introduction
- Généralités de la chromatographie en phase liquide
- La chromatographie de partage
- La chromatographie d'exclusion
- La chromatographie d'adsorption
- Les chromatographies ioniques
- Notions d'appareillage
- Evaluation finale

B. ASPECTS GÉNÉRAUX DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE

1. La chromatographie en phase liquide moderne

A l'origine, la chromatographie en phase liquide se faisait avec des colonnes en verre. Le liquide traversait la phase stationnaire par gravité ou sous faible pression.

Le didacticiel présente une animation d'une séparation dans une colonne de verre ouverte (Fig.4.1), puis fermée. Le liquide est alors poussé par une pompe péristaltique (Fig.4.2). Puis, pour augmenter le débit (gagner du temps), des essais ont été effectués sous pression plus forte. C'est ce que l'on a appelé la Chromatographie Liquide sous Haute Pression (C.L.H.P.) (Fig.4.3).

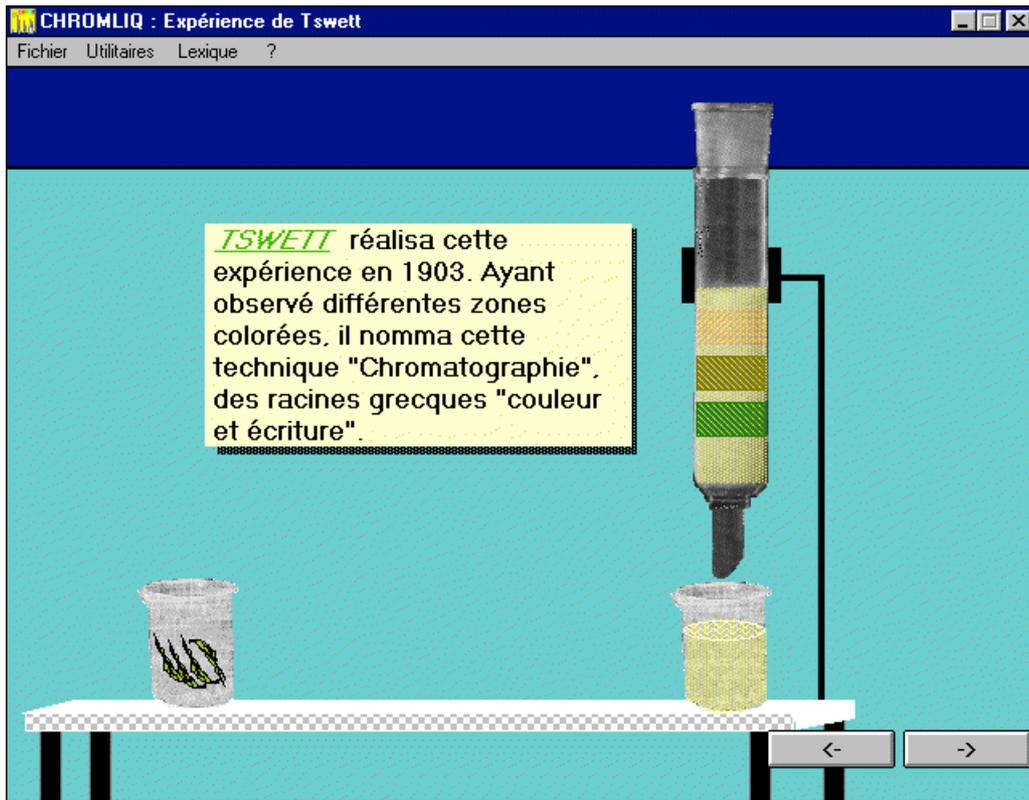


Fig. 4.1 Image de l'animation de la chromatographie sous gravité.

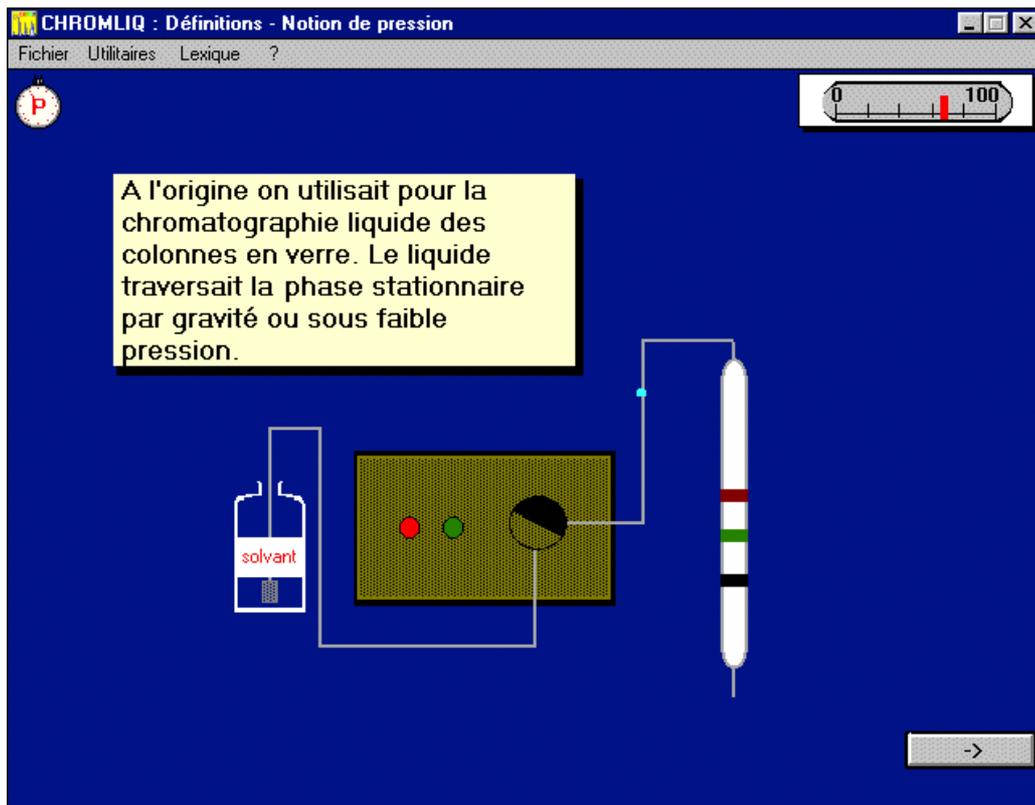


Fig. 4.2 Image de l'animation de la chromatographie sous faible pression.

Après d'autres modifications (taille des particules..), le P de Pression est devenu le P de Performance. [21]. Aujourd'hui la C.L.H.P. est la Chromatographie Liquide Haute Performance. Performante, car cette technique peut effectuer des séparations plus difficiles. Les quantités de solutés sont plus faibles. Les pics sont beaucoup plus fins et la résolution est nettement meilleure.

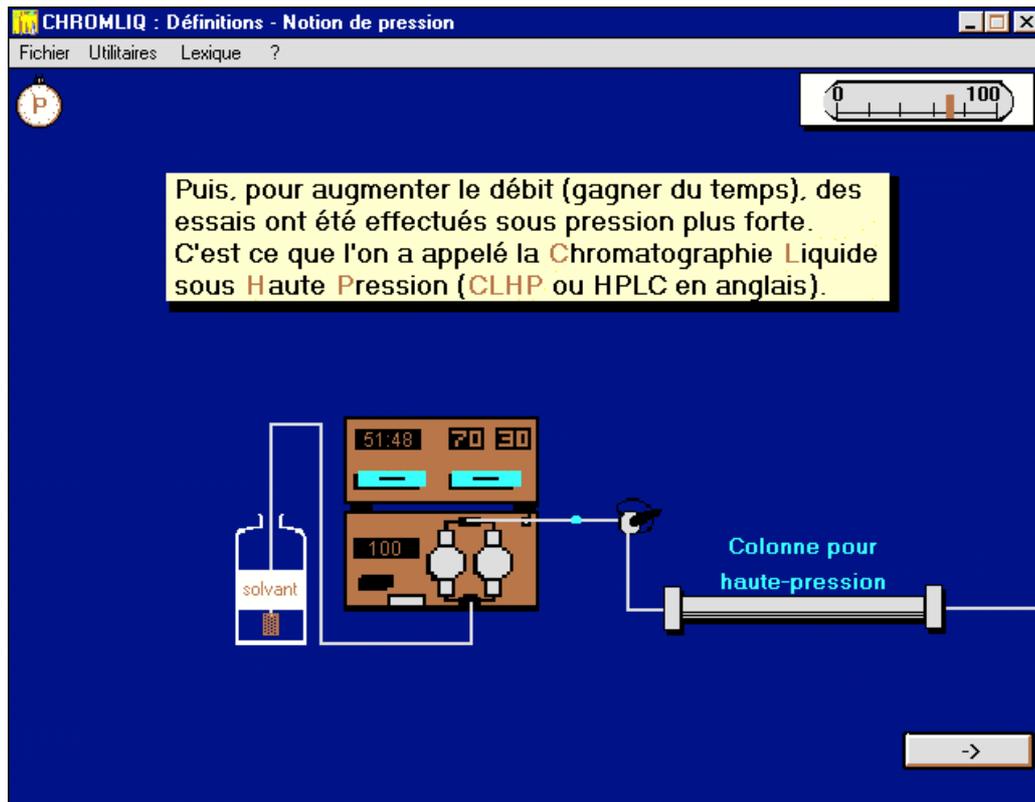


Fig.4.3 Image de l'animation de la chromatographie sous haute pression.

2. Polarité et chromatographie

La polarité est un terme très utilisé en chromatographie. Elle indique la capacité d'un composé d'interagir sur un autre [22, 23]. La polarité dépend de l'effet du champ électrique dans le voisinage immédiat d'une molécule [24]. Ce champ dépend:

- de l'arrangement des atomes
- du type de liaison
- des groupements fonctionnels.

a. Polarité et polarisabilité d'une molécule isolée

Les molécules qui possèdent un moment dipolaire permanent, résultant de la dissymétrie de l'édifice moléculaire, sont dites **polaires** : les électrons de la molécule ne sont pas uniformément répartis autour d'elle. Ce moment dipolaire provoque un champ électrique local permanent.

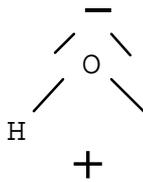


Fig.4.4 Molécule d'eau et la position de ses pôles électriques.

Le moment dipolaire \vec{p} s'exprime par la relation :

$$\vec{p} = q \cdot \vec{d}$$

avec q : la charge électrique en Coulomb (C)

\vec{d} : la distance entre les 2 pôles en mètre (m)

et \vec{p} : le moment est exprimé en Coulomb.mètre (C.m). Les chimistes utilisent le Debye D : $1D = 3,3356 \cdot 10^{-30} \text{C.m}$ [25].

Sous l'action d'un champ électrique extérieur, les dipôles permanents tendent à s'orienter par rotation, parallèlement à la direction du champ. Sur certaines molécules qui ne possèdent pas de moment dipolaire permanent, un champ électrique peut créer un moment dipolaire induit, en déformant les orbitales électroniques ou en modifiant la position relative des atomes [26]. Ces molécules sont dites polarisables. Elles le sont plus ou moins en fonction de leur taille ainsi que des possibilités de conjugaisons de leurs liaisons (insaturations). "On appelle *polarisabilité*, la facilité avec laquelle un nuage électronique se déforme sous l'influence d'un champ électrique." [27].

Le moment dipolaire d'une molécule peut être modifié ou créé par le champ électrique d'une molécule voisine qui possède un moment dipolaire. C'est l'interaction d'une molécule polaire sur une molécule non polaire.

b. Forces liées à la polarité des molécules

Les forces qui sont mises en jeu dans les notions de polarité d'une molécule sont présentées notamment par KASTLER et col. [28], MILLER [29] et ROSSET et col. [22]. Ces forces sont de plusieurs types :

1. les interactions diélectriques ou ioniques

Ces interactions sont relativement fortes. Un ion induit un champ électrique. Ce champ oriente les molécules qui sont proches de l'ion et qui possèdent un moment dipolaire.

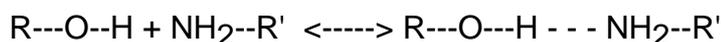
Les forces entre les ions de même charge sont répulsives. Elles sont attractives entre les ions de charge opposée. La principale illustration des interactions ioniques, en chromatographie en phase liquide, est l'échange d'ions. Le soluté est au moins partiellement ionisé et la phase stationnaire possède des sites ioniques. Les ions sont attirés et repoussés par les fonctions polaires d'une molécule ayant un moment dipolaire. Ces effets sont très importants en chromatographie ionique, mais également en chromatographie non ionique, en milieu aqueux : la polarité de la phase stationnaire peut agir sur la rétention des solutés ioniques.

2. les liaisons "hydrogène".

L'hydrogène est le plus petit des atomes. Il peut être fortement attiré par des atomes attracteurs de protons (électronégatifs) petits eux aussi. Les interactions sont alors importantes. Parmi les forces liées à la polarité des molécules et présentées dans ce chapitre, les forces des liaisons "hydrogène" sont relativement fortes. Malgré ceci, comparée à la liaison covalente ou à la liaison ionique, la liaison hydrogène est faible. Elle peut se former entre une molécule qui possède un H lié à un atome électronégatif comme un oxygène, un fluor ou un

azote. HILL [50, 51] propose d'appeler la liaison "Hydrogène", liaison H-FON, puisque ce type de liaison ne s'établit qu'entre un atome d'hydrogène et un fluor, un oxygène ou un azote.

Les molécules qui contiennent "H", et celles qui possèdent un atome électronégatif, sont alors associées.



Dans l'exemple présenté dans le didacticiel [49], le doublet de l'azote est accepteur de protons. Le groupement hydroxyle est donneur de proton. Il peut y avoir création d'une liaison Hydrogène.

3. Les forces de VAN DER WAALS

Trois autres forces interviennent dans la polarité d'une molécule. Elles sont connues sous le nom de forces de **VAN DER WAALS**. Ce sont les forces de LONDON, de DEBYE et de KEESOM [29,30]. Ce sont des forces relativement faibles, comparées aux forces de la liaison hydrogène ou aux interactions diélectriques.

Ces cinq **forces** jouent un rôle important sur les interactions entre molécules. Dans le didacticiel, chacune de ces forces est présentée par une animation pour aider à sa compréhension.

A l'exception de la chromatographie ionique, la devise suivante est la règle:

Qui se ressemble, s'assemble !!!

Plus une molécule est polaire, plus elle a d'effet sur une autre, par les interactions précédemment citées. Une molécule polaire est capable d'interagir sur une molécule polarisable de la même manière qu'un dipôle peut en induire un autre dans une molécule voisine.

La distribution d'un soluté entre les deux phases (stationnaire et mobile) est déterminée par les interactions entre :

- soluté et phase stationnaire
- soluté et phase mobile
- phase stationnaire et phase mobile

Pour qu'il y ait séparation de molécules différentes, il faut que les molécules n'interagissent pas de la même manière avec chacune des phases (stationnaire et mobile). La séparation ne peut se faire que si l'un des solutés a plus d'affinité¹ avec la phase stationnaire que les autres, ou bien plus d'affinité avec la phase mobile. Si la polarité de la phase stationnaire est semblable à celle de la phase mobile, les interactions avec les différents solutés risquent d'être trop proches. Il n'y aura pas de séparation : tous les composés sortiront en même temps.

c. Echelles de polarité

Pour quantifier la polarité, il faut faire des mesures comparatives. Pour cela, on utilise différentes molécules "témoins" que l'on place arbitrairement sur une échelle de polarité. La Chimie organique possède une définition (et donc une échelle de polarité) qui est différente de celles utilisées en C.L.H.P..

Les échelles de polarité les plus courantes sont :

- la force éluante de SNYDER ϵ_0 (énergie libre d'adsorption par unité de surface) utilisée en chromatographie d'adsorption,
- la force éluante S^* utilisée en chromatographie de partage (reliée à la teneur en solvant le plus éluant),
- le paramètre de solubilité de HILDEBRAND δ (fonction de l'énergie moléculaire de cohésion ou vaporisation et du volume molaire de la molécule),
- la polarité P' calculée par SNYDER d'après la méthode de ROHRSCHEIDER pour la chromatographie en phase gazeuse. [31]

d. Polarité de phase

¹Affinité chimique : tendance de 2 corps à entrer en combinaison chimique. On la mesure par la variation d'enthalpie libre pendant la réaction à volume constant (ou à pression constante) [28].

A l'origine, les colonnes étaient remplies de silice qui est une phase stationnaire polaire. Elle doit sa polarité aux groupements silanols Si-OH qui sont polaires. 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 ont été enrobées de paraffine en C₁₈ pour en 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**.

Qui se ressemble, s'assemble !!!

- Plus la phase stationnaire est **polaire**, plus elle a d'affinité pour les solutés **polaires**.

- Plus la phase stationnaire est **apolaire**, plus elle a d'affinité pour les solutés **apolaires**.

- Plus la phase mobile est **polaire**, plus elle a tendance à entraîner les solutés **polaires**.

- Plus la phase mobile est **apolaire**, plus elle a tendance à entraîner les solutés **apolaires**.

3. Différents modes de séparation

Différents modes de séparation existent en chromatographie en phase liquide :

l'adsorption,

le partage (c'est le principal mode, il représente 80% des séparations),

l'échange d'ions,

l'exclusion.

Les trois premiers types utilisent la polarité des solutés pour les séparer. La séparation par *exclusion* n'est pas basée sur la polarité. Ces quatre modes de séparation sont présentés dans le didacticiel et correspondent chacun à un chapitre.

4. Variation de la phase mobile

Dans la pratique, chaque séparation nécessite un niveau précis de polarité de la phase mobile. Il faut ajuster sa force éluante en fonction des solutés à séparer, et parfois, en cours d'analyse. On réalise alors un **gradient d'éluion**, 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.

Si le mélange de différents solvants ne varie pas au cours de la séparation, on dit travailler en mode **isocratique**.

Ces 2 modes sont utilisés pour des analyses en chromatographie à polarité de phase normale ou inversée. Dans la pratique on préfère, si c'est possible, travailler en mode isocratique. C'est un compromis entre le temps d'analyse, qui est plus long dans le deuxième mode et le temps d'équilibre, obligatoire en utilisant un gradient d'éluion. Cet équilibre est nécessaire avant chaque nouvelle injection pour obtenir un chromatogramme reproductible.

En début d'analyse, la force éluante doit être suffisamment faible pour retarder quelque temps les composés peu retenus. Puis progressivement, en changeant la composition de la phase mobile, on augmente la force éluante pour entraîner les solutés ayant plus d'affinité avec la phase stationnaire. Pour faire varier la force éluante, on utilise des pompes capables de créer un mélange de solvant automatiquement.

Les différents types de pompes sont présentés dans le paragraphe "Notions d'appareillage" de ce chapitre.

5. Différences avec la chromatographie en phase gazeuse

Les généralités sur la chromatographie restent valables pour la CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE. **Cette technique s'applique à tous les produits solubles.**

Contrairement à la chromatographie en phase gazeuse (CPG), en phase liquide, une interaction est possible entre le soluté et la phase mobile, d'autant plus importante que la température T est basse. Cette interaction peut modifier les valeurs du coefficient de partage K et du facteur de capacité k' .



Fig.4.4 La chromatographie en phase gazeuse est différente de celle en phase liquide.

Les différences importantes entre la CPG et la CLHP sont liées à des paramètres physiques qui interviennent dans la séparation :

- les liquides sont incompressibles. Une animation présente deux pistons qui sont en mouvement. Le premier est sensé comprimer un gaz, il présente une grande course. Le second, sensé comprimer un liquide, ne présente qu'une simple oscillation autour de sa position d'origine pour montrer que le volume d'un liquide ne varie pas avec la pression;

- la viscosité des liquides est environ 100 fois plus grande que celle des gaz;
- les coefficients de diffusion molaire du soluté dans la phase mobile sont 10 000 à 100 000 fois plus petits dans les liquides que dans les gaz.

a. Conséquences de ces différences

1. Sur la vitesse de la phase mobile

En CLHP, la vitesse de la phase mobile est constante en tout point de la colonne. Il n'y a pas de perte d'efficacité le long de la colonne, comme en CPG. La hauteur théorique d'un plateau est la même à l'entrée ou à la sortie de la colonne.

2. Sur l'élargissement des pics

Une bonne colonne est capable de séparer des produits qui ont des temps de rétention proches. Pour cela, le pic de chaque soluté doit être le plus fin possible. Les phénomènes d'élargissement des pics et la relation entre la hauteur équivalente à un plateau théorique (H.E.P.T.) et la vitesse de la phase mobile (u) ont déjà été développés dans le premier module sur les "*Généralités de la chromatographie*" [8]. Un rappel est présenté en option.

Trois facteurs sont la cause de l'élargissement des pics : la diffusion turbulente, la résistance au transfert de masse et la diffusion longitudinale. Leur contribution (H) est symbolisée par la relation suivante :

$$HEPT = f(u) = H_{\text{turbulente}} + H_{\text{transfert de masse}} + H_{\text{longitudinale}}$$

1. La diffusion turbulente.

Pour expliquer l'élargissement dû à la diffusion turbulente, nous présentons à l'écran une photographie de grains de phase stationnaire prise au microscope électronique à balayage. Une animation présente les différents chemins parcourus par des molécules d'une même sorte de soluté. La longueur des chemins n'étant pas la même, elles ne mettent pas toutes le même temps pour traverser la colonne, donc le pic s'élargit. Ce phénomène est appelé *anisotropie d'écoulement* et est symbolisé par la lettre A.

$H_{\text{turbulente}} = A$

A est fonction des particules et de la régularité du remplissage de la colonne.
[22, 32]

2. La résistance au transfert de masse

L'élargissement s'explique aussi par l'accumulation de la phase mobile dans les anfractuosités du support : les molécules qui diffusent dans cette poche vont moins vite que celles qui n'y diffusent pas.

L'accumulation de la phase mobile est plus importante en milieu liquide qu'en milieu gazeux. La résistance au transfert de masse y est plus importante. Le soluté peut aussi diffuser l'intérieur de la phase stationnaire, ce qui réduit encore la vitesse d'échange et nuit à l'efficacité. Plus la vitesse de la phase mobile augmente, plus le phénomène de résistance au transfert de masse nuit à l'efficacité.

$H_{\text{transfert de masse}} = C.u$

C est une constante, u représente la vitesse de la phase mobile.

3. La diffusion longitudinale

Le coefficient de diffusion molaire est beaucoup plus faible en milieu liquide qu'en milieu gazeux. Cette diffusion malgré tout existe. Elle peut être comparée au mouvement brownien [32]. Elle permet d'expliquer une partie de l'élargissement des pics.

Le didacticiel introduit cette notion de diffusion longitudinale à l'aide d'une animation. Plus la vitesse de la phase mobile (u) augmente, plus cet élargissement est faible.

$H_{\text{longitudinale}} = B/u$

Dans la pratique la diffusion longitudinale est négligeable à des vitesses ordinaires de phase mobile en milieu liquide [32].

b. Comparaison CPG / C.L.H.P.

A titre d'exemple, les ordres de grandeurs sur les valeurs classiques utilisées en C.P.G. et en C.L.H.P. sont présentées dans un tableau.

	CPG remplie	CPG capillaire	C.L.H.P.
Longueur de la colonne	2 à 5m	10 à 50m	0,05 à 0,3m
Diamètre interne de la colonne	2mm	0,10 à 0,53 mm	4,6mm
Débit de la phase mobile dans la colonne	20 à 30cm ³ /min.	1 à 2cm ³ /min.	1 à 5cm ³ /min.
Pression en tête de la colonne	1 à 5.10 ⁵ Pa	0,5 à 1.10 ⁵ Pa	0,5.10 ⁵ à 50.10 ⁵ Pa
Granulométrie du remplissage	100 à 600µm	vide	3 à 10µm

c. Utilisation des grandeurs réduites

Pour faciliter la comparaison de séparations chromatographiques ou bien pour tester des colonnes, on définit des "grandeurs réduites" par analogie avec le génie chimique. L'introduction des grandeurs réduites en chromatographie en phase liquide est présentée en 1977 par KNOX [33].

Elles corrigent les différences "gaz/liquide", comme par exemple le coefficient de diffusion molaire ou la taille des particules [32,33,34]. L'utilisation des grandeurs réduites (h, v, l) plutôt que les grandeurs absolues (H, u, L) permet de comparer les performances de différents types de colonnes, selon la granulométrie des phases de remplissage, la viscosité des solvants et le coefficient de diffusion des solutés [35]. Toutes les grandeurs réduites sont sans dimension.

C. LA CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE

Parmi les techniques utilisées en chromatographie en phase liquide, la chromatographie de partage est la plus importante..

Les objectifs de ce chapitre dans le didacticiel sont de faire comprendre :

- ce qu'est le partage des molécules,
- quelles sont les applications de la chromatographie de partage,
- pourquoi et comment les phases stationnaires modernes de C.L.H.P. sont greffées.

1. Principe

Une animation montre deux particules (A et B) de 2 solutés différents. L'une (A) est retenue sur le grain de remplissage, mais pas l'autre (B). Cette animation essaie de présenter la séparation des deux sortes de solutés par leur partage entre la phase stationnaire liquide et la phase mobile, liquide elle aussi.

- Le soluté (B) qui n'est pratiquement pas soluble dans la phase stationnaire, ne se partage pas entre les 2 liquides. Il n'est pratiquement pas retenu.

- Le soluté (A) a une certaine solubilité dans la phase stationnaire (tout en étant soluble aussi dans l'éluant). Globalement, il a une rétention plus importante que le soluté (B).

2. Phase stationnaire

A l'origine, pour travailler en phase inverse, les particules de silice ou d'alumine étaient enrobées de molécules de phase stationnaire "liquide"¹ de type hydrocarbure, en général des paraffines, alcanes en C₈ ou C₁₈ (octane ou octadécane). La chromatographie de partage est aussi appelée chromatographie liquide-liquide (C.L.L.) .

A force d'être utilisé, ce "liquide" se solubilisait petit à petit dans la phase mobile. L'enrobage diminuant, les possibilités de la colonne s'altéraient

¹"liquide" est entre guillemets car à température ambiante les alcanes en C₈ ou C₁₈ sont liquides ou pâteux.

rapidement, selon les solvants utilisés. C'est la raison pour laquelle on utilise actuellement la technique de greffage de la phase stationnaire.

Une animation présente la réaction de greffage par la méthode de la "chimie au lasso". Le greffage augmente la durée de vie de la colonne. Puis la liste suivante des principaux greffons est présentée : les polaires (amines, nitriles, diols) puis les apolaires (alkyles et phényles). Puis, le didacticiel présente les phases stationnaires polymériques avec leurs avantages et leurs inconvénients.

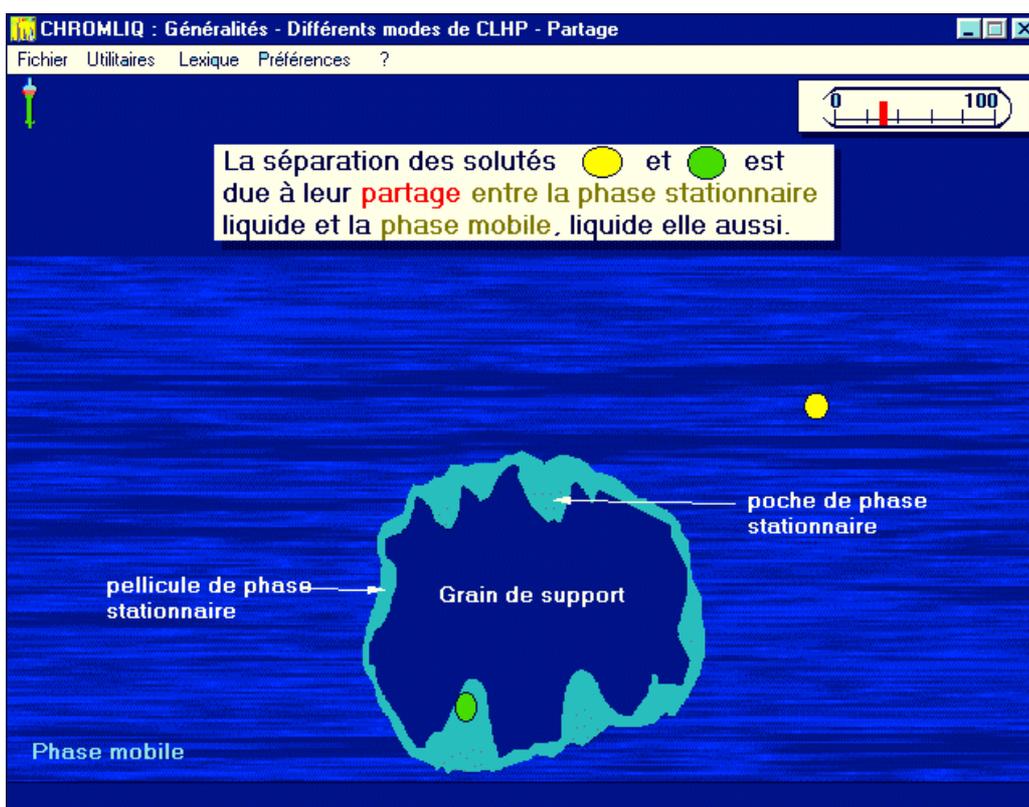


Fig.4.5 Séparation par partage du soluté entre les 2 phases (stationnaire et mobile)

3. Mécanismes de rétention

Les mécanismes, en chromatographie à polarité de phase normale et inversée, sont présentés sous forme d'animations. Ils montrent le partage du soluté entre la phase mobile et la phase stationnaire.

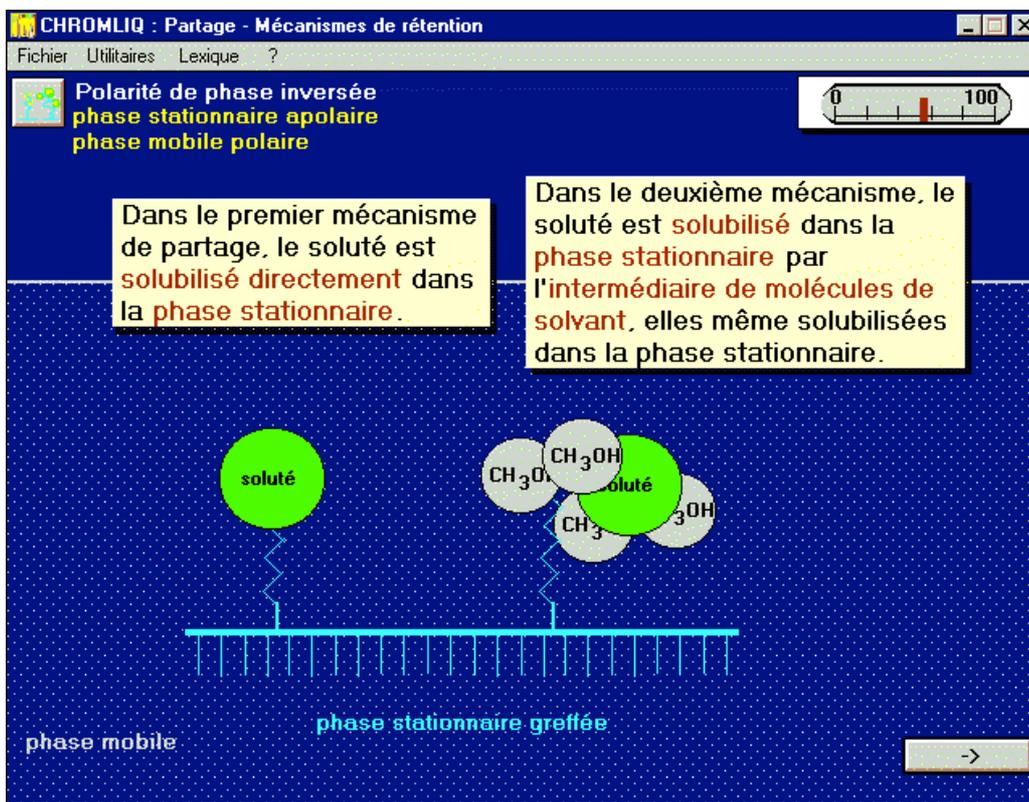


Fig. 4.6 Mécanisme de séparation en polarité de phase inversée.

Les parties "cours", que l'élève suit à la vitesse qu'il désire, sont entrecoupées d'interactions que l'on peut comparer aux questions de l'enseignant à ses auditeurs. A la suite, quelques exercices sont proposés à l'utilisateur pour tester ses nouvelles connaissances (correspondant aux exercices dirigés). L'apprenant est toujours actif.

En conclusion de ce chapitre, on insiste sur le fait que la chromatographie liquide-liquide (C.L.L.) en polarité de phase inversée représente environ 80% des

séparations réalisées en C.L.H.P.. De nombreux solutés peuvent être séparés par ce moyen.

Malgré cela, ce chapitre est relativement court. La plupart des informations à connaître sont présentées dans le chapitre du didacticiel "Aspects généraux de la C.L.H.P.".

D. LA CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

Contrairement à la chromatographie de partage, un grand nombre de notions spécifiques à la séparation par exclusion ne sont pas présentées dans les aspects généraux. Pour cette raison nous avons notamment plus développé ce chapitre.

Les objectifs de ce chapitre dans le didacticiel sont de présenter :

- le principe de l'exclusion des molécules,
- les applications de la chromatographie d'exclusion.

L'apprenant connaîtra :

- les particularités des phases stationnaires utilisées,
- le principe de l'étalonnage.

1. Principe

En première approximation, il n'y a pas d'interaction entre le soluté et la phase stationnaire dans ce type de chromatographie. La phase stationnaire est généralement un polymère poreux non imprégné, à l'intérieur duquel les molécules solubilisées du soluté peuvent plus ou moins pénétrer en fonction de leur taille et seront donc plus ou moins retenues dans la colonne.

Les molécules dont le volume de solvation¹ est le plus important sortent les premières : elles sont exclues de la phase stationnaire.

Les molécules dont le volume de solvation est le moins important sortent les dernières puisque chacune d'elles a pu, en moyenne, pénétrer dans un grand nombre de pores de la phase stationnaire. C'est donc le volume de solvation qui conditionne la séparation. Il est fonction de la masse moléculaire, pour une même famille de molécules.

La rétention des molécules est fonction de leur taille.

¹Volume d'une molécule de soluté entourée de molécules de solvant.

Dans la suite de ce didacticiel, on utilisera par abus de langage le terme G.P.C. (Gel Permeation Chromatography) pour tous les types de chromatographie d'exclusion quelle que soit la phase mobile, car la perméation de gel fut la première utilisée.

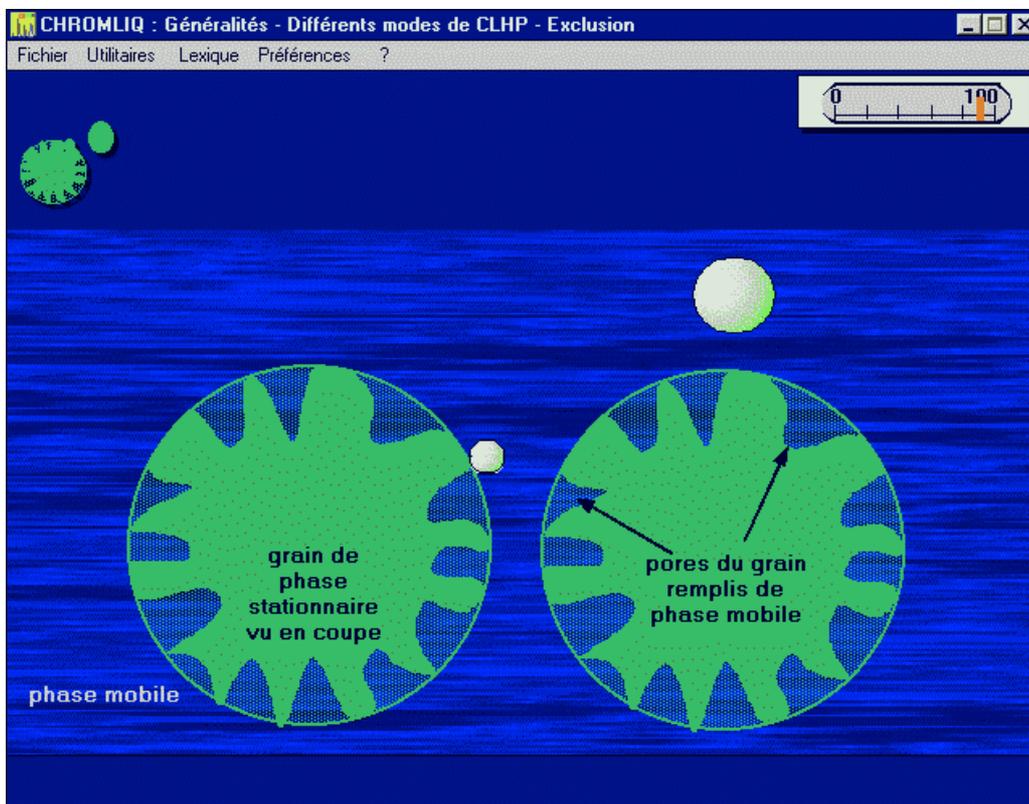


Fig. 4.7 Animation représentant la chromatographie d'exclusion.

2. Phase stationnaire

La phase stationnaire en chromatographie d'exclusion est particulière puisque l'on utilise uniquement sa porosité et non pas sa surface. Nous avons vu dans le paragraphe "Principe" qu'une molécule peut pénétrer dans tous les pores ou dans aucun. Entre ces 2 extrêmes, les molécules de tailles intermédiaires pénètrent dans certains pores et sont exclues de certains autres. Elles auront des temps de rétention intermédiaires.

Le volume de rétention en G.P.C., est normalement inférieur au volume mort classique. Pour l'interprétation des chromatogrammes, on introduit les notions de volume interstitiel (volume compris entre les particules de phase stationnaire,

aussi appelé volume extraparticulaire) et poreux (volume des pores de la phase stationnaire).

3. Etalonnage

a. Etalonnage relatif

Pour une colonne donnée, traversée par une molécule de soluté, le volume de rétention de cette molécule est fonction de sa masse moléculaire.

A cet endroit du didacticiel, on présente des courbes d'étalonnage de différentes colonnes. Ces colonnes ne couvrent pas la même gamme de masses.(Fig.4.8).

En fonction du type de macromolécules à caractériser, on choisit la ou les colonnes à utiliser, mises bout à bout. La ou les colonnes choisies doivent permettre de séparer une gamme de masses suffisamment large autour de la valeurs de la masse de l'échantillon à caractériser. Chaque colonne est étalonnée en traçant une courbe reliant les temps ou les volumes de rétention de ces molécules de masses molaires données aux logarithmes des masses. Des homopolymères témoins de masses connues sont utilisés à cette effet. Mais un copolymère de masse similaire n'a pas forcément le même volume de solvatation. Il n'a donc pas le même volume d'élution. Les résultats des calculs des masses seront **relatifs** à un type de polymère témoin.

Comme le calcul de la masse est fondée sur la mesure du volume de rétention, il est impératif de bien le connaître. Le débit de la phase mobile doit être stable, ce qui exige l'emploi d'une excellente pompe. Généralement, pour limiter les effets de fluctuation de débit, on utilise un "étalon interne". C'est un composé ayant un volume de rétention reproductible et facilement repérable sur le chromatogramme.

La question suivante est posée à l'élève :

Où doit-on faire sortir l'étalon interne en G.P.C. ?

Au début ou à la fin du chromatogramme ?

Si cet étalon sort en tête, on ne peut pas savoir d'une part, si le système chromatographique ne varie pas après la sortie de ce produit. D'autre part, ce sont les masses élevées qui sortent en premier. L'étalon interne devrait être macromoléculaire, donc trop cher à se procurer en quantité suffisante pour obtenir un pic fin, dont la mesure du temps (ou volume) d'élution soit précise.

Image absente

Fig.4.8 Courbes d'étalonnages de différentes colonnes d'exclusion.

Sortant en fin de chromatogramme, le temps de rétention de l'étalon interne permet de vérifier que le système chromatographique n'a pas varié et que le débit est resté constant tout au long de l'analyse. Si le temps de rétention de l'étalon interne a varié, il suffit de décaler proportionnellement la courbe d'étalonnage pour obtenir un calcul le plus exact possible de la masse moyenne de l'échantillon à caractériser. Le décalage est plus sensible pour les produits sortant en tête car les courbes d'étalonnage sont logarithmiques. Si l'échantillon comporte des masses élevées, la moindre variation de débit peut engendrer une erreur très importante sur la valeur calculée de la **masse moléculaire moyenne en poids¹ M_p** . Cette erreur est compensée par le repérage de l'étalon interne.

Un exemple inspiré du calcul proposé par PILAR [36] est présenté aux élèves dans le didacticiel, sur ce que sont M_p et M_n . **M_n est la masse moléculaire moyenne en nombre.**

Pour comparer des lots entre eux, la meilleure méthode est de superposer les chromatogrammes obtenus (ou observation par transparence)[48].

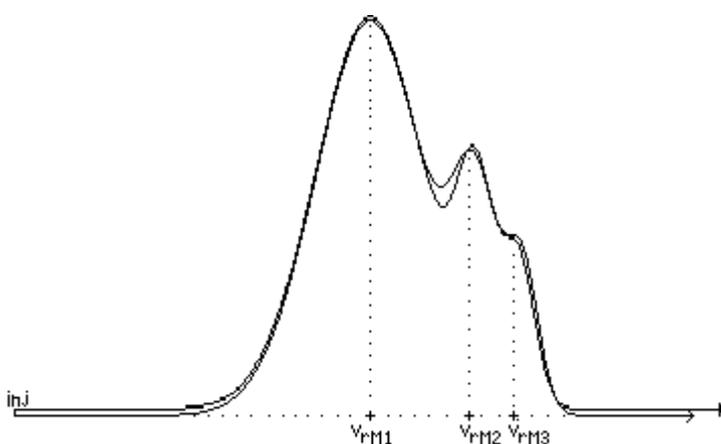


Fig.4.9 Superposition de 2 chromatogrammes de G.P.C. d'échantillons similaires

A la fin de la partie explicative sur l'étalonnage relatif, une interaction est proposée à l'apprenant. Il peut construire une courbe d'étalonnage relative aux polystyrènes : $\log M = f(t_r)$. La difficulté majeure est de placer des points sur une échelle logarithmique.

¹Les différentes masses caractérisant une macromolécule sont M_p et M_n mais aussi parfois M_z [35]. Voir les définitions en Annexe B-2.

b. Etalonnage absolu

Pour la plupart des applications, l'obtention des valeurs relatives de M_p et de M_n est suffisante, car la chromatographie d'exclusion est utilisée principalement comme contrôle de la qualité de fabrication. Cependant, il peut être parfois intéressant de vérifier l'approximation faite par l'étalonnage relatif. Lorsque l'on a besoin de valeurs exactes, il faut utiliser une technique plus perfectionnée : l'étalonnage universel.

La méthode d'étalonnage universel, introduite en 1966 par BENOIT et al. [37], est fondée sur le fait que les molécules de masse M se séparent en fonction de leur volume hydrodynamique V_h .

$$V_h = M \cdot [\eta]$$

avec $[\eta]$ étant la viscosité intrinsèque de ces molécules [22]:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{\text{solution}} - \eta_{\text{solvant}}}{\eta_{\text{solvant}}} \times \frac{1}{c}$$

c étant la concentration de ces molécules.

$[\eta]$ étant la viscosité mesurée.

La viscosité est accessible à chaque instant, en mesurant la perte de charge en sortie de colonne (par exemple entre l'entrée et la sortie d'une tubulure capillaire). La valeur est transmise à un ordinateur qui effectue le calcul en temps réel. La courbe d'étalonnage universel est de la forme :

$$\log M \cdot [\eta] = f(V_r)$$

Cette relation reste applicable en milieu dilué, quel que soit le type de polymère. On étalonne toujours le système chromatographique avec des polymères témoins, et en plus on mesure la viscosité à chaque instant.

Une deuxième méthode d'obtention de la **masse moléculaire vraie** est fondée sur la relation de MARK-HOUWINK :

$$M.[\eta] = K'.M^{a+1}$$

K' et a sont des constantes pour un type de polymère.

Une troisième méthode permet d'atteindre la **masse moléculaire vraie** d'une macromolécule. Lorsque la dilution est importante, on peut utiliser la technique de diffusion de lumière LASER à angles faibles (LALLS: Low Angle LASER Light-Scattering). Les inconvénients de cette méthode sont que le coût de l'appareillage est élevé et la mise en oeuvre difficile. [37]. L'intensité de la lumière diffusée à la sortie de la colonne est mesurée à un angle d'environ 5° : cette intensité est proportionnelle à la masse moléculaire moyenne de la fraction de l'échantillon sortant.

c. Importance de la phase mobile en G.P.C.

La phase mobile doit parfaitement solubiliser le soluté. On ne peut pas la modifier durant une série d'analyses. La mise en solution peut parfois durer très longtemps (plusieurs heures).

Si la solubilité de l'échantillon dans la phase mobile est faible, la détermination des masses moléculaires peut être faussée par des mécanismes d'adsorption ou de partage. La phase mobile ne doit pas non plus gêner la détection (par exemple: pas de toluène avec un détecteur U.V.).

d. Importance de la concentration de l'échantillon

La concentration de l'échantillon ne doit pas être trop élevée, car dans ce cas, les pores de la phase stationnaire sont saturés et ne remplissent plus leur rôle.

Dans le didacticiel, une nouvelle animation présente des particules poreuses dont les pores sont occupés à cause d'une concentration trop importante. Les molécules de soluté de très faibles masses sortent en même temps que les plus grosses. On constate que les pores de la phase stationnaire sont occupés (fig.4.10) du fait d'une concentration trop importante de l'échantillon. Il n'y a plus de séparation en fonction des masses.

Image absente

Fig.4.10 Ecran d'animation représentant la surévaluation des masses, due à une concentration trop importante de l'échantillon.

4. Applications

La chromatographie d'exclusion est utilisée pour la caractérisation des macromolécules naturelles comme les protéines ou artificielles comme les polymères synthétiques. Elle peut aussi être utilisée pour séparer des solutés qui diffèrent fortement par leur masse.

E. LA CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION

L'objectif de ce chapitre du didacticiel est de faire comprendre :

- ce qu'est la chromatographie liquide-solide,
- le mécanisme de rétention par adsorption.

L'élève sera capable, en fin de parcours, de répondre aux questions suivantes :

- comment est activée la phase stationnaire ?
- quelle est la polarité du système chromatographique ?
- quel est le rôle de la surface de la phase stationnaire ?
- pourquoi cette chromatographie est-elle peu utilisée ?

1. Principe

La CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION est aussi appelée chromatographie liquide-solide (C.L.S.). La phase stationnaire est un solide non imprégné, à la surface duquel viennent se fixer les molécules de solvant et de soluté, on dit aussi "adsorber".

2. Phase stationnaire

La phase stationnaire en chromatographie d'adsorption est généralement soit de la silice non greffée, soit de l'alumine. Une des difficultés de la chromatographie d'adsorption est la préparation de la phase stationnaire. On doit éliminer des molécules d'eau de la surface des particules de remplissage par chauffage (Fig.4.11). La technique de la chimie "au lasso" est de nouveau utilisée bien qu'elle soit discutable du point de vue mécanisme de réaction chimique. L'élimination d'eau est peu reproductible. On sait difficilement maintenir constante la teneur en eau de la phase mobile. De ces faits, le nombre de sites actifs de la phase stationnaire est difficile à maîtriser.

Les chromatogrammes sont difficilement répétables par C.L.S.

Le but est de faire retenir à l'élève que l'activation de la silice correspond à une élimination d'eau.

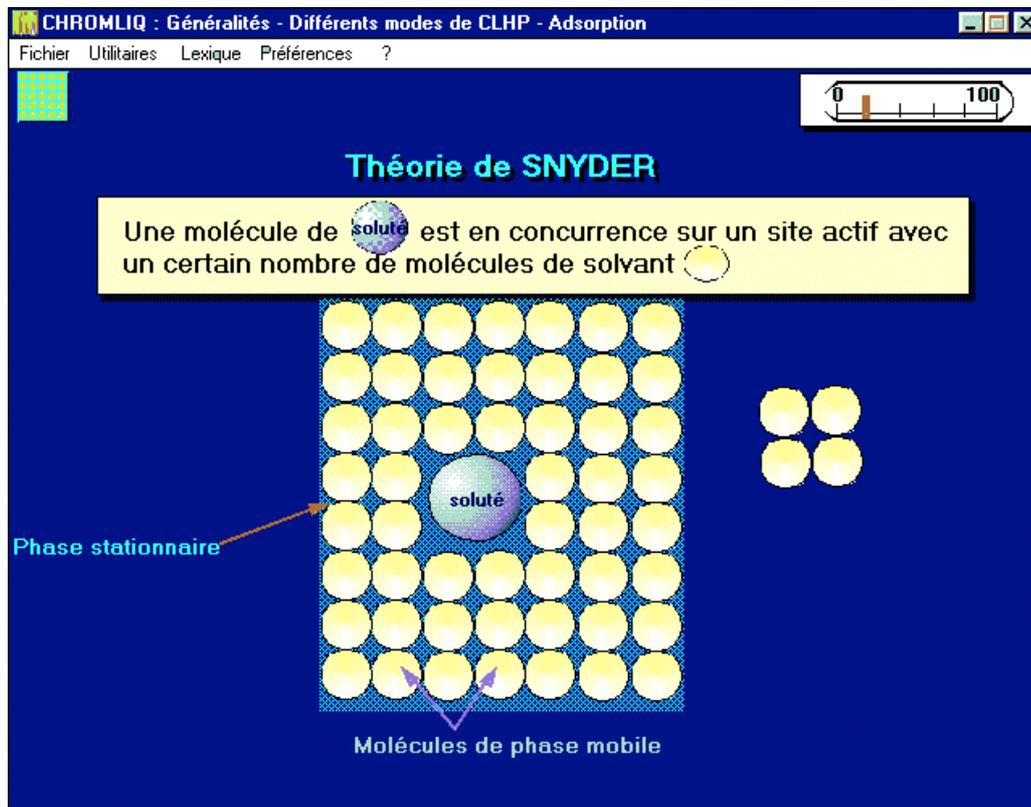


Fig.4.11 Ecran d'animation présentant l'activation de la surface de la phase stationnaire de silice.

3. Mécanismes de rétention

Une animation présente le mécanisme décrit par SNYDER [38] dans lequel une molécule de soluté est en compétition sur un site actif avec plusieurs molécules de solvant. Ce processus d'*adsorption / désorption* est à l'origine de la valeur du volume de rétention du soluté. La polarité de phase du système chromatographique est de type "normal". Les premières séparations ont été faites par adsorption.

FEIGENBAUM [39] a illustré la rétention pour des solutés de type "nitrophénols" par l'adsorption en chromatographie sur couche mince (CCM). La CCM a un mécanisme de rétention qui est comparable à celui de la CLS.

F. LA CHROMATOGRAPHIE IONIQUE

Ce chapitre du didacticiel commence par une interactivité sur les ions :
L'utilisateur doit placer l'un à côté de l'autre un cation et un anion, à l'aide de la souris.

A la fin de ce chapitre dans le didacticiel, l'élève aura des notions sur:

- la chromatographie d'échange d'ions,
- la chromatographie par appariement d'ions,
- la chromatographie d'échange d'ions avec suppresseur (chromatographie ionique).

1. Principe

Comme nous l'avons vu dans le chapitre "Chromatographie de partage", la séparation des composés ionisables est difficile à réaliser par les méthodes classiques de chromatographie. On utilise alors une des méthodes de chromatographie ionique.

Cette technique est apparue en 1975. A l'origine, la chromatographie ionique utilisait l'échange d'ions avec suppresseur (voir paragraphe 4 dans ce chapitre) couplé à une détection conductimétrique. Elle a été développée initialement pour l'analyse de l'eau.[40].

La chromatographie ionique sera probablement moins utilisée dans un avenir proche, du fait de l'apparition de la technique d'électrophorèse capillaire qui est performante et très rapide pour effectuer la séparation des ions. Pour cette raison, le chapitre "Chromatographie ionique" est assez peu développé dans le didacticiel.

2. Chromatographie d'échange d'ions

Cette technique utilise une phase sur laquelle est greffé soit un cation, soit un anion. La neutralité électrique est réalisée par un contre-ion. La rétention est basée sur les forces d'interactions (voir "*Aspects généraux*" notions de polarité)

entre l'ion de l'échantillon (en circulation dans l'éluant) et les sites ioniques de la phase stationnaire.

Une animation présente un échange d'ions, base de cette technique séparative.



Fig.4.12 Ecran d'animation représentant l'échange d'ions

Exemples d'utilisations de la chromatographie d'échange d'ions:

- analyse des ions contenus dans l'eau,
- analyse d'ions minéraux dans des milieux réactionnels,
- analyse d'anions organiques (oxalate, fumarate, maléate...).

3. Chromatographie d'appariement d'ions

La technique de l'appariement d'ions utilise une phase greffée classique (comme en C.L.L.), sur laquelle est adsorbé un ion lourd qui peut être par exemple l'alkylsulfonate.

Cette technique porte différents noms:

- la chromatographie par appariement d'ions,
- la chromatographie d'interaction d'ions,
- la chromatographie de paires d'ions....

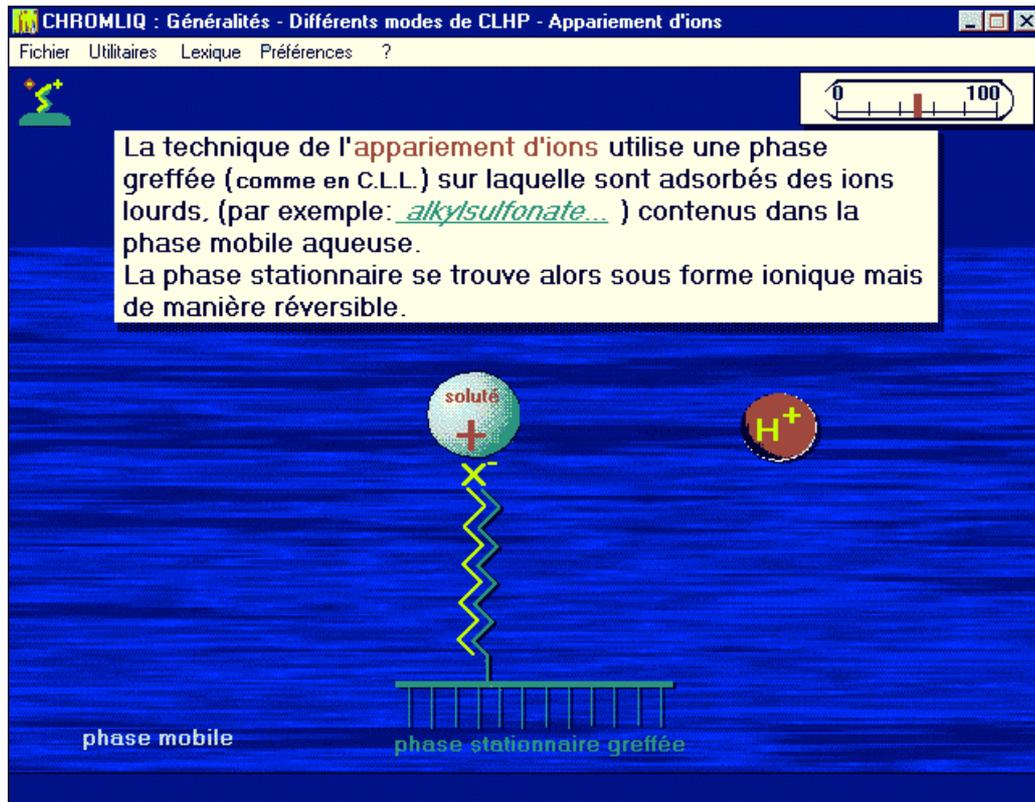


Fig.4.13 Ecran d'animation représentant l'appariement d'ions¹

La rétention du soluté est directement fonction de la teneur en ions de l'éluant. Suivant la méthode de conditionnement de colonnes ayant la même phase stationnaire, les séparations peuvent être différentes. Le débit de la phase mobile, qui joue un rôle dans l'efficacité, peut aussi avoir un rôle non négligeable sur la quantité d'ions adsorbés à la phase stationnaire. [41]. L'appariement d'ions permet la séparation d'ions hydrophiles en milieu organique et la séparation d'ions hydrophobes en milieu aqueux ou organique.

4. Chromatographie d'échange d'ions avec suppresseur

¹d'après [41]

A l'origine, la chromatographie ionique n'était utilisée que pour l'analyse des ions contenus dans l'eau. Or ceux-ci, présents en faible quantité, ne peuvent pas être détectés par **spectrométrie U.V.** classique ou par **réfractométrie différentielle** mais le sont par **conductimétrie**.

- Le conductimètre

Une solution est dite conductrice si un courant électrique passe lorsqu'on applique une tension entre deux électrodes. La **conductance** est définie comme étant l'inverse de la *résistance* R :

$$G = 1 / R$$

L'unité de conductance est le **Siemens** (S). Elle dépend, dans une certaine limite, de la concentration des ions en solution.

Pour une meilleure sensibilité, ces détecteurs nécessitent de réduire le nombre d'ions qui traversent la cellule, ceci est réalisé par un **suppresseur**.

- Le suppresseur

Comme son nom l'indique, il sert à supprimer les ions gênant la détection de ceux qui sont recherchés. Il est placé entre la sortie de la colonne et l'entrée du détecteur conductimétrique.

Prenons l'exemple du **dosage de l'ion sodium** :

Après la colonne, Na⁺ est en milieu HCl sous forme Na⁺ Cl⁻. Le suppresseur échange HCl en H₂O et NaCl en NaOH.

Systeme d'injection

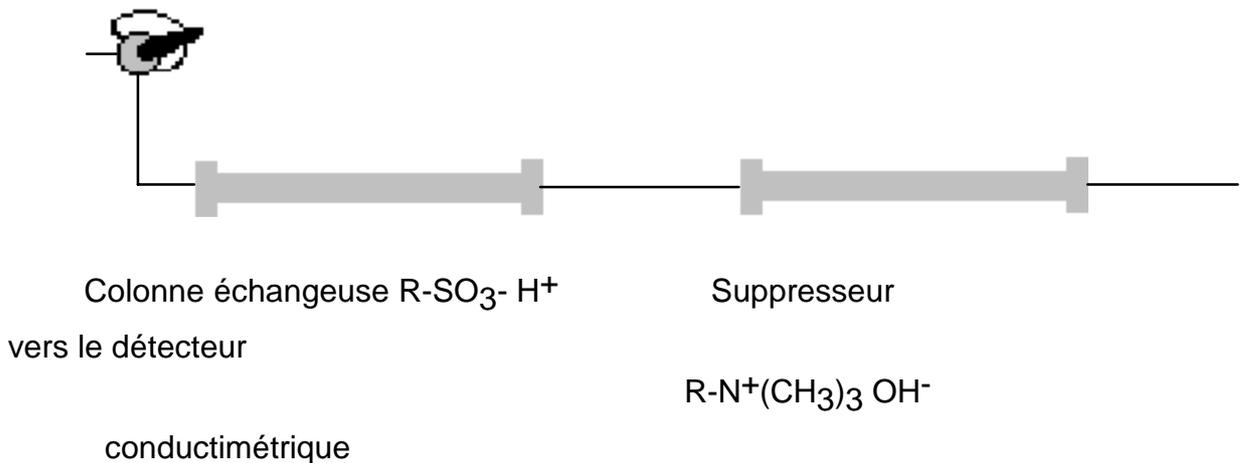
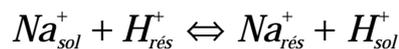


Fig.4.15 Couplage entre la colonne échangeuse et le suppresseur.

A l'injection, l'ion Na⁺ est mélangé à H⁺Cl⁻, dans l'éluant. Dans la colonne échangeuse la réaction est la suivante:



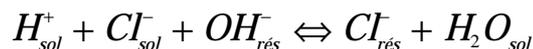
sol : solution

rés : résine échangeuse

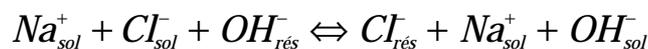
A la sortie de la colonne échangeuse, l'éluant contient l'ion à doser Na⁺ (avec le contre-ion Cl⁻) qui a été séparé des autres cations.

Dans le suppresseur, il se produit deux réactions :

- neutralisation de l'éluant



- échange du contre-ion du soluté



A la sortie du suppresseur, il ne reste que de l'eau, des ions OH⁻ et l'ion à doser Na⁺. La forme (Na⁺ OH⁻) est plus conductrice que la forme (Na⁺ Cl⁻). Bien évidemment la forme neutre H₂O (H⁺ + OH⁻) est moins conductrice que (H⁺ Cl⁻). Plus la différence de conduction est grande, plus le signal détecté est important. Tant que ce cation Na⁺ ne sort pas de la colonne, l'éluant n'est que de l'eau. Grâce au suppresseur, la sensibilité a augmenté.

Dans ce chapitre, l'élève est amené à réfléchir aux espèces présentes aux différents niveaux:

- avant la colonne,
- après la colonne et avant le supprimeur,
- après le supprimeur donc dans le détecteur conductimétrique.

Après cette présentation, l'apprenant doit refaire la même démarche mais dans un autre dosage, celui de l'ion Cl^- . Ni la colonne, ni le supprimeur n'échangent les mêmes sortes d'ions. Une interaction propose à l'élève de désigner les espèces en présence aux différents niveaux. Le chapitre se termine par une présentation des intérêts et des inconvénients de la suppression chimique.

A l'origine, les supprimeurs étaient des colonnes ayant une grande capacité d'échange. Leurs inconvénients en sont d'une part l'obligation de les régénérer régulièrement (pas d'automatisation), d'autre part, le fait qu'elles aient un volume mort important.

Depuis le milieu des années 80, on utilise préférentiellement une cellule contenant une micro-membrane échangeuse d'ions parcourue à contre courant par le fluide de "régénération".[40]. Les cations y sont échangés par H^+ ou les anions par OH^- .

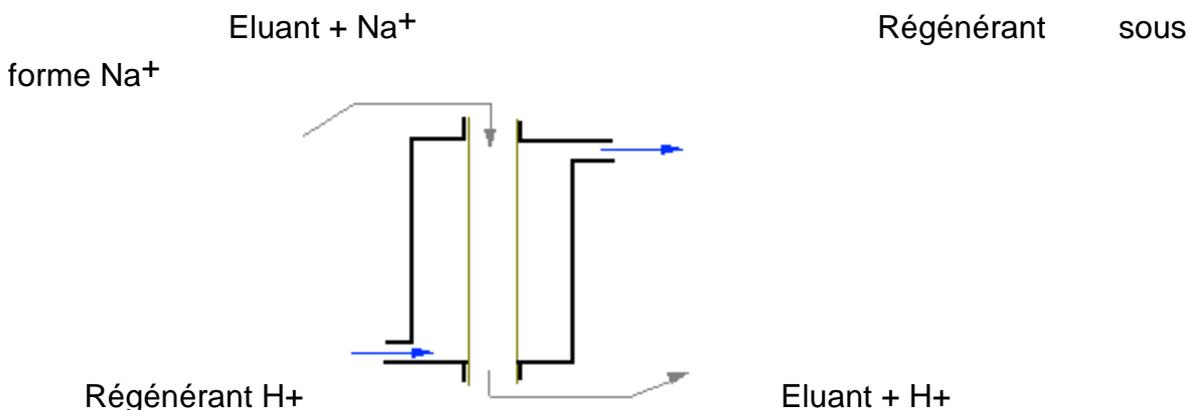


Fig.4.14 Schéma d'un supprimeur d'ions

G. LA SIMULATION

C'est la partie la plus originale du didacticiel. En utilisant la puissance de calcul de l'ordinateur, l'élève peut **voir de manière très rapide l'influence de son action**. Pour une question de temps, nous nous sommes limités à la simulation des phénomènes en chromatographie de partage en polarité de phase inverse qui est la plus utilisée. Nous voulons **faire découvrir à l'élève**, par la simulation, les effets des paramètres essentiels :

- la teneur en solvant organique,
- la longueur de la colonne,
- le débit,
- la température.

Notre objectif est l'**optimisation d'une analyse** chromatographique.

Les équations qui régissent les phénomènes chromatographiques en phase liquide ont été publiées dans de nombreux ouvrages et rassemblées par BOUNINE et GUIOCHON. [42]. L'influence de la température en chromatographie de partage en phase inverse est décrite par COLIN [43].

Avant de faire varier tous les paramètres à la fois, nous proposons à l'élève de voir l'influence de chacun d'eux sur l'allure du chromatogramme et sur le temps d'analyse. L'utilisateur peut connaître en permanence les conditions opératoires ainsi que les temps de rétention de chaque composé du soluté. Ces données sont accessibles en "cliquant" dans la partie haute de l'écran (barre de menu). Ceci permet de ne pas surcharger l'écran, qui est déjà occupé dans sa moitié inférieure par le chromatogramme.

Quand tous les paramètres ont été étudiés un par un, l'élève peut les faire varier tous à la fois pour optimiser une séparation de constituants donnés. Lorsqu'il pense avoir décrit les meilleures conditions, celles-ci sont analysées et commentées en fonction de la résolution et du temps d'analyse.

Puis, nous lui proposons de voir quelle est l'influence du type de solvant organique (méthanol et acétonitrile) sur la séparation. A lui de choisir de façon

optimale les paramètres expérimentaux et d'en déduire un "guide méthodologique" pour des expériences réelles.

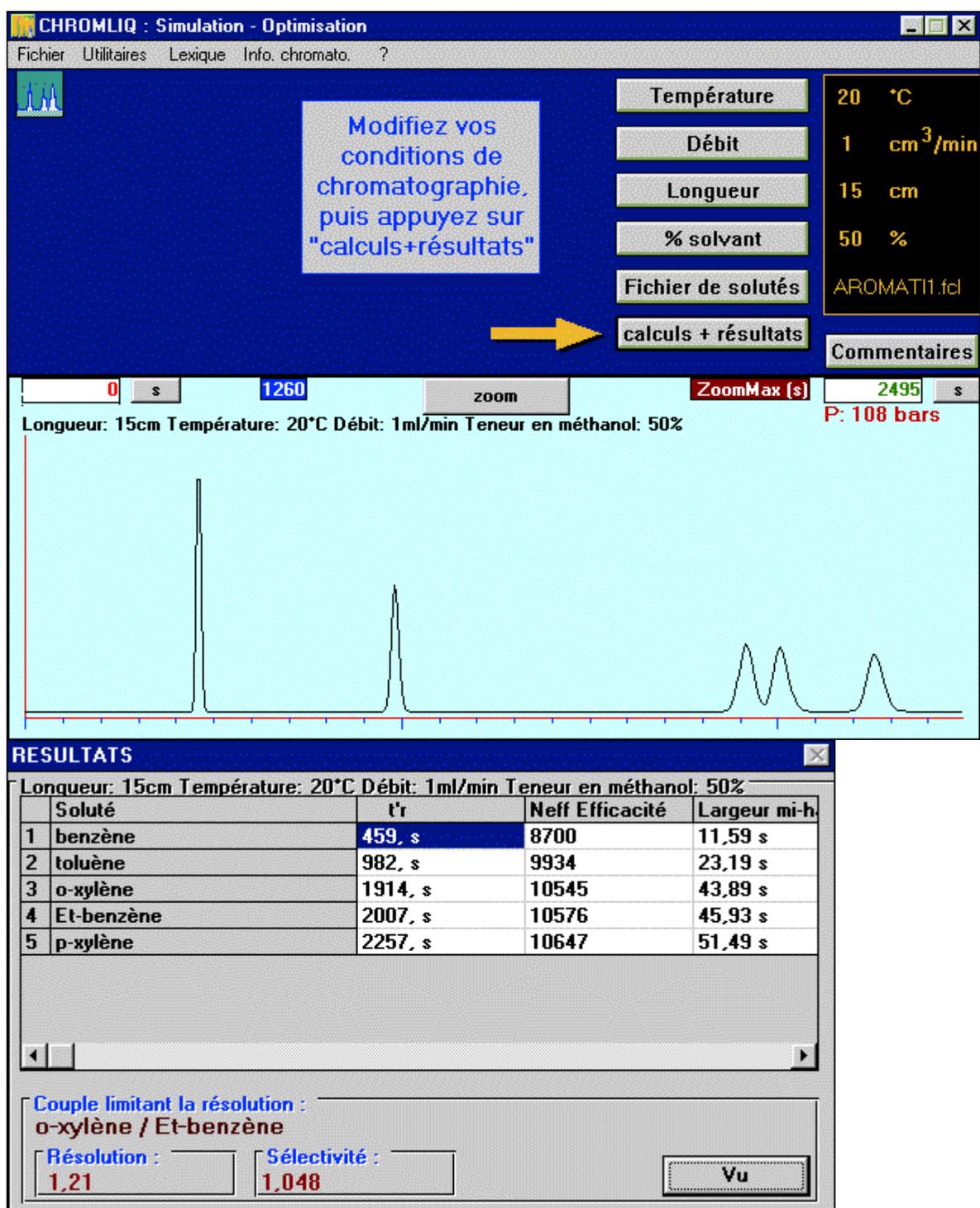


Fig.4.16 Présentation d'un écran de simulation libre.

L'optimisation est un compromis entre la volonté d'obtenir des pics représentant des solutés bien séparés, faciles à quantifier, et ceci rapidement. Dans une séparation intervient le facteur économique qui est propre à chaque laboratoire. Pour certains, il est préférable d'utiliser le moins possible de produits consommables, pour d'autres de faire le maximum d'analyses en un temps donné. Chaque cas est probablement unique. Pour ces raisons, il est difficile de proposer une méthode globale (méthodologie) pour l'optimisation d'une séparation.

H. CHOIX DU MODE DE C.L.H.P.

A la fin du didacticiel, on propose à l'élève une méthodologie dans le choix d'une technique de chromatographie en phase liquide, sous forme d'une présentation arborescente de questions essentielles pour une première approche de la C.L.H.P.. cette présentation n'est pas l'objectif d'un système expert comme CRISEBOOK [44].

I. NOTIONS D'APPAREILLAGE

1. Schéma de principe d'une chaîne de CLHP

Un schéma de principe d'une chaîne de C.L.H.P. est présenté avec une animation montrant le parcours de la phase mobile. (Fig. 4.17).

2. La colonne

La colonne constitue la partie de l'appareillage où se fait la séparation chromatographique. Une première animation montre à l'élève comment sont assemblées les différentes parties d'une colonne. Une seconde présente le remplissage de celle-ci.

3. La vanne d'injection

En C.L.H.P., il est impossible d'injecter l'échantillon dans la phase mobile à travers un septum comme en chromatographie en phase gazeuse. A cet endroit du didacticiel, on propose à l'élève différentes raisons de cette impossibilité, parmi lesquelles il doit choisir celle qui lui semble être la principale. C'est la pression en tête de colonne qui est trop élevée pour pouvoir injecter l'échantillon à l'aide d'une seringue. Une suite d'animations présente alors le fonctionnement d'une vanne d'injection très répandue du type "6 voies".

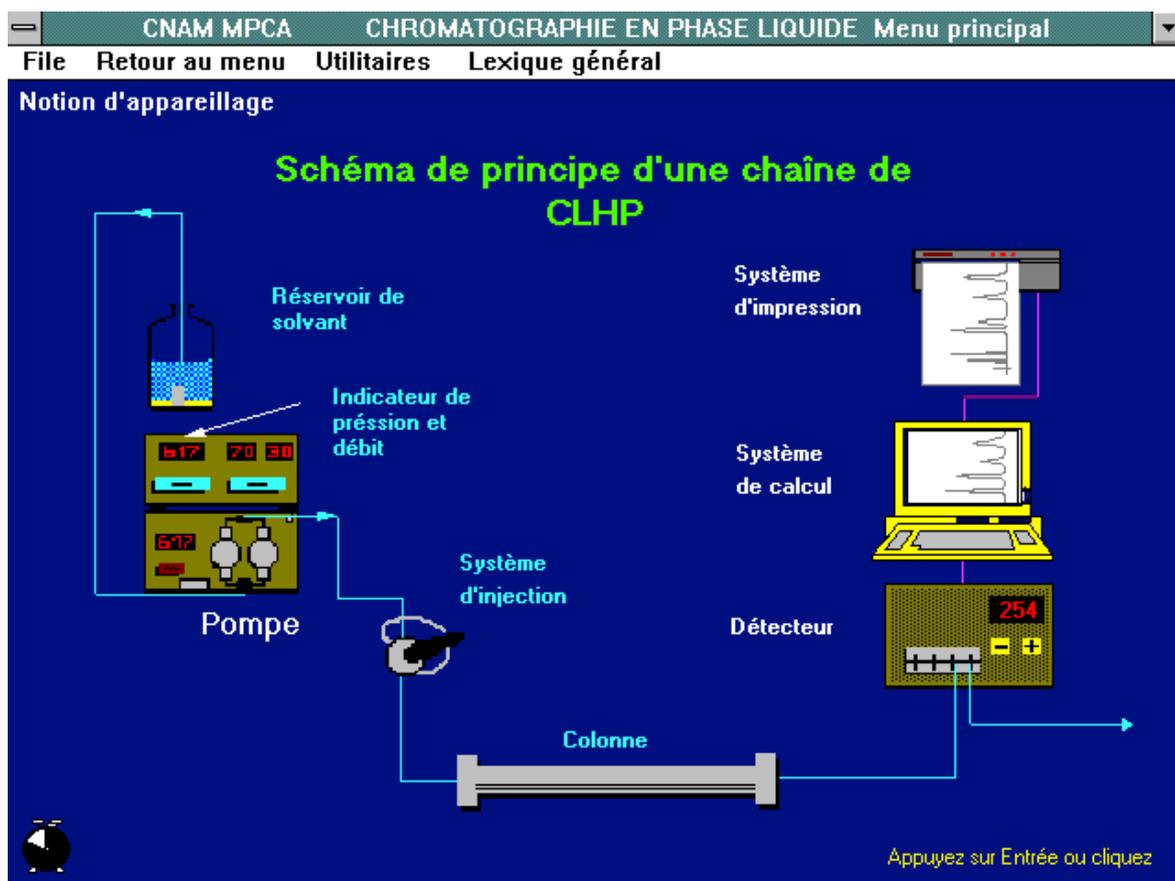


Fig.4.17 Présentation d'une chaîne de C.L.H.P.

4. Le détecteur

Il existe un grand nombre de détecteurs dont le principe est fondé sur les particularités des molécules à séparer. Afin d'abaisser les limites de détection, la tendance actuelle est d'essayer tous les couplages possibles entre appareillages à la sortie de la colonne.

Dans ce chapitre du didacticiel nous n'en développons que deux types : le détecteur d'absorption dans l'ultra violet qui est probablement le plus utilisé ou le plus classique et comme nous l'avons vu dans le chapitre *Chromatographie Ionique* , le détecteur conductimétrique avec suppression chimique.

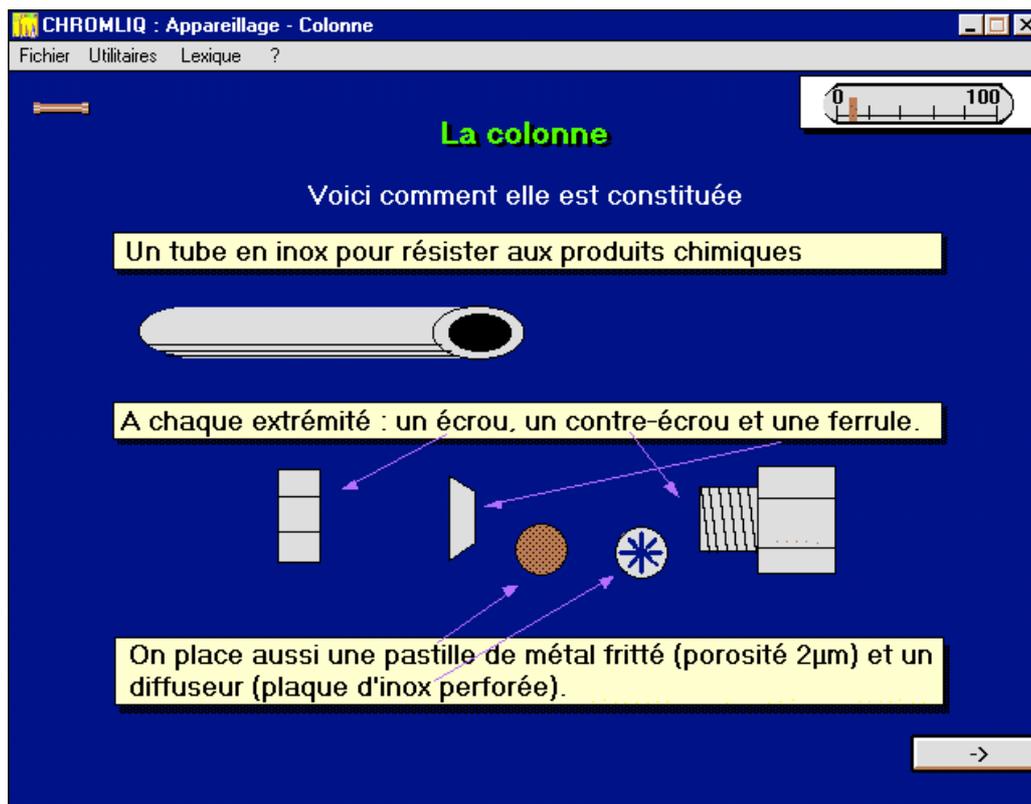


Fig.4.18 Présentation des différentes parties d'une colonne de C.L.H.P. avant assemblage.

5. La pompe

Les détecteurs sont souvent sensibles aux variations de pression, il faut donc maintenir celle-ci constante. Pour cela, les constructeurs n'adoptent pas tous la même solution. Cette partie du didacticiel présente à l'élève les pompes à mono-piston et celles à plusieurs pistons déphasés. Le chapitre traite ensuite des méthodes de gradients d'élution à "haute ou à basse pression".



Fig.4.19 Présentation d'une pompe pour mélange à basse-pression.

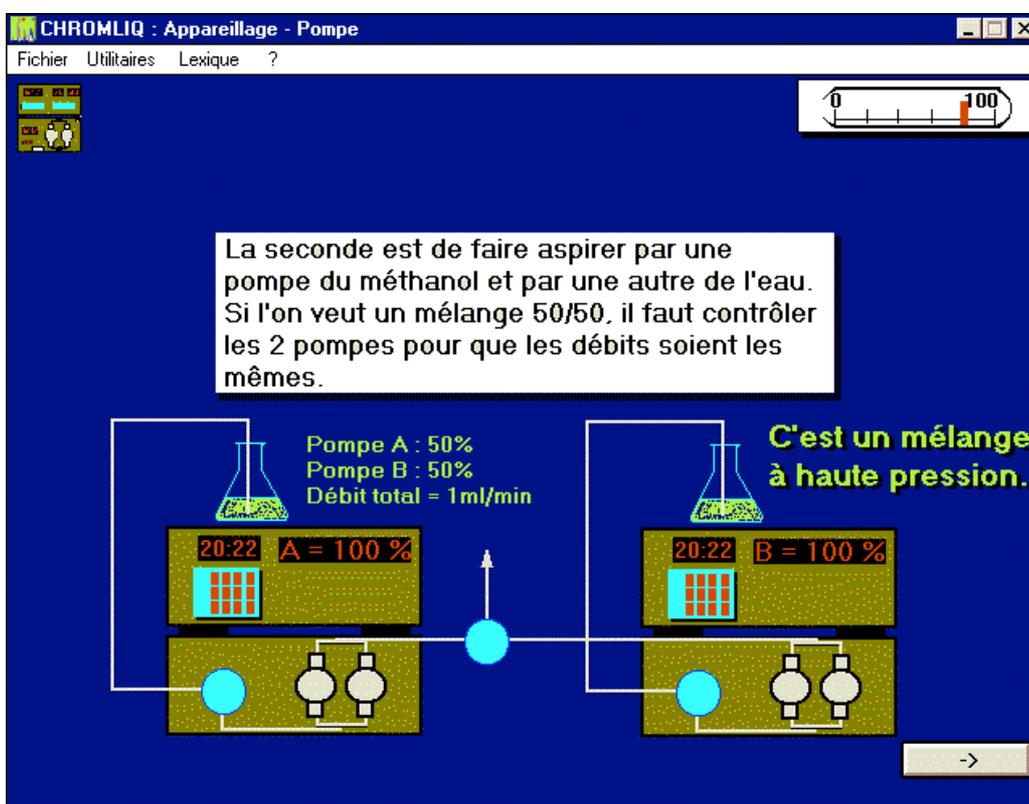


Fig.4.20 Présentation d'une pompe pour mélange à haute-pression.

N'importe quelle notion est facile à acquérir, dès l'instant où l'on peut la rapprocher de modèles déjà assimilés

S. PAPERT [45].

V. CONCEPTION DU DIDACTICIEL

"Les étapes de conception et d'analyse sont fondamentales dans toute application informatique car il ne doit y avoir aucun imprévu. Même si du côté de l'utilisateur qui déclenche l'exécution d'un programme on peut avoir l'impression d'une grande liberté, en fait ceci est directement lié à l'effort du concepteur qui a prévu de nombreuses situations différentes."[1]

Les utilisateurs sont d'accord pour dire qu'un "bon" didacticiel doit permettre d'être suivi à la vitesse de chacun. On doit pouvoir se déplacer à l'intérieur comme on se déplace dans un livre, en le "feuilleter" rapidement ou au contraire en approfondissant un chapitre particulier. C'est en suivant cette ligne directrice que notre travail a été réalisé.

Les professionnels de l'E.A.O. [1, 14, 16] préconisent, pour la réalisation d'un didacticiel, de suivre les étapes suivantes:

1. Conception

Il est nécessaire de réaliser une maquette sur papier la plus détaillée possible. Il faut se fixer des objectifs, prévoir le contenu, concevoir les interactions, en particulier les analyses de réponses,

2. Réalisation

C'est la médiatisation du didacticiel par un langage informatique plus ou moins évolué.

3. Utilisation

L'utilisation (ou **suivi**) par un premier groupe d'élèves permet de tester le travail en cours d'élaboration. Le programme doit être suffisamment avancé pour vérifier que le message à transmettre est clairement assimilé et que "tous les cas" ont été prévus; un bon didacticiel doit couvrir environ 80% de ces cas [14].

A. CONCEPTION

Lorsque l'on parle d'enseignement, les supports de référence sont les prises de notes en cours par les élèves, les photocopiés et surtout les livres. Tout autre type de support doit au moins offrir leurs avantages et limiter leurs inconvénients.

Ce support, ici le didacticiel doit :

- Avoir une certaine cohérence (un livre peut être parcouru de manière logique, chapitre après chapitre, mais aussi en ne lisant qu'un seul chapitre particulièrement adapté au besoin de connaissance).
- Offrir la possibilité de s'arrêter à n'importe quel endroit, comme on ferme un livre.
- Pouvoir être rouvert à la dernière "page" consultée, (reprise)
- Pouvoir être recommencé, "relu",
- Permettre un parcours rapide, de sauter des pages, de revenir en arrière...
- Permettre de prendre des notes...

"Si l'élève ne se représente pas le type d'information qu'il recherche, jusqu'où il peut l'utiliser (...le didacticiel...), il aura tendance à y rechercher ce qu'il sait déjà. Les bons élèves savent très bien utiliser cet outil, savent ce qu'ils cherchent et comment l'obtenir. Par contre, les autres, qui sont au départ perdus, le sont toujours, et restent dans un savoir étroit" [18]. C'est pour cette raison que le didacticiel de chromatographie en phase liquide, tout en laissant la possibilité à l'apprenant de "naviguer" librement, offre un schéma directeur et des conseils. En début de chaque chapitre, son contenu y est décrit sous forme d'objectifs pédagogiques. Ensuite chaque chapitre est de nouveau subdivisé et présenté avec des sous-titres, les plus évocateurs possibles.

Au début du didacticiel, nous proposons à l'élève de "tester" ses connaissances pour au besoin, lui signaler les notions à revoir. Ce test des prérequis permet de construire des chaînons entre son savoir ancien et sa formation nouvelle [14]. Il nous semble nécessaire de vérifier le niveau de base de l'utilisateur en chimie, en lui demandant quelle est la fonction chimique de

CH₃OH, ainsi que d'écrire la fonction chimique nitrile. Ensuite, ce sont ses connaissances en chromatographie qui nous intéressent. L'élève est sensé posséder les généralités de la chromatographie. Nous lui proposons de décrypter l'abréviation "H.E.P.T." (hauteur équivalente à un plateau théorique), notion fondamentale pour ce type de méthode analytique. S'il ne sait pas correctement répondre à chacune de ces questions, un message lui conseille de compléter ses connaissances avant de poursuivre avec ce didacticiel, par crainte d'un manque de compréhension du sujet.

La maquette sur papier est fondée sur le cours de M. GENTY dispensé aux élèves du C.N.A.M., en M.P.C.A. niveau B1.

Au début de chaque chapitre, nous avons défini des buts pédagogiques. A la fin du didacticiel, nous vérifions que ces buts ont été atteints par une série d'exercices d'évaluation.

B. RÉALISATION OU MÉDIATISATION

La médiatisation est l'action de "mettre en média" un scénario pédagogique conçu par un auteur [15]. Il existe deux philosophies de développement de didacticiel.

La première privilégie l'écriture de programmes par des informaticiens. Les enseignants n'interviennent alors que comme consultants ou experts en la matière. Les programmes sont réalisés dans des langages tels que le BASIC, le PASCAL ou le FORTRAN.

La seconde méthode est de faire réaliser le didacticiel par des pédagogues qui dans ce cas utilisent un "**langage-auteur**" ou un "**système-auteur**".

Un "langage-auteur" est adapté à la production de didacticiels, en offrant des commandes spécifiques pour la saisie et l'analyse de réponses, l'enchaînement des questions et des présentations.

Un "système-auteur" est un langage de médiatisation de didacticiel dans lequel l'auteur ne manipule pas directement des instructions complexes, mais

répond aux sollicitations de l'ordinateur. Il permet à des non informaticiens d'utiliser un nouvel outil pour leur cours: l'E.A.O" [15,16].

La réalisation est une phase beaucoup plus concrète que la phase de conception. Dans le cas de ce didacticiel, la conception et la réalisation ont été intimement liées dans le temps. Il a fallu d'une part apprendre à connaître le système-auteur "Authorware Professional for Windows" (**APW**) pour savoir quelles en étaient les possibilités (s'exercer, suivre le tutoriel...), d'autre part concevoir les animations, les enchaînements des scènes de texte et d'affichages de schémas et de dessins autour du contenu.

En tant que chimistes, nous avons l'habitude de lire des schémas. Ils facilitent la compréhension des phénomènes. C'est pour cette raison que nous en avons réalisé de nombreux pour ce didacticiel. Nous y avons incorporé des images numérisées lorsque cela était possible. La réalité d'une photographie est plus agréable à regarder qu'un schéma, mais certaines informations sur le fonctionnement n'y sont pas forcément mises en valeur. Par exemple, les appareils de chromatographie en phase liquide sont généralement d'aspect trop complexes, ou au contraire, sont de simples boîtes sur lesquelles arrivent des fils électriques et des tuyaux. Seul le schéma peut expliquer pas ce qui se passe à l'intérieur.

C. STRUCTURE GÉNÉRALE:

1. Subdivision en sous-programmes

Les sous-programmes sont enchaînés automatiquement. Les **sous-programmes** correspondent à **un ou plusieurs chapitres**.

1^{er} sous-programme : Prise en main par l'utilisateur

Son rôle est la **reprise** du didacticiel **par chaque élève à l'endroit où il l'a quitté** lors de sa dernière utilisation, quel que soit l'endroit, avec toujours la possibilité de reprendre au début.

Le programme crée un sous-répertoire portant le nom chaque utilisateur et enregistre les variables dans un fichier. La valeur de ces variables est propre à chaque utilisateur. Par exemple, ce fichier contient le nombre de fois où l'élève a répondu à chaque question (toutes les réponses, fausses et bonnes). Ce fichier contient aussi le temps que l'élève a mis pour répondre à la question ainsi que le temps d'utilisation du didacticiel. Lors de sa prochaine utilisation, l'élève pourra reprendre le didacticiel à l'endroit exact où il l'avait quitté: le "système-auteur" relit ce fichier et replace le didacticiel à l'endroit où l'élève l'a quitté.

2ème sous-programme: "Menu général"

Ce menu permet d'orienter l'élève vers les différents chapitres du didacticiel. Suivant l'état d'avancement de chaque chapitre, des curseurs se placent sur une échelle graduée de 0 à 100 %. Ceci permet à l'utilisateur de savoir quels sont les chapitres qu'il a parcourus complètement, ceux qu'il a vus en partie, et ceux qui sont encore à voir. Suivant l'état d'avancement, un conseil est donné à l'utilisateur sous forme d'une flèche verte qui indique quel chapitre voir en priorité.

3ème sous-programme: "Généralités de la chromatographie en phase liquide"

4ème sous-programme: "Chromatographie de partage"

5ème sous-programme: "Chromatographie d'exclusion"

6ème sous-programme: "Chromatographie d'adsorption"

7ème sous-programme: "Chromatographie ionique"

Les sous-programmes 3 à 7 sont en fait des chapitres du didacticiel. Chacun d'eux gère un certain nombre de variables qui lui sont propres. En quittant chacun de ces sous-programmes, nous transférons leurs variables d'avancement vers le "Menu Général". C'est de cette manière que s'effectue l'indication par la flèche verte du chapitre à traiter en priorité (conseil).

8ème sous-programme: "Simulation"

Le "système-auteur" que nous avons utilisé, n'est pas adapté aux nombreux calculs que demande une simulation. Pour résoudre ce problème, nous avons relié le didacticiel avec un programme extérieur. Celui-ci est directement dérivé du logiciel développé en VisualBASIC de MICROSOFT, par J.M. FOUIGNON du laboratoire M.P.C.A. du C.N.A.M. et écrit pour la simulation de la chromatographie en phase gazeuse. Il a fait l'objet d'une démonstration lors du 19^{ème} Symposium International de Chromatographie [17] à Aix-en-Provence en septembre 1992 et plus récemment, sous une autre présentation, aux 6^{èmes} journées sur les Méthodes Informatiques dans l'Enseignement de la Chimie [46]. Après une recherche bibliographique et une réflexion sur nos besoins, nous avons adapté ce programme pour la C.L.H.P.. Nous avons aussi utilisé certaines des équations qui relient le temps de rétention à la température et à la force éluante présentées par BOUNINE et GUIOCHON [42].

Pour simplifier, nous avons fait l'hypothèse que l'efficacité "N" ne dépend que du facteur de capacité du constituant sur une colonne donnée et non pas du soluté lui même. Cette hypothèse est proposée par CEULEMANS pour le cas de la chromatographie en phase gazeuse [47]. Il introduit la notion de nombre de plateaux théoriques pour un facteur de capacité infini ($N_{inf.}$). En effectuant des mesures sur plusieurs séries d'injections, nous avons confirmé que cette hypothèse, sans être parfaitement vérifiée, était suffisante pour le niveau de précision de nos calculs. Par contre, alors qu'en CPG, $N_{inf.}$ peut être considéré comme constant dans des conditions classiques de température d'utilisation, en C.L.H.P., ce nombre de plateaux théoriques, pour un facteur de capacité infini ($N_{inf.}$), est très sensible à la température. Nous avons donc utilisé une équation supplémentaire classique de type " $\log(H) = aT + b$ ", elle aussi exposée par BOUNINE et GUIOCHON.

Nous avons fait plusieurs séries d'injections de mélanges témoins à différentes températures 20°C, 40°C et 60°C. Sur chaque série, nous avons calculé pour tous les constituants les efficacités et les facteurs de capacité. Ces mesures ont été faites uniquement en polarité de phase inversée sur une colonne de type ODS de 15cm, de diamètre intérieur de 4,6mm et de granulométrie de 5µm. Les mesures effectuées servent de données de départ sous forme de

fichiers et peuvent être interpolées ou même extrapolées avec les risques que cela comporte. Le N_{inf} de la colonne que nous avons utilisée a été estimé à 96000 plateaux par mètre à 20°C et à 24000 à 60°C.

Ce programme externe effectue tous les calculs de simulation des chromatogrammes ainsi que leur tracé. La communication entre le système Authorware (didacticiel) et l'exécutable écrit en BASIC (simulateur) est faite en utilisant le mode DDE (Dynamic Data Exchange : échange dynamique de données). L'interface graphique de MICROSOFT, Windows, définit des normes de communication entre programmes. Dans le mode d'échange que nous avons utilisé, nous avons défini le sous-programme écrit avec "Authorware", comme "client" et le programme de simulation, écrit en BASIC, comme "serveur". "Authorware" fournit un programme appelé DLL (pour Dynamic Link Library : ressource dynamique de liaisons) *DDE.UCD* qui permet la communication en mode DDE. Ce programme doit se trouver dans le même sous-répertoire de la du disque dur de l'ordinateur que les sous-programmes du didacticiel.

Les fichiers de données nécessaires au programme de simulation ont été créés à partir d'analyses effectivement réalisées au laboratoire et sont rassemblés en annexe C sous forme de tableaux.

A la première utilisation du simulateur, nous imposons à l'élève d'une part le fichier de solutés avec lequel il va travailler, d'autre part les conditions opératoires (température, débit d'éluant, longueur de la colonne, teneur en solvant organique de la phase mobile). Par la suite, les modifications apportées par l'élève restent effectives.

Le tracé du chromatogramme se fait en attribuant à chaque pic la même surface. L'échelle de l'axe des temps et celle de la réponse du détecteur sont calculées automatiquement de manière à montrer l'ensemble du chromatogramme sur toute la moitié inférieure de l'écran.

Comme nous l'avons déjà dit, la simulation nécessite un grand nombre de calculs. Ceci signifie que le temps mis pour effectuer ces calculs est important et qu'il dépend principalement de l'ordinateur qu'utilise l'élève. A titre d'exemple, un ordinateur équipé d'un microprocesseur 386SX à 20MHz sans coprocesseur

présente le chromatogramme simulé en à peu près 12 secondes. Si l'ordinateur est équipé d'un microprocesseur 486DX à 33MHz, le même résultat apparaît en moins de 4 secondes. Malheureusement, nous pensons que le nombre d'essais effectués par l'élève dépendra de la rapidité d'obtention des chromatogrammes simulés.

2. La marche arrière

Lorsqu'un écran se "construit", les différentes phrases ou objets apparaissent les uns après les autres. Lorsqu'on vient d'effacer un écran, il est intéressant de pouvoir l'afficher de nouveau pour vérifier une information (par exemple, lors d'une erreur de manipulation). C'est pour cela que nous avons conçu la "**marche arrière**".

La "marche arrière" (ou retour) est une fonction souvent réclamée par les élèves qui ont eu la possibilité d'utiliser d'autres didacticiels au C.N.A.M.. C'est pourquoi la plupart des écrans du didacticiel présentent en bas à droite 2 "boutons", zones sensibles sur lesquelles on peut cliquer soit pour avancer dans l'étude, soit pour revoir l'écran précédent, une animation, un schéma ou pour répondre à nouveau à une question. La structure mise en place définit à chaque nouvel affichage une sollicitation qui propose à l'apprenant de "continuer" ou de "revenir en arrière". (Fig.5.1).

Le didacticiel est construit avec la possibilité de remonter l'arborescence linéaire logique de ce qui doit être assimilé, soit par paliers successifs, soit par un palier puis par la descente d'une ou de deux "marches" avant de pouvoir remonter à un nouveau palier.

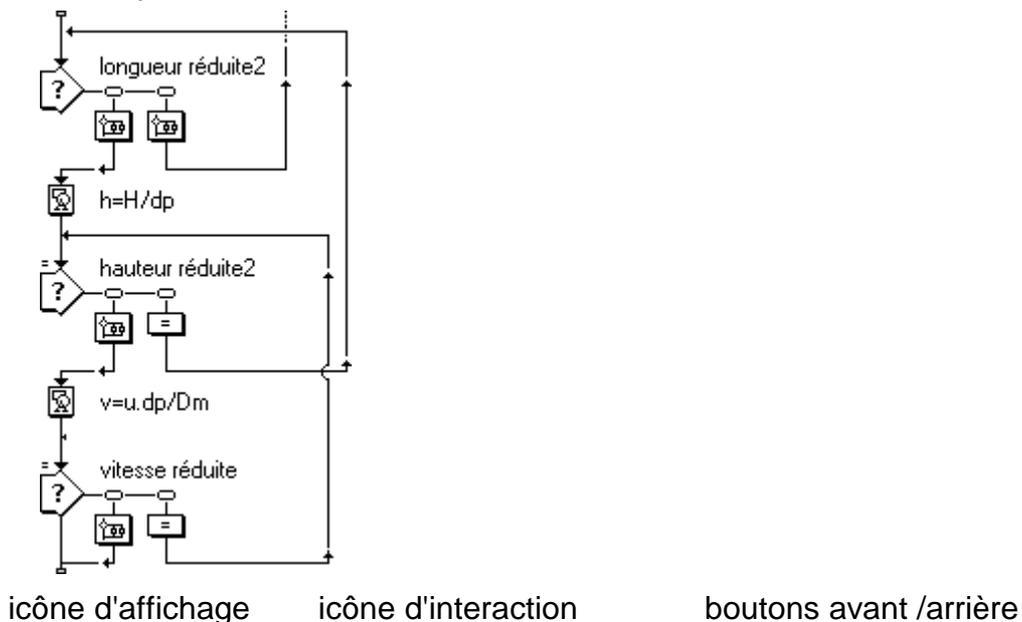


Fig. 5.1 Extrait de l'organigramme APW montrant le chemin suivi lors de la demande de marche arrière ou de suite du tutoriel.

3. Les utilitaires

Comme nous l'avons déjà vu, une grande liberté de mouvement est proposée à l'élève. Il peut à tout moment revenir soit au menu principal du didacticiel, soit à celui du chapitre en cours.

Le retour au menu principal est accessible en permanence en cliquant dans la partie haute de l'écran (barre de menu) ou en activant la touche de fonction F5.

Le menu de chaque chapitre est aussi accessible en permanence en cliquant dans la partie haute de l'écran (barre de menu) lorsqu'on parcourt ce chapitre, ou en activant la touche de fonction F7.

Les aides : Dans un grand nombre de questions une aide contextuelle est proposée simultanément à l'élève. La plupart du temps, elle est présentée sous forme d'une "fenêtre" apparaissant en cliquant dans la partie haute de l'écran (barre de menu) ou en appuyant sur la touche de fonction F1 qui est associée à l'aide dans un grand nombre de logiciels exécutables sous Windows.

La calculatrice est accessible par la partie haute de l'écran (barre de menu), ou par la touche F2. Grâce à WINDOWS, il est possible de copier puis insérer les résultats (Ctrl+Inser puis F3) là où ils sont utiles lors d'une interaction où l'on attend une réponse numérique.

L'affichage de l'heure (ou touche F4) peut être déplacée à volonté par l'élève dans la zone d'affichage .

Pour le concepteur, il est intéressant de positionner les objets affichés à des endroits précis. Pour cela, il est possible d'afficher la position de la souris (touche F6) par ses coordonnées graphiques.

L'impression d'écran n'est pas possible directement avec WINDOWS. La touche "*Imprime écran*" du clavier de l'ordinateur n'est pas utilisée pour une réelle copie de l'écran vers l'imprimante mais vers un programme utilitaire : le *presse-papier*. C'est une utilisation d'une partie de la mémoire vive de l'ordinateur. Le presse-papier peut alors être imprimé en utilisant à son tour ce programme. Dans certains cas, il peut être utile d'imprimer un écran directement sans passage par ce presse-papier. Nous avons donc programmé la touche F12 pour remplir cette fonction.

Le lexique général est accessible en permanence par la partie haute de l'écran (barre de menu) de tous les sous-programmes. Il donne un rappel sur les différents termes utilisés en chromatographie, termes qui ont été décrits dans le module 1 sur les "généralités de la chromatographie". Ces explications apparaissent dans une fenêtre, en superposition de l'écran de déroulement du didacticiel.

Le lexique spécifique pour la G.P.C., basé sur le même principe est accessible uniquement dans le chapitre sur la chromatographie d'exclusion.

4. Analyse d'une réponse numérique

L'exemple suivant montre une manière d'analyser la réponse d'un élève, lorsque la question posée demande d'effectuer une série de calculs simples.

En chromatographie d'exclusion, il est possible de calculer d'après l'allure de la courbe d'étalonnage, la porosité de la phase stationnaire et de déduire la proportion de volume interstitiel¹. A l'inverse, connaissant la porosité et la proportion de volume interstitiel, on peut en déduire le volume de rétention de l'étalon interne ou d'un composé pouvant pénétrer dans tous les pores.

La question est la suivante:

Calculez le volume de perméation totale en cm^3 , à travers une colonne, sachant que:

¹voir la définition des termes dans le lexique G.P.C. présenté en annexe B-2.

Le diamètre interne = 6,0mm

La longueur = 30cm

La porosité de la phase stationnaire = 60%

La proportion de volume de phase stationnaire = 62%.

Pour répondre correctement à la question, l'apprenant doit suivre la démarche suivante:

- 1^{ère} étape

Calculer le volume total interne de la colonne.

$$\text{Surface} \times \text{longueur} = (\pi \cdot d^2 / 4) \times L = 8,48 \text{ cm}^3$$

Il y a plusieurs sources d'erreurs. L'apprenant peut avoir oublié ce type de relation, confondre surface et périmètre, ne pas faire le calcul en unités homogènes (le diamètre est donné en mm et la longueur en cm), oublier la puissance 2.....

- 2^{ème} étape

Calculer la porosité P de la phase stationnaire.

$$P = 62\% \times 60/100 = 37,2\%$$

L'élève peut ne pas faire la correction de porosité de la phase et répondre directement 62%. Il peut aussi confondre la proportion de volume poreux et celle de volume interstitiel (3^{ème} étape).

- 3^{ème} étape

Calculer la proportion Vi de volume interstitiel.

$$V_i = 100 - \text{proportion de volume de la phase stationnaire} = 100 - 62 = 38\%$$

- 4^{ème} étape

Calcul final. Le volume de rétention Vr des molécules qui ont pu pénétrer dans tous les pores, est égal au volume de la colonne, multiplié par la proportion (Vi+P).

$$V_r = 8,48 \times (38 + 37,2) / 100 = 6,38 \text{ cm}^3$$

Durant cette dernière étape, le nombre d'erreurs est limité, puisque normalement, elles ont été faites auparavant. Si l'élève ne répond pas

correctement à la première question (calcul du volume de perméation totale), après un certain nombre de tentatives, les questions relatives aux 4 étapes lui sont posées. Il est alors possible d'identifier chaque erreur et d'orienter le cheminement de l'apprenant dans le didacticiel, en fonction de l'erreur détectée.

Lors des interactions, nous avons essayé de respecter un **code de couleurs**. Les questions sont écrites en bleu sur un fond gris. Les commentaires associés à la réponse de l'élève sont écrits en blanc. Ils sont sur un fond vert si la réponse de l'apprenant est considérée comme juste, sur un fond rouge si la réponse a été envisagée comme fausses à la conception de l'interaction. Dans les autres cas, si ce que l'élève a entré au clavier n'est pas reconnu (modèle non prévu par l'auteur), le commentaire associé sur un fond ocre.

5. Suivi pédagogique et modifications futures

"Il est essentiel que la conception du didacticiel inclue les éléments de base d'un suivi pédagogique, utile aussi bien pour les élèves que pour le didacticiel lui-même et les enseignants."[1].

L'expérience du laboratoire a montré que l'enregistrement systématique du parcours de l'élève dans le didacticiel est intéressant dans les moindres détails. Mais la quantité d'information obtenue par ce suivi n'est exploitée qu'en partie, principalement par manque de temps. Il nous a semblé primordial d'écrire dans un fichier, les réponses textuelles de l'apprenant qui sont facilement importables dans un tableur¹, où les données sont analysables. Un tableur est un logiciel capable de faire des calculs sur des grandes séries de valeurs. C'est aussi une forme simplifiée d'un système de gestion de base de données qui permet, entre autres, d'effectuer des tris. Nous avons choisi de réunir ces enregistrements dans un fichier qui est commun à tous les utilisateurs. Pour effectuer un tri par utilisateur, il faut pouvoir le caractériser. C'est pourquoi, à un certain moment, il faut que l'élève donne son nom et que celui-ci soit lisible par chaque sous-programme, chacun d'eux possédant ses propres variables. Nous avons choisi d'écrire ce nom dans un fichier "*nomeleve.txt*". Celui-ci est relu par tous les sous-programmes qui composent le didacticiel. De cette façon l'apprenant n'est pas

¹comme par exemple Excel de MICROSOFT, 1-2-3 de LOTUS ou autres

obligé de réécrire son nom dans chaque chapitre (comme nous l'avons vu, un chapitre est presque toujours un sous-programme).

Comme nous venons de le voir, les réponses textuelles sont mémorisées dans un fichier. Pour chaque réponse, on enregistre :

- le nom de l'utilisateur,
- le nom ou le numéro de la question,
- l'heure et la date de la réponse,
- la réponse elle-même.

Ce fichier contient aussi des informations sur le nombre de sessions et son temps d'utilisation. Une fois reportés dans le tableur, il est intéressant de trier les enregistrements soit par réponse, soit par utilisateur, de comptabiliser le temps passé sur chaque chapitre par un élève ou bien la durée totale d'étude du didacticiel.

Voici un extrait de ce fichier, utilisé durant la mise au point d'un questionnaire lacunaire :

- Tri par utilisateur :

.....

Nom	Question	Heure	Date	Enregistrement	
Alain	Intro session 1	15:50:19	02.02.1993		
Alain	Prérequis-1	15:51:05	02.02.1993	alcool	Sur cette question,
l'élève a					
Alain	Prérequis-2	15:51:25	02.02.1993	nh3	dans un premier temps
Alain	Prérequis-2	15:52:23	02.02.1993	NH3	tapé "nh3" en minuscule, puis après un commentaire personnalisé, il a corrigé en redonnant la réponse en majuscules "NH3".

.....

Nom	Question	Heure	Date	Enregistrement
Claudine	Texte trous_Géné-1 separation	15:56:02	02.02.1993	
Claudine	Texte trous_Géné-2 identification	15:56:28	02.02.1993	
Claudine	Texte trous_Géné-3	15:56:45	02.02.1993	dosage
Claudine	Texte trous_Géné-4	15:57:01	02.02.1993	un
solvant				
Claudine	Texte trous_Géné-5	15:57:10	02.02.1993	colonne
Claudine	Texte trous_Géné-6	15:59:39	02.02.1993	le
solvant				
Claudine	Texte trous_Géné-6	15:59:43	02.02.1993	le
remplissage				
Claudine	Texte trous_Géné-6	15:59:45	02.02.1993	la
phase stationnaire				

.....

Nom	Question	Heure	Date	Enregistrement
Paul	Eval2 clhP4	15:47:56	09.02.1993	performance Ici, l'élève a oublié
Paul	Eval2 clhP4	15:48:10	09.02.1993	performance de taper un " r ". La
Paul	Eval2 clhP4	15:48:28	09.02.1993	performance faute de frappe

n'était pas prévue. Il
ne l'a pas corrigée
entre chaque envoi.

- Tri par question :

.....

Nom	Question	Heure Date	Enregistrement
Alain	Texte trous_Géné-6	15:59:39	02.02.1993 l'éluan
Jeanne	Texte trous_Géné-6	14:55:43	02.02.1993 le solvant
Alain	Texte trous_Géné-6	16:59:45	02.02.1993 le solvant
Patrick	Texte trous_Géné-6	17:56:26	02.02.1993 la phase stationnaire
.....			

Ce fichier est donc très intéressant pour la mise au point du didacticiel. Grâce à toutes les données enregistrées, le concepteur peut faire évoluer le produit en incorporant un plus grand nombre de réponses "types" sur chaque interaction (personnalisation de la réponse de chaque élève). En effet, les différents utilisateurs peuvent proposer des synonymes non prévus à la conception dans la liste des réponses attendues. L'exploitation de ce fichier peut montrer aussi que la plupart des utilisateurs rencontrent des difficultés avec une question. Celle-ci est peut-être mal posée ou les explications insuffisantes. "L'E.A.O. amène doucement les formateurs à une modestie très saine: si les résultats d'un didacticiel ne sont pas au niveau de ses objectifs, c'est tout simplement qu'il est mal fait." [14].

On considère en général qu'après une centaine de d'utilisateur, on a validé à la fois l'aspect informatique et l'aspect pédagogique d'un produit. [1].

VI. CONCLUSIONS

L'objectif initial était la réalisation d'un logiciel d'auto-formation en chromatographie en phase liquide pour des techniciens en entreprise ou en un lieu autre que ceux prévus pour l'enseignement classique.

Le travail effectué pendant ce mémoire d'ingénieur correspond à une formation spécifique sur la chromatographie en phase liquide. Le temps moyen d'apprentissage de didacticiel est estimé entre 6 et 8 heures pour un élève ayant au préalable des connaissances sur les généralités de la chromatographie.

Un dialogue "homme-machine" a été mis en place où l'apprenant doit répondre soit à des questionnaires "lacunaires" (qui demandent une réponse écrite ou qui nécessitent un calcul), soit à des questionnaires à choix multiple. Une grande liberté de parcours a été laissée à l'élève. Des conseils et des aides lui sont souvent proposés. Nous avons essayé de rendre la partie "cours" la plus interactive possible et de lui insérer un grand nombre d'animations, de graphiques et de photographies numérisées. Nous y avons volontairement imbriqué les exercices.

Des extraits de didacticiels peuvent être présentés en cours magistraux lorsque les salles ou les amphithéâtres sont équipés de projecteurs adaptés. Ceci est particulièrement intéressant pour les animations de phénomènes difficilement compréhensibles. De même, les parties "exercices" peuvent être effectuées lors de séances d'exercices dirigés dans des salles équipées d'ordinateurs. L'intérêt est que chaque élève (ou chaque binôme) travaille à son propre rythme et que les commentaires associés à ses réponses sont personnalisés.

De la même manière qu'un livre est un support pédagogique auquel l'apprenant peut se référer, un didacticiel ne prétend pas se substituer à un enseignant. Il ne remplacera pas la présence d'un professeur à un cours, ce qui est encore et de beaucoup, la manière préférée d'apprendre des élèves du C.N.A.M. [enquête SOFRES 91].

Ce didacticiel est en cours d'expérimentation et de validation par un certain nombre d'élèves qui suivent le cours de Méthodes physico-chimiques d'analyse

B1 du Professeur GENTY au C.N.A.M.. De plus, ces élèves (une centaine d'étudiants répartis sur 56 postes) ont suivi une séance d'exercices dirigés d'une heure portant sur quelques exercices du didacticiel.

Ce didacticiel a déjà été présenté en l'état, au cours de séminaires : les 6^{èmes} journées sur les *Méthodes informatiques dans l'Enseignement de la Chimie* (M.I.E.C.) les 1^{er}, 2 et 3 avril 1993 à Paris et au "*Symposium on Analytical Sciences* " (SAS 93) à Deauville les 4, 5 et 6 mai 1993.

L'avenir de l'E.A.O. passe probablement par un mélange de styles des supports "multimédias" ou "hypermédias" que sont les CD-Vidéo, CD-I, magnétoscopes et sons enregistrés. L'E.A.O. devra aussi interpréter les faiblesses de l'apprenant à l'aide d'un "système-expert" qui saura reformuler une explication ou une question lorsque l'apprenant buttera et/ou ne répondra pas correctement. Mais les "systèmes-experts" nécessitent un temps considérable pour leur mise en oeuvre, certainement bien plus qu'un didacticiel comme celui sur lequel nous avons travaillé durant un an.

VII. ANNEXES

A. UTILISATION DU DIDACTICIEL

1. Installation

Ce didacticiel s'installe sur un ordinateur de type PC/PS équipé au minimum d'un microprocesseur du type 80386, avec 2Mo de mémoire vive RAM, d'un écran VGA 16 couleurs. Le didacticiel utilise 5 Mo sur le disque dur. La simulation et les animations nécessitent un grand nombre de calculs. Nous conseillons d'utiliser un microprocesseur rapide.

L'ordinateur doit être équipé du logiciel WINDOWS de MICROSOFT version 3.1, fonctionnant au minimum en mode standard, avec une souris.

A partir du DOS, tapez "a:install" puis ↵ (Entrée).

Cette routine crée le sous-répertoire APW et y copie tous les fichiers du didacticiel.

Une fois ces copies terminées, entrez dans WINDOWS, tapez "win" puis ↵ (Entrée).

Dans la barre de MENU :

- cliquez sur "FICHIER"
- cliquez sur "NOUVEAU"
- cliquez sur "GROUPE de PROGRAMME".
- Dans la zone "FICHIER DE GROUPE", tapez c:\APW\DIDACT puis cliquez sur "OK" (Car ce fichier se trouve dans c:\APW).

Une fois installé, cliquez sur l'icône "CHROMATO LIQUIDE". Le didacticiel démarre.

Vous pouvez aussi utiliser le didacticiel à partir de WINDOWS, après avoir copié les différents fichiers, à partir des disquettes, dans un répertoire nommé APW. Exécutez :

```
"C:\APW\RUNAPW.EXE CHROMLIQ"
```

Le didacticiel crée un sous-répertoire du répertoire WINDOWS nommé APW_DATA ainsi qu'un sous-répertoire par utilisateur et portant le nom de celui-ci. Dans le sous répertoire APW, un fichier ABC.TXT contient toutes les données entrées par les différents utilisateurs d'un même poste (voir paragraphe V.C.5.).

2.Liste des fichiers

CHROMLIQ.APP

Entrée du nom de l'utilisateur,
Repérage de l'ancien ou du nouvel apprenant,
Prise en main du didacticiel.

CLINTRO.APP

Test des prérequis,
Menu général : orientation vers les différents chapitres,
Notion d'appareillage, choix du mode de séparation, évaluation.

CLGENE.APP

Chapitre "Généralités de la chromatographie en phase liquide".

CLL.APP

chapitre "Chromatographie de partage".

CLEXCLU.APP

Chapitre "Chromatographie d'exclusion".

CLIONIC.APP

Chapitre "Chromatographie ionique".

CLADSOR.APP

Chapitre "Chromatographie d'adsorption".

CLSIMUL.APP

Chapitre "Simulation de la chromatographie de partage".
Interface DDE avec programme en VisualBASIC.

HPLCSIM3.EXE

Programme (en VisualBASIC) de simulation de chromatogrammes.

VBRUN100.DLL

"Runtime" de VisualBASIC 1.00.

RUNAPW.EXE

"Runtime" du "système-auteur" Authoware Professional for Windows 1.00.

DDE.UCD

Programme DLL d'Authorware permettant la liaison DDE.

AROMATI1 à 3, PHENOL3, ACNAROM1 à 3

Fichiers de données pour la simulation.

CHROMLI1.ICO et CHROMLIC.GRP

Icône et groupe pour le gestionnaire de programme de Windows.

3.Utilisation

Le didacticiel démarre par une animation. On demande alors son nom à l'utilisateur. En effet, ce didacticiel est prévu pour être utilisé par plusieurs élèves sur un même poste de travail. Chacun d'eux pourra revenir exactement à l'endroit où il l'a quitté, à condition d'être sorti par la barre de menu "File".

Dans la partie "cours" qui contient des interactions, il est possible de ne pas répondre à la plupart des questions sauf si elles sont de type "oui" ou "non". Pour cela, il faut cliquer deux fois sur la flèche de suite " -> ". Par contre, dans les différentes parties "EXERCICES" ou "EVALUATION", une réponse est presque toujours attendue.

La barre de menu (partie haute de l'écran) propose un certain nombre d'accessoires, de compléments, comme par exemple la calculatrice de WINDOWS (accès possible par la touche F2) avec laquelle il est possible d'effectuer des calculs et rapporter le résultat dans le didacticiel.

Pour certaines questions, l'élève dispose d'une aide dans la barre de menu ou bien par la touche F1.

Il est possible de se déplacer rapidement dans le didacticiel grâce aux touches de fonction F5 et F7. La première replace au MENU GENERAL, et la seconde au MENU du CHAPITRE en cours.

Il est parfois possible de ne pas faire des exercices, ou des parties de cours, ou le remplissage d'un tableau, en appuyant sur F9.

La touche de fonction F12 permet l'impression de l'écran.

B. LEXIQUES

1. Lexique Général

(1) Adsorption / Désorption :

L'adsorption est une pénétration superficielle d'un gaz ou d'un liquide dans un solide. Contrairement de l'absorption (notion d'imbiber) où il y a piégeage physique, lors de l'adsorption il y a formation de liaisons chimiques.

La désorption est le phénomène inverse de l'adsorption (libération de la molécule adsorbée).

(2) Binaire :

Se dit d'un système à 2 constituants (mélange de 2 solvants, pompe à 2 entrées de solvants,...).

(3) Chromatogramme :

Enregistrement du signal obtenu lors d'une séparation en fonction du temps.

(4) Coefficient de partage K :

Rapport à l'équilibre entre la concentration du composé dans la phase stationnaire C_S et dans la phase mobile C_M :

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

(5) Facteur de capacité k' :

Rapport de la quantité d'un produit entre la phase stationnaire et la phase mobile:

$$k' = K \cdot V_S / V_M = t_r / t_m$$

(6) Isocratique et Gradient d'élution :

Séparation isocratique : réalisée avec une composition de phase mobile constante.

Séparation à gradient : réalisée avec une phase mobile de composition variable au cours de l'analyse par un mélange de différents solvants (utilisée pour la séparation de composés de polarités différentes).

(7) Nombre de plateaux théoriques :

(par analogie avec la distillation)

$$N_{th} = 5,54 \times \left(\frac{tr}{\omega_{1/2}} \right)^2$$

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

(8) Partage :

C'est la répartition d'un composé entre 2 phases liquides (phase mobile et phase stationnaire) selon la solubilité dans chacune d'elles.

(9) Phase mobile :

En C.L.H.P., liquide organique et/ou aqueux, mis en mouvement sous pression par la pompe.

(10) Résolution R :

$$R = 2 \cdot \frac{(tr_B - tr_A)}{(\omega_{0B} + \omega_{0A})}$$

avec t_r temps de rétention des 2 pics contigus.
et ω_0 largeur de ces pics à leur base.

Si $R < 1$ mauvaise résolution

Si $1 < R < 1,5$ acceptable

Si $R > 1,5$ bonne résolution.

(11) Réticulation :

Se dit de macromolécules dont les différents enchaînements sont reliés entre eux, de façon à former un réseau tridimensionnel.

(12) Coefficient de sélectivité α :

$$\alpha = \frac{t'_R B}{t'_R A}$$

Rapport des temps de rétention réduits de deux produits avec A sortant en tête.

(13) Solutés :

Constituants de l'échantillon à séparer.

(14) Temps mort t_m :

Temps mis par un composé non retenu par la colonne, pour parcourir le trajet entre l'injecteur et le détecteur.

(15) Temps de rétention t_r :

Temps mis par les molécules pour parcourir le trajet entre l'injecteur et le détecteur.

Temps de rétention réduit $t'_r = t_r - t_m$

(16) Ternaire :

Se dit d'un système à 3 constituants (mélange de 3 solvants, pompe à 3 entrées de solvants...).

(17) Vitesse de phase mobile :

Distance parcourue par la phase mobile, dans la colonne, par unité de temps.

$$u = L / t_m \quad (\text{cm.s}^{-1})$$

(18) Volume mort :

Temps mort x Débit

$$V_m = t_m \cdot \text{débit}$$

(19) Volume de rétention :

Temps de rétention x débit

$$V_r = t_r \cdot \text{débit}$$

2. Lexique G.P.C.

(1) Indice de polydispersité : I

C'est le rapport de M_p sur M_n .

$$I = \frac{M_p}{M_n}$$

Pour les polymères obtenus par réaction radicalaire, il avoisine 2. Pour d'autres il peut atteindre 10, suivant la méthode de synthèse. La polydispersité représente l'inhomogénéité de l'échantillon. Plus l'intervalle de masse est étroit, plus sa valeur sera faible.

(2) Masse moléculaire en nombre : M_n

C'est une masse moyenne, caractéristique de la distribution de l'échantillon analysé. Elle donne une évaluation de la flexibilité et de l'adhésion du polymère. Ces propriétés sont liées à la proportion de constituants de faible masse molaire. Elle est exprimée en **u** (unité atomique).

$$\overline{M}_n = \frac{\sum(n_i \cdot M_i)}{\sum n_i} = \frac{\sum(c_i)}{\sum \frac{c_i}{M_i}}$$

n_i et c_i représentent respectivement le nombre et la concentration pondérale de chaque molécule de masse M_i . La somme est effectuée de $i=1$ (monomère) à $i=\infty$. i est le degré de polymérisation.

(3) Masse moléculaire en poids : M_p ou M_w

C'est une masse moyenne, caractéristique de l'échantillon analysé. Elle donne une évaluation assez précise de la quantité de constituants de masse molaire élevée qui ont une incidence sur la résistance mécanique du polymère. Elle est exprimée en **u** (unité atomique).

$$\overline{M}_p = \frac{\sum(n_i \cdot M_i^2)}{\sum(n_i \cdot M_i)} = \frac{\sum(c_i \cdot M_i)}{\sum c_i}$$

n_i et c_i représentent respectivement le nombre et la concentration pondérale de chaque molécule de masse M_i . La somme est effectuée de $i=1$ (monomère) à $i=\infty$. i est le degré de polymérisation.

(4) Oligomères :

Molécules ayant une masse relativement faible, formées par polymérisation d'un petit nombre de monomères (degré de polymérisation faible).

(5) Phase stationnaire :

Support poreux de remplissage des colonnes dont les grains ont en général un diamètre de 5 ou 10 μm et des pores allant d'un à quelques centaines de nanomètres.

(6) Soluté :

Avant l'injection, c'est le polymère dissous dans le solvant. Après l'injection, chaque espèce moléculaire séparée est un soluté.

(7) Solvatation :

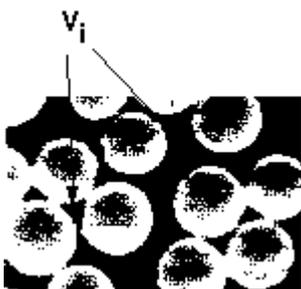
Association de molécules du solvant d'une solution avec une molécule ou ion du soluté, ou avec une particule dans une solution colloïdale. L'*hydratation* est un cas particulier de solvatation [28].

(8) Volume d'élution (rétention) :

Volume de solvant qui a traversé les colonnes et les détecteurs, du début de l'injection jusqu'au temps considéré.

(9) Volume de solvatation :

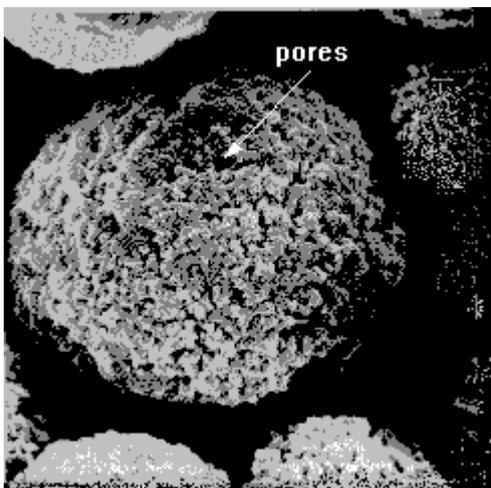
Une molécule solubilisée est combinée chimiquement avec une quantité de molécules de solvant (voir solvatation). Le volume de solvatation est le volume de la molécule "entourée" de molécules de solvant.



(10) Volume interstitiel :

C'est le volume compris entre les particules de phase stationnaire.

V_j . Il est aussi appelé volume extraparticulaire.



(11) Porosité : Volume poreux d'une quantité de matière

C'est le volume des pores par quantité de la phase stationnaire. Il est exprimé en cm^3/g de matière. Les grains ont en général un diamètre de 5 à 10 μm et le diamètre des pores va de 1 à quelques centaines de nanomètres.

C. SIMULATION

1. Obtention des fichiers de calcul

Les 5 pages suivantes présentent un tableau récapitulatif des résultats obtenus lors de expériences effectuées au laboratoire de M.P.C.A.. Les solvants organiques sont soit le méthanol, soit l'acétonitrile.

Une partie de ces résultats ont servi à la création de fichiers de calcul pour le simulateur.

Fichier Excel absent

2. Conditions optimales de simulation

Dans le sous-programme de simulation, 5 fichiers sont disponibles, et peuvent être optimisés par l'apprenant. Ces 5 Fichiers sont :

NOM FICHER	SOLVANT	MELANGE
AROMATI1	méthanol	benzène, toluène, o et p xylène, éthyl-benzène.
AROMATI2	méthanol	benzène, toluène, o et p xylène, éthyl-benzène, propyl-benzène, butyl-benzène.
ACNAROM1	acétonitrile	benzène, toluène, o et p xylène, éthyl-benzène.
ACNAROM2	acétonitrile	benzène, toluène, o et p xylène, éthyl-benzène, propyl-benzène, butyl-benzène.
PHENOL3	méthanol	phénol, alcool benzylique, alcool phényl-éthylique, p-crésol, diéthyl-phtalate.

Les conditions optimales à trouver correspondent à une résolution la plus proche de 1,5 et le temps d'analyse le plus court possible. Elles sont proposées dans le tableau suivant.

NOM FICHER	TEMPERATURE (°C)	Débit (cm ³ /min.)	LONGUEUR de la COLONNE	TENEUR en solvant organique
AROMATI1	20	4	5	33
AROMATI2	20	4	5	33
ACNAROM1	15	4	5	29
ACNAROM2	15	4	5	29

PHENOL3	5	4	5	42
---------	---	---	---	----

D. EXEMPLE DE LA CONSTRUCTION D'UN GRAPHE

Cette annexe présente la conversion des coordonnées d'un objet sur l'écran en pixels en coordonnées relatives à l'échelle d'un graphe. Cette conversion est écrite dans le langage du système-auteur Authorware Professional.

Dans cet exemple, les coordonnées réelles sont de type $\log(10)$

Dans un premier temps on déclare les variables représentant le cadre du graphe en coordonnées réelles et en pixels.

PixelMinX = 95

abscisse en pixel de l'angle inférieur gauche

PixelMaxX = 416

abscisse en pixel de l'angle inférieur droit

PixelMinY = 95

ordonnée du pixel de l'angle supérieur gauche

PixelMaxY = 414

ordonnée du pixel de l'angle inférieur droit

ReelMinX = 25 ; minutes

abscisse réelle minimale

ReelMinY = 2 ; $\log(100)$

ordonnée réelle minimale

ReelMaxX = 50 ; minutes

abscisse réelle maximale

ReelMaxY = 7 ; $\log(10^7)$

ordonnée réelle maximale

Movable@" point " = 1

opération bloquant la possibilité de déplacer le point lorsqu'il a été correctement placé.

$$tr = (DisplayX@ \text{ point } "-PixelMinX) * (ReelMaxX-ReelMinX) / (PixelMaxX - PixelMinX) + ReelMinX$$

Ce calcul repère l'abscisse du point en pixels et la convertit en abscisse réelle

$$\log M = ReelMaxY - (DisplayY@ \text{ point } "-PixelMinY) * (ReelMaxY-ReelMinY) / (PixelMaxY-PixelMinY)$$

Ce calcul repère l'ordonnée du point en pixels et la convertit en ordonnée réelle (mais en log)

$M = EXP10(\log M)$ calcul de la valeur normale d'après le log(M)

VIII. REFERENCES

[1] BESTOUGEFF H. FARGETTE J.P., Enseignement et Ordinateur, Paris, CEDIC/NATHAN, 1982, ISBN 2-7124-0311-8.

[2] GENTY C., Une formation en chimie analytique au Conservatoire National des Arts et Métiers, *Analisis*, vol.20, 4, 1992, p.M27.

[3] AUFFRAY A., Création d'un didacticiel pour l'enseignement de la spectrométrie de fluorescence X, Mémoire d'ingénieur soutenu le 17 décembre 1990 au Conservatoire National des Arts et Métiers, Paris 1990.

[4] ARNAUD B.- AUFFRAY A.- GENTY C.- MONIN J.P., L'apprentissage de la Spectrométrie de Fluorescence X : FLUO X, Actes des 6^{èmes} journées sur les Méthodes Informatiques dans l'Enseignement de la Chimie (M.I.E.C.), Conservatoire National des Arts et Métiers, Paris, 1^{er} au 3 Avril 1993.

[5] GENTY C.- ARNAUD B.- AUFFRAY A., Self learning modules for physical methods of chemical analysis, 43rd Pittsburgh Conference, 1992.

[6] MONIN J.P.- GENTY C., Un logiciel de simulation en Fluorescence X : SIMULIX, Actes des 6^{èmes} journées sur les Méthodes Informatiques dans l'Enseignement de la Chimie (M.I.E.C.), Conservatoire National des Arts et Métiers, Paris, 1^{er} au 3 Avril 1993.

[7] GENTY C.- DUBREUIL F., Computer assisted learning - a realisation of the author system "EMILIE" - Application exercice on radioactive decay, Euroanalysis VI, Paris, 1987.

[8] EUDES V., Création d'un didacticiel pour l'enseignement de la chromatographie, Mémoire d'ingénieur soutenu le 15 juin 1992 au Conservatoire National des Arts et Métiers, Paris, 1992.

[9] GENTY C.- ARNAUD B.- MONIN J.P.- FOUGNION J.M.- DAVID C., The use of simulation programs for self learning modules of instrumental methods of chemical analysis, The 2nd Fechem Conference on Education in analytical chemistry, Prague, 1992.

[10] CABROL-BASS D.- RABINE J.P.- RICARD D.- ROUILLARD M., Autoformation à l'interprétation de spectres Infra-rouge, Actes des 6^{èmes} journées sur les Méthodes Informatiques dans l'Enseignement de la Chimie (M.I.E.C.), Conservatoire National des Arts et Métiers, Paris, 1^{er} au 3 Avril 1993.

[11] ETTRE L.S., 1991 : A year of anniversaries in chromatography - part 1 - From TSWETT to partition chromatography, International Laboratory, septembre 1991, p18.

[12] LINDSAY S., High Performance Liquid Chromatography, Analytical Chemistry by Open Learning, second edition, Chichester(G.B.), John WILEY & Sons, 1992, ISBN 0-471-93115-2(vol.)

[13] DORSEY J.G. et col., Liquid Chromatography : Theory and Methodology, Anal.Chem., vol.64, p353R-389R, 1992.

[14] LEFEVRE J.M., Guide pratique de l'Enseignement Assisté par Ordinateur, Paris, CEDIC/NATHAN, 1984.

[15] QUERE M., Systèmes experts et enseignement assisté par ordinateur, OPHRYS Auto formation et Enseignement Multimédia, Paris, 1991, ISBN 2-7080-0648-7.

[16] HERMAN C., Enseigner Apprendre avec l'Ordinateur, Paris, CEDIC/NATHAN,1985, ISBN 2-7124-2219-8.

[17] EUDES V.-ARNAUD B.- GENTY C., Educational software for learning chromatography - basic principles, 19th International Symposium on Chromatography, Laboratoire Central de la Préfecture de Police - Conservatoire National des Arts et Métiers, Poster présenté à Aix-en-Provence, 13-18 Septembre 1992.

[18] ALFONSI Ph.- PORTICHE R., Dites-moi que je me trompe ! Une France sans prof.?, N°2 sur l'enseignement, Série de 4 émissions, Diffusée le 29 Août 1992 sur FR3.

[19] COTTE D., Le disque interactif est arrivé, Science & Vie HIGH TECH, n°3, Octobre 1992, p26.

[20] VAUTIER M., Maintenance: l'EAO passe à la simulation, Technologies, Décembre 1991, p52.

[21] BONNEAU I., La chromatographie en phase liquide, Note pédagogique n°2, Analusis, v.15, 8, Paris, 1987, p.LXI.

[22] ROSSET R.- CAUDE M.- JARDY A., Chromatographies en phases liquide et supercritique, Paris, MASSON, 1991, ISBN 2-225-82308-1.

[23] LINDSAY S., High Performance Liquid Chromatography, Analytical Chemistry by Open Learning, Chichester(G.B.), John WILEY & Sons, 1987, ISBN 0-471-91373-1(vol.)

[24] PERRY W.D.-VOGEL G.C., Who's In Charge?, J. Chem. Educ., vol.69, 3, Mars 1992, p222.

[25] ATKINS P., Chimie Générale, Paris, INTEREDITIONS, 1992, ISBN 2-7296-0378-6.

[26] Encyclopédie internationales des Sciences et Techniques, Vol. 4, Paris, Presse de la Cité, 1970, p483.

[27] ALLINGER N.L. et col., Chimie organique, Vol.1 Structure, 10ème édition, Paris, MacGrawHill, 1987, ISBN 2-7042-0095-5 (vol.1).

[28] KASTLER A.- MATHIEU J.P.- FLEURY P., Dictionnaire de Physique, Paris, MASSON-EYROLLES, 1983, ISBN 2-225-74448-3.

[29] MILLER J.M., Chromatography Concept & Contrast, New-York, John WILEY & Sons, 1988, ISBN 0-471-84821-2.

[30] SEWELL P.A. CLARKE B., Chromatographic Separations, Analytical Chemistry by Open Learning, Chichester(G.B.), John WILEY & Sons, 1987, ISBN 0-471-91370-7(vol.) ISBN 0-471-91371-5 (serie)

[31] SNYDER L.R., Classification of the Solvent Properties of Common Liquids, J.Chrom.Sci., vol16, 1978, p223.

[32] PARRIS N.A., Instrumental Liquid Chromatography, Journal of Chromatography Library, vol.27, Amsterdam, ELSEVIER 1984, ISBN 0-444-42061-4 (vol.27), ISBN 0-444-41616-1 (series).

[33] KNOX J.H., Practical Aspects of LC Theory, J.Chrom.Sci., vol15, 1977, p352.

[34] ETTRE L.S.- CONLON R.D., Pratique de la Chromatographie liquide, YOST R.W., Paris, Technique et Documentation, 1981, ISBN 2-85206-107-4.

[35] POOLE C.F.- SCHUETTE S.A., Contemporary practice of chromatography, Amsterdam, ELSEVIER, 1984, ISBN 0-444-42410-5.

[36] PILAR F.L., Weight-Average Molecular Weights-How to Pick a Football Team, J.Chem. Educ., vol.69, 4, avril 1992, p280,.

[37] FRANCOIS J. et SARAZIN D., La chromatographie d'exclusion stérique, ses possibilités, ses limitations, Analisis, v.20, 10, Paris, 1992.

[38] SNYDER L.R., Principles of adsorption chromatography, Marcel Dekker, 1968.

[39] FEIGENBAUM A., Hydrogen Bonding and Retention on Silica, A concept Illustrated by TLC Chromatography, J. Chem. Educ., vol.63, 9, Septembre 1986, p815.

[40] MARCENAC F., La chromatographie ionique, Note pédagogique n°5, *Analisis* v.16, 1, Paris, 1988, p.LVII.

[41] AGBO HAZOUMÉ P., Chromatographie liquide par appariement d'ions - Applications aux dosages d'anions en milieu aqueux, Thèse de Doctorat de 3ème cycle (Chimie organique), Université d'Orléans, 22 mars 1985.

[42] BOUNINE J.P. et GUIOCHON G., L'optimisation mutiparamètres assisté par ordinateur en chromatographie en phase liquide, *Analisis*, v.12, 4, Paris, 1984, p.175.

[43] COLIN H. et al, The Role of the Temperature in Reversed-phase HPLC, *J.Chromatogr.*, v.167, 1978, p.41-65.

[44] BOURGUIGNON B. et col, CRISEBOOK, a hypermedia version of an expert system for selection of optimization criteria in HPLC, *J. Chromatogr.*, v.592, 1992, p.51-57.

[45] PAPERT S., Jaillissement de l'esprit - Ordinateur et apprentissage, Paris, Flammarion, 1981, ISBN 2-08-08-1210.

[46] FOUNGION JM. DAVID C. GENTY C., Un logiciel de simulation en chromatographie en phase gazeuse : SIMULCHROM, Actes des 6èmes journées sur les Méthodes Informatiques dans l'Enseignement de la Chimie (M.I.E.C.), Conservatoire National des Arts et Métiers, Paris, 1^{er} au 3 Avril 1993.

[47] CEULEMANS J., The number of Theoretical Plates at Infinite Capacity: A better Measure of the Efficiency of Gas Chromatographic Columns, *J.Chromatogr.Sci.* v.22, July 1984, p296.

[48] DUBOIS J., La chromatographie d'exclusion sur gel, Note pédagogique n°6, *Analisis* v.16, 3, Paris, 1988, p.LXVI.

[49] WILLETT J.E., *Gaz Chromatography, Analytical Chemistry by Open Learning*, John WILEY & Sons, Chichester (G.B.), 1987, ISBN 0-471-91332-4(vol.).

[50] HILL J.W., A Model for Hydrogen Bonding, *J. Chem. Educ.*, vol.63, 6, juin 1986, p503.

[51] HILL J.W., A Proposed New Name for Hydrogen Bonding, *J. Chem. Educ.*, vol.63, 10, octobre 1986, p960.