**Travaux Pratiques de Chimie analytique.**

L3 Pro Chimie de Synthèse

# Dosage de l’Eugénol dans le clou de Girofle

Dosage des sels dans l’eau minérale

Dosage du Limonène dans une huile essentiel

**Enseignants :**

Yannis Francois

Email : yfrancois@unistra.fr

**Consignes de sécurité :**

**Port de la blouse et des lunettes de sécurité obligatoires**

**Les étudiants doivent prendre connaissances des consignes de sécurité affichées dans la salle : position des extincteurs, dispositifs de lavage (douches simple et oculaires), etc.** *parmi**lesquelles figurent les suivantes (pour rappel) :*

* **Interdiction formelle de consommer nourriture et boissons en salle de TP.**
* Interdiction de fumer en salle de TP.
* **Les solvants et les produits toxiques sont à manipuler à l’aide de gants en caoutchouc jetables prévus à cet effet.**
* En dehors des manip. à effectuer sous les hottes (obligatoire lorsque des solvants sont manipulés) celles-ci doivent être maintenues fermées.
* En cas de bris de matériel et/ou de verre, avertir un enseignant.
* En cas de blessure ou de brûlure, avertir immédiatement un enseignant.
* Les dispositifs expérimentaux ne doivent pas être modifiés pour des utilisations autres que celles pour laquelle ils ont été prévus dans le cadre de ces TP.
* En cas d’anomalie constatée, prévenir un enseignant. Idem si vous avez un doute sur votre dispositif expérimental. En cas de problème ou de doute du point de vue sécurité, toujours informer les enseignants en 1er lieu.
* **Les poubelles situées à chaque bout des paillasses ne doivent contenir ni verre ni tout autre objet contondant (ces poubelles sont vidées tous les soirs par le personnel de l’ULP et il est impératif de leur éviter tout risque de blessures lors de ces opérations). Pour les verres (pipettes pasteur notamment), les bris de verre ou tout autre objet contondant, des poubelles spéciales sont prévues à cet effet.**
* **Après utilisation de solvants ou de produits présentant un caractère toxique et/ou inflammable, ceux-ci ne doivent en aucun cas être jetés à l’évier mais dans les récipients prévus à cet effet.**
* **Les cheveux longs doivent être attachés de manière à éviter tout problème de sécurité et d’hygiène élémentaire.**
* **Les horaires sont déterminés en début de TP et concernent les heures d’ouverture et de fermeture de la salle de TP. En dehors de ces horaires, aucun étudiant n’est autorisé à demeurer dans la salle sauf cas exceptionnel en présence d’un enseignant.**
* **En fin de manipulation, prévenir un enseignant avant de quitter la salle**

# I. RAPPELS

## I.1.HPLC

En chimie analytique, l'acronyme **HPLC** désigne la ***chromatographie en phase liquide à haute performance*** (*high performance liquid chromatography*). C'est une technique de séparation analytique et préparative d'un composé ou un mélange de composés. L'acronyme français est *CLHP*, mais il est peu utilisé par habitude. Pour certains, HP signifie « haute pression ».

Cette forme de chromatographie est fréquemment utilisée en biochimie, ainsi qu'en chimie analytique.

## *Principe :*

L'échantillon à analyser est poussé dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de faible granulométrie, par un liquide à haute pression (appelée phase mobile), ce qui diminue le temps nécessaire pour séparer les composants présents dans la phase stationnaire ; ces composants ont ainsi moins de temps pour diffuser dans la colonne ce qui produit des pics plus étroits et donc une meilleure sélectivité (les pics sont bien séparés, on peut donc bien les différencier) et une meilleure sensibilité (des pics étroits et hauts sont plus faciles à isoler du bruit de fond que des pics larges et bas).

Les solvants utilisés sont des combinaisons miscibles d'eau et de divers liquides organiques (alcools, acétonitrile, dichlorométhane, ...). Souvent, la composition de la phase mobile est modifiée au cours de l'analyse, c'est le mode dit "gradient" ou "élution graduée" (en opposition au mode "isocratique", pour lequel la composition de la phase mobile reste la même tout au long de l'analyse). Par exemple, en utilisant un mélange eau/acétonitrile comme phase mobile, les composants les plus hydrophobes sont élués avec une concentration élevée en acétonitrile alors que les composants plus hydrophiles sont élués préférentiellement avec une concentration faible en acétonitrile. Selon la nature de la phase stationnaire, on commencera par une concentration élevée en acétonitrile ou en eau.



## *Les différentes phases stationnaires :*

- Phase normale : les colonnes en phase normale sont des colonnes dont la phase stationnaire est polaire et acide.

La phase normale la plus utilisée est à base de gel de silice : à sa surface se trouvent des groupes silanols (-OH) et des groupes siloxanes (-O-). Ces groupes permettent à la silice de retenir les composés à analyser par des liaisons hydrogènes.

Cette phase sert ainsi principalement à séparer des composés polaires.

- Phase inverse : la base d'une phase inverse est une phase normale sur laquelle des chaînes alkyles (ou autres selon la polarité recherchée) ont été greffées au niveau des groupes silanols. En général, la phase stationnaire est majoritairement composée de petites particules de silice sur lesquels on a greffé des fonctions chimiques, le plus souvent de chaînes alkyles à 8 ou 18 atomes de carbones.

Cette phase est dite "inverse" car de polaire et hydrophile (sans les "greffes"), la phase devient apolaire et hydrophobe.



La colonne :Une colonne est un tube construit dans un matériau le plus inerte possible aux produits chimiques, souvent en inox ou en verre. Sa section est constante, de diamètre compris entre 4 et 20 mm pour des longueurs généralement de 15 à 30 cm. Au delà, les importantes pertes de charges exigeraient des pressions de liquide beaucoup trop élevées.

## *Les organes : pompe, Injecteurs et Détecteurs*

Un réservoir de solvant (éluant)qui contient la phase mobile en quantité suffisante.

La pompe : elle est munie d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. Elle permet de travailler:

- en mode isocratique, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.

- en mode gradient, c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluants.

Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques µl à plusieurs ml/min.

Vanne d'injection : c'est un injecteur à boucle d'échantillonnage. Il existe des boucles de différents volumes. Le choix du volume de la boucle se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser. Le système de la boucle d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, ce qui est important pour l'analyse quantitative.

Détecteurs : Il en existe de plusieurs types : à absorption UV ou visible, à indice de réfraction, UV à barrette de diodes (DAD), à fluorescence, de type spectromètre de masse (MS), évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL) …

## I.2.CPG

La **chromatographie en phase gazeuse (CPG)** est, comme toutes les techniques de chromatographie, une technique qui permet de séparer des molécules d'un mélange éventuellement très complexe de nature et de volatilité très diverses. Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Elle est de plus en plus utilisée dans les principaux domaines de la chimie.

Le principe de la séparation par C.P.G. consiste à partager l'échantillon à analyser entre deux phases. L'une de ces phases est un liquide stationnaire uniformément réparti sous forme d'une pellicule mince sur un solide inerte de grande surface spécifique, tandis que l'autre phase est un gaz mobile qui s'écoule à travers l'ensemble stationnaire.

Le mélange à analyser est vaporisé à l'entrée d'une *colonne*, qui renferme une substance active solide ou liquide appelée *phase stationnaire*, puis il est transporté à travers celle-ci à l'aide d'un *gaz porteur*. Les différentes molécules du mélange vont se séparer et sortir de la colonne les uns après les autres après un certain laps de temps qui est fonction de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules.



Les appareils de chromatographie gazeuse sont principalement composés:

-d'un **four** (type chaleur tournante) qui permet une programmation de température ajustable de 20°C (-100°C pour certains systèmes) à 450°C et qui est également équipé d'un système de refroidissement rapide;

-d'un **système d'injection**, qui va permettre d'introduire et de rendre volatil l'échantillon à analyser. L'injection peut se faire d'une manière manuelle ou automatique à l'aide d'un échantillonneur;

-d'une **colonne** (*capillaire ou remplie*), sur laquelle les différentes molécules de l'échantillon injecté vont se séparer suivant leurs affinités avec la phase stationnaire;

-d'un **système de détection**, qui va permettre de mesurer le signal émis par les différentes molécules et de pouvoir les identifier. Pour l'enregistrement du signal émis par le détecteur, des logiciels sur PC remplacent avantageusement les enregistreurs analogiques sur papier;

-d'un **système de détendeur-régulateur** pour les gaz utilisés (hélium, hydrogène, azote et air comprimé). Sur les chromatographes modernes on trouve des systèmes électroniques pour la régulation des gaz qui sont également purifiés par des cartouches filtrantes.

Pour compléter les analyses, les chromatographes sont souvent couplés à d'autres instruments analytiques, notamment pour la spectrométrie de masse et la spectroscopie infra-rouge. En parfumerie, on utilise aussi le nez, détecteur extrêmement sensible à certaines molécules odorantes.

## *Principe de fonctionnement :*

L'échantillon (un liquide volatil) est d'abord introduit en tête de colonne par l'intermédiaire d'une microseringue qui va traverser une pastille en caoutchouc, appelée *septum*, pour se retrouver dans une petite chambre en amont de la colonne appelée *injecteur*. L'injecteur est traversé par le gaz porteur et porté à une température appropriée à la volatilité de l'échantillon. **Les quantités injectées peuvent varier de 0.2 à 5.0 μl.**

Ensuite, une fois rendu volatils, les différents composés de l'échantillon vont être emportés par le *gaz porteur* (ou gaz vecteur) à travers la colonne et se détacher les uns des autres en fonction de leur affinité avec la *phase stationnaire*. La phase stationnaire peut être un liquide non (ou peu) volatil (chromatographie gaz-liquide) ou un solide adsorbant (chromatographie gaz-solide). Dans les deux cas, la phase stationnaire va provoquer un phénomène de rétentionchromatographique avec les différents composés (appelés solutés). Plus le composé a d'affinité avec la phase stationnaire, plus il mettra de temps à sortir de la colonne. La grandeur expérimentale brute est appelée temps de rétention. C'est le temps qui s'écoule entre l'injection de l'échantillon et l'apparition du signal maximum du soluté au détecteur. Pour favoriser le transport de tous les composés à travers la colonne (élution), il faut déterminer la bonne température du four. On peut travailler en isotherme, c'est à dire avec une température fixe durant toute l'analyse ou avec un programme de température qui varie.

A la sortie de la colonne, les composés rencontrent un organe essentiel qui est appelé *détecteur*. Cet appareil évalue en continue la quantité de chacun des constituants séparés au sein du gaz porteur grâce à la mesure de différentes propriétés physique du mélange gazeux.

### Gaz : Le gaz porteur (ou gaz vecteur), est la phase mobile, dynamique de la chromatographie en phase gazeuse. C'est dans son flux que l'on injecte le mélange à analyser, et c'est lui qui le véhicule jusqu'au détecteur à travers toute la colonne.

Dans la plupart des cas, il doit être inerte vis-à-vis des solutés et de la phase stationnaire. Il y a donc quatre type de gaz utilisés : Hélium, Hydrogène, Azote et Argon.

La principale propriété des gaz vecteurs est leur insolubilité dans les liquides. Leur signal électrique n'apparaîtra pas sur le chromatogramme.

Four :C’est un four à bain d’air, pourvu de résistances chauffantes et d’un système de ventilation et de brassage pour l’homogénéisation de la température. La régulation est assurée par un thermocouple, grâce auquel la variation n’excède pas ± 0,2°C, pour un intervalle de fonctionnement allant de la température ambiante jusqu’à 400°C. Sa température est en général de 20°C inférieure à celle du soluté de plus bas point d’ébullition.

Injecteur : L'injecteur est logé dans un bloc métallique dont la température est régulée afin d'assurer une bonne homogénéité thermique du système. La température de l’injecteur est habituellement maintenue à environ 50°C au dessus du point d’ébullition du constituant le moins volatil de l’échantillon. L'échantillon va être introduit, à travers un *septum*, par l'intermédiaire d’une microseringue. L'échantillon sera vaporisé et les solutés traverseront l'injecteur grâce au gaz porteur, jusqu'à la tête de la colonne.

### Colonne : C'est l'organe principal. Elle est constituée d'un tube généralement métallique de diamètre intérieur de l'ordre du millimètre. Ce tube contient la phase stationnaire constituée par un liquide adsorbant fixé sur un solide inerte

La réussite d'une bonne séparation chromatographique dépend dans une large mesure du choix de la phase stationnaire.

On distingue les phases apolaires et les phases polaires. Les premières sont à base des hydrocarbures aliphatiques saturés ou des silicones (squalane, apiezon,...). Les secondes sont des polymères possédant des fonctions polaires : polyols, polyesters, polyamides.

En général, les phases polaires retiennent plus les composés polaires, alors que ceux-ci sortent plus rapidement des colonnes apolaires que les composés du même nom.

### Détecteur : Il existe plusieurs types de détecteurs.

Un TCD : détecteur électrique, basé sur le principe du pont de Wheaston : le passage des composants va faire varier la tension, cette variation est due à la différence de conductibilité de chaque composant.

Un FID : détecteur à ionisation de flamme : une tension de l'ordre de la centaine de volts est maintenue entre la buse de la flamme et une électrode entourant cette dernière. Lorsque les molécules traversent la flamme, elles sont ionisées ce qui provoque entre les électrodes un courant électrique qui est ensuite amplifié.

Un ECD : détecteur à absorption électronique : des électrons sont émis, en général par une source radioactive (rayonnement bêta), et traversent le gaz ; lorsqu'un électron rencontre une molécule de gaz, il peut être capturé, ce qui fait varier l'intensité du courant d'électrons, cette intensité étant mesurée en continu.

Un MS : spectromètre de masse, utilisant principalement l'impact électronique ou l'ionisation chimique comme modes d'ionisation.

NB: Un petit renseignement pour les fumeurs. La fumée de cigarette blonde a été analysée, et après analyse, celle-ci contient plus de 300 composants différents dont la plupart sous forme benzénique, naphténique et aromatique, et produits à très longues chaînes hautement cancérigènes.

## I.3.Chromatographie ionique

**Le principe de la CI est simple : une colonne est composée d'une résine chargée soit positivement (pour séparer des anions) soit négativement (pour séparer des cations). L'éluant emporte les anions ou les cations à séparer. Selon que l'interaction électrostatique entre la résine de la colonne et les ions à séparer est plus ou moins forte, la séparation se fera plus ou moins facilement.**

### **Principe**

Le principe de la CI est basé sur une échange d'ions sur résine. Les ions sont entraînés par une phase mobile et séparés par l'action de la phase stationnaire.

###

### **Phase stationnaire**

Dans la chromatographie d'échange d'ions, la phase stationnaire comporte des groupements ionisés (+ ou -) fixes; des ions mobiles de charge opposée assurent l'électroneutralité. Les ions retenus au voisinage des charges fixes sont échangeables avec les ions présents dans la phase mobile.

La séparation est basée sur cette propriété d'échange d'ions et ne peut donc s'appliquer qu'à des solutés ionisables.

Le principal inconvénient est que ce type d’échangeur doit être utilisé avec un éluant dont le pH est compris entre 2 et 9.

### Phase mobile

Les éluants sont des solutions aqueuses qui contiennent des ions échangeables avec les solutés fixés sur l'échangeur :

-solutions contenant un ion de densité de charge plus élevée et (ou) de concentration plus élevée.

-solutions d'un pH tel qu'il modifie la charge des ions fixés et (ou) des groupements fonctionnels et provoque leur libération dans l'éluant.

On peut éluer avec une solution de composition constante (conditions isocratiques) ou avec un gradient de pH et (ou) de force ionique, pour décrocher successivement les différents ions fixés sur l'échangeur.

### Applications

La chromatographie d'échange d'ions est utilisée pour séparer des molécules ionisables**,** quelle que soit leur taille : ions minéraux, acides aminés, peptides, protéines, nucléotides, acides nucléiques, glucides ionisés et lipides ionisés.

C’est une technique analytique qui permet l’analyse qualitative (par séparation des espèces présentes) et quantitative des espèces ioniques présentes dans un échantillon liquide dépourvu de matières en suspension.

## Modes de détection

Même si de nombreux détecteurs ont été développés ces dernières années, le plus courant reste le conductimètrecar c'est un détecteur universel pour les substances ioniques. Mais il faut quand même citer et préciser le fonctionnement du détecteur spectrophotométrique UV-visible (mesure directe en UV ou développement d'un complexe coloré) ainsi que la famille des détecteurs électrochimiques (ces 2 derniers étant des détecteurs sélectifs).

## I.4. Analyse quantitative

Cette analyse est basée sur le fait que l'aire des pics chromatographiques est proportionnelle à la concentration ou à la quantité de produit analysé.

Méthode de l'étalonnage externe :

Il est nécessaire de disposer d'une quantité

suffisante du produit afin de faire une courbe

d'étalonnage Aire = f(masse ou concentration du

produit), pour un volume injecté constant V.

L'injection ultérieure du même volume V de l'échantillon à doser permet, à l'aide de la mesure de l'aire du pic reportée sur la courbe d'étalonnage, de connaître la masse ou la concentration recherchée. Cette méthode est plus précise que celle qui consiste à ne faire qu'une mesureavec l'étalon et à utiliser une règle de trois :

Ae/me = Aet/met

A: Aire des pics e : échantillon

et : étalon m : masse du produit remplaçable par la concentration

Méthode des ajouts :

Cette méthode nécessite de posséder le produit à analyser pur; après avoir analysé l'échantillon, on ajoute à celui-ci des quantités connues m du produit avant de le chromatographier à nouveau ( faire au minimum deux ajouts), ce qui entraîne une variation de l'aire du pic.



Si m est la masse contenue dans l'échantillon à analyser :

Pente de la droite = (dA/dm) = Ae/m

soit m= Ae\*(dm/dA)

Si le produit ajouté est en solution, il faut tenir compte des effets de dilution.

Méthode de l'étalon interne (utilisée essentiellement en CPG) :

On compare la réponse du ou des produits à analyser à celle d'un étalon interne, donc introduit dans le mélange à doser et convenablement choisi.

L’étalon interne possède des propriétés proches ou identiques à celles du ou des composés analysé(s). Pour que cette méthode fournisse de bons résultats, il faut que le pic de l’étalon interne soit bien séparé des pics de tous les autres constituants présents dans l’échantillon, mais proche des autres pics.

Cette méthode présente l'avantage d'être indépendante du volume injecté dans le chromatographe.

Il existe deux façons différentes de réaliser un étalonnage interne :

* Première méthode expérimentale

Une solution étalon est préparée avec le ou les produits que l'on veut doser. Les masses sont connues m’1, m’2, et … me pour l'étalon ; à ces masses correspondent les aires A’1, A’2, …, A'e, sur le chromatogramme.

Dans l'échantillon contenant les masses m1, m2, … de solutés on ajoute me de l'étalon interne, ce qui donne les aires A1, A2, Ae.

On obtient :

m'1 = α1 A’1

m'2 = α2 A’2

me = αe A'e

avec α coefficient de proportionnalité

et k1 = (α1/αe) = (m'1 A’e /me A’1)

d'où la valeur k1 puisque toutes les données sont connues.

Dans l'échantillon inconnu on aura :

m1 = α1 A1

me = ae Ae

(m1/me) = (α1 A1/αe Ae) = k1(A1/Ae)

me, k1, A1, Ae sont connus.

* Seconde méthode expérimentale

On réalise une série de solutions étalon à concentration croissante en composé à quantifier, et on ajoute, dans chaque solution étalon, une quantité connue et soigneusement mesurée de l’étalon interne.

Les solutions ainsi préparées sont analysées, on connaît alors l’aire du pic de l’étalon interne et celle du composé à quantifier.

On peut donc tracer la droite suivante :

A

composer à doser

étalon

A

Mélange

inconnu +Etalon

C

composer à doser

composer à doser

étalon

C

CMélange inconnu / CEtalon

On introduit une quantité connue de l’étalon interne dans l’échantillon. Puis, connaissant l’équation de la droite d’étalonnage, on peut calculer le rapport des concentrations et enfin la concentration inconnue de l’échantillon.

# II. DOSAGE DE L'EUGENOL DANS LE CLOU DE GIROFLE

 L'eugénol est le principal composant aromatique du clou de girofle et est largement utilisé en parfumerie. Il s'agit du composé phénolique suivant



## II.1. Extraction

 L'eugénol est isolé du clou de girofle par **extraction au soxhlet**. 10 grammes de clous de girofle sont broyés grossièrement puis placés dans une cartouche (repeser ce qui va être réellement extrait). Cette cartouche est introduite dans un extracteur de soxhlet contenant 300ml de dichlorométhane.

**La solution est introduite dans une ampoule à décanter, et extraite avec 2 x 25ml de NaOH 1M. La fraction recueillie est alors acidifiée avec d’acide chlorhydrique (37%) aux gouttes à gouttes sous agitation. La vérification se fait à l’aide d’un papier pH. Décanter la solution et récupérer la phase organique (conserver). La phase aqueuse est ensuite extraite avec 2 x 25ml de dichlorométhane. La phase organique recueillie est alors ajoutée à celle recueillie précédemment et est évaporée à sec à l’aide d’un évaporateur rotatif. Enfin, le précipité est ramené à un volume précis de 50ml d’éthanol puis filtré sur un filtre 0.45µm.**

## II.2. Dosage par spectrophotométrie UV-Visible

 L’Eugénol est dosé par spectrophotométrie UV-Visible après avoir déterminé à l'aide d'une solution de référence ses caractéristiques spectrales (λmax).

 Le dosage est effectué par la méthode de l’étalonnage externe à l’aide de solutions de référence de concentrations connues (1 à 5 µg/ml). Déterminer également le coefficient d’extinction molaire (ε) à la longueur d’onde λmax. L’extrait final de l’Eugénol est dilué de l’ordre de 5000 fois pour que la valeur trouvée soit dans notre gamme étalon.

## II.3. CLHP ou HPLC

### II.3.a. Dosage par HPLC

 L’Eugénol est dosé par chromatographie CLHP en utilisant une colonne phase inverse C18, et un gradient d’élution eau / acétonitrile.

* Au préalable, un spectre UV de l’eugénol commercial sera effectué pour déterminer le λmax.
* Préparer une gamme d’étalonnage à l’aide de solutions de référence (eugénol commercial) de concentrations connues (0,1 à 0,5 mg/ml).
* Mettre au point les conditions d’élution permettant d’analyser l’eugénol contenu dans la solution éluée de la cartouche. Cette mise au point est réalisée avec une solution médiane de votre gamme.
* Identifier le pic de l’eugénol sur le chromatogramme.
* Réaliser un dosage par étalonnage externe de l’eugénol dans la solution éluée de la cartouche. **Diluer l’extrait final environ 20 fois de façon précise.**
* Déterminer la quantité de d’Eugénol extraite par **gramme de clou de girofle**.

### II.3.b. Analyse d’un mélange contenant de l’Eugénol par HPLC

On dispose d’une solution contenant 4 composés : -Eugénol

 -Carvone

 -3-hydroxyacétophénone

 -4-hydroxyacétophénone

et des 4 composés de référence.

* Faire un spectre UV de chacun des 4 composés afin de déterminer le λmax de chaque composé et de choisir la longueur d’onde à laquelle vous allez travailler.
* Chercher dans la littérature les formules des composés analysés afin de déterminer un ordre de sortie théorique.
* Optimiser les conditions de séparation de la solution mélange. Afin de trouver les conditions d’élutions adéquates, tester une élution isocratique et des gradients d’élution judicieux.
* Une fois les conditions de séparation optimisées, identifier les pics du chromatogramme grâce aux composés de référence. **ATTENTION : ne jamais injecter les produits commerciaux purs sur une colonne chromatographique**.

## II. 4. CPG-FID et CPG-SM

### II.4.a. Analyse d’un mélange contenant de l’Eugénol par CPG

On dispose d’une solution contenant 4 composés  -Eugénol

 -Carvone

 -α-terpinéol

 -Aldéhyde cinnamique

et des 4 composés de référence.

* Chercher les températures d’ébullition de ces quatre composés dans la littérature. Réfléchir à l’ordre de sortie des produits selon le type de colonne installée sur l’appareil de chromatographie gazeuse.
* Optimiser les conditions de séparation de la solution mélange.
* Une fois les conditions de séparation optimisées, identifier les pics du chromatogramme grâce aux composés de référence. **ATTENTION !! Ne jamais injecter les produits commerciaux purs sur une colonne chromatographique.**

### II.4.b. Dosage par CPG

 Le dosage de l'eugénol dans l'extrait est effectué en chromatographie en phase gazeuse à l'aide d'un étalon externe EE et d'un étalon interne EI.

L'étalon interne EI est introduit à une concentration connue dans l'extrait et par rapport auquel on estime la quantité d'eugénol présent dans le mélange. Il est essentiel que le pic du composé EE ne se superpose à aucun autre pic du mélange à analyser, qu'il soit présent à une concentration comparable à celles des différents composants et que son temps d'élution ne soit pas trop éloigné de celui du produit à doser.

* L'étalonnage externe est effectué à l'aide de solutions de référence d'eugénol (étalon externe EE) commercial de concentrations connues (0,1 à 3 ou 4 g/ml selon l’appareil).

Diluer l’extrait final environ 5 fois de façon précise. La concentration d'eugénol dans l'échantillon sera déterminée à partir de la courbe d'étalonnage obtenue donnant la surface du pic de l'eugénol en fonction de la concentration en eugénol de la solution injectée.

* Etalonnage interne : Pour le dosage de l'eugénol on prendra la carvone comme étalon interne EI

Voici un exemple de préparation de la gamme de solutions étalon, dans lesquelles on ajoute une quantité précise et constante d’étalon interne. Les concentrations en eugénol et en carvone sont à adapter selon l’appareil utilisé (Chrompack ou Delsi).



2 mg/mL

**

1



2 mg/mL

**Les résultats des trois dosages UV,CPG et CLHP seront comparés.**

# III DOSAGE DES SELS DANS L’EAU MINERALE

Le but de ce TP est l’analyse par chromatographie ionique d’une eau minérale et le dosage des ions nitrate, chlorure et sulfate.

**Le système de chromatographie ionique** est composé d’un système de pompage, d’un injecteur à boucle, d’une colonne, d’un suppresseur, d’un détecteur conductimétrique et d’un intégrateur.

- La phase mobile est une solution aqueuse de carbonate de sodium (6,4 mM) et d’hydrogénocarbonate de sodium (2 mM) préconisée pour la colonne.*Avant utilisation la phase mobile a été filtrée et dégazée pour éliminer les éventuelles particules qui pourraient boucher ou encrasser le système et éliminer les gaz dissous.*

-Le débit de la phase mobile est fixé à 1 ml/min.

-L’injecteur est une vanne Rhéodyne (boucle 20 l).

-La colonne est calibrée et remplie de phase stationnaire. Dans notre cas on utilise une phase stationnaire cationique (Metrosep A supp 4, 4 x 250 mm). La séparation des analytes est basée sur l’interaction plus ou moins forte entre les sites cationiques de cette phase stationnaire et les espèces ioniques de l’échantillon.

Un détecteur conductimétrique mesure en permanence en sortie de colonne la conductance de la phase mobile.

Pour cette manipulation il est nécessaire de bien rincer toute la vaisselle que vous allez utiliser avec de l’eau déminéralisée, puis MilliQ. En effet toute trace de détergent peut fausser considérablement vos mesures.

Vos pesées et déterminations de volumes doivent être très précises. Utilisez le matériel adapté : balances de précision, fioles jaugées (et non pas éprouvettes), pipettes jaugées, etc…Vous utiliserez uniquement de l’eau MilliQ pour la préparation de ces solutions.

* Toute analyse chromatographique commence par un « blanc » (injection 20 l eau MilliQ). Vérifier l’absence de tout contaminant et la stabilité de la ligne de base.

Pendant ce temps, trouver les caractéristiques de la colonne utilisée, et réfléchir au principe d’élution.

* On dispose de trois sels qui vont servir à déterminer les temps de rétention des anions correspondants et à réaliser les courbes d’étalonnage. Anticiper l’ordre de sortie des différents cations.

Préparer des solutions de chacun des sels à une concentration maximale en anion de 15 mg/l, afin de ne pas saturer la colonne et déterminer les temps de rétention de Cl-, SO42- et NO3-.

* Préparer une solution mère multi élémentaire (de tous les cations) à environ exactement 100mg/l en anions. Faire vérifier vos calculs avant de peser.

Préparer 4 solutions étalons à une concentration entre 5 et 20 mg/l. Réaliser l’étalonnage externe en injectant les étalons dans l’ordre de concentrations croissantes.

Réaliser les 4 courbes d’étalonnage.

**Attention, on n’injecte jamais la solution mère à 100mg/l !**

Pour préparer ces solutions salines, vous disposerez des sels suivants (les masses molaires sont données entre parenthèses):

 -KCl (M=74.56 g/mol)

 -MgSO4, 1H2O (M=138.4 g/mol)

 -KNO3 (M=101,10 g/mol)

Calculez combien vous devez peser pour faire chacune de vos solutions. Attention, on vous demande des solutions dont la concentration est en mg/l pour un anion, pas pour un sel.

**Préparer ces calculs avant de venir en TP, vous gagnerez beaucoup de temps !**

* Effectuer l’analyse de l’eau minérale.

Calculer la concentration des trois anions dans l’eau minérale.

# IV DOSAGE DU LIMONÈNE DANS DES HUILES ESSENTIELLES PAR CHROMTOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A UN SPECTROMETRE DE MASSE

**OBJECTIF DU TP :**

Le limonène est un hydrocarbure terpénique et plus précisément un monoterpène. Il est présent dans de nombreuses huiles essentielles et notamment dans celles provenant des agrumes. L’objectif du TP est d’identifier le limonène dans les huiles essentielles d’orange douce et de citron en analysant leur spectre de masse. La teneur en limonène des huiles essentielles sera ensuite déterminer par étalonnage interne.

**CARACTERISTIQUES DE L’APPAREIL** :

 Le GC-MS utilisé est un ThermoFisher équipé d’une colonne capillaire de type HP5-MS avec comme caractéristiques : 30 m x 0,25 m x 0,25 µm. Le gaz vecteur est de l’hélium. L’injecteur est en mode split avec un ratio de 100. Le détecteur est un spectromètre de masse à impact électronique avec séparation des carbocations formés par un analyseur quadripôle. Le vide régnant dans l’enceinte est de 57-59 mTorrs. Le détecteur enregistre les signaux dont le rapport m/z est compris entre 20 et 200.

 Pour ce TP, les volumes à injecter pour chacune des solutions sont toujours de 1 µL.

**PREPARATION DES SOLUTIONS A INJECTER** :

 Préparation de la gamme étalon

Afin de pouvoir doser le limonène dans les huiles essentielles, il faut mettre en place un étalonnage. Dans ce TP, vous effectuerez un étalonnage interne.

Une solution mère à 2 mg/mL en limonène est mise à votre disposition. A partir de cette solution, préparer 4 solutions étalons avec des concentrations comprises entre 0,2 et 1 mg/mL. L’étalon interne utilisé est la carvone. Elle doit être introduite dans chaque étalon de manière à avoir une concentration en carvone à 0,5 mg/mL. Tous les prélèvements doivent être effectués avec des pipettes automatiques. Le solvant des solutions est l’éthanol. Les solutions sont préparées dans des piluliers de 2 mL.

 Préparation des échantillons

A partir des deux huiles essentielles commerciales (orange douce et citron), préparer 2 solutions en introduisant 10 µL de chaque huile essentielle dans des fioles de 10 mL. Attention à penser à l’étalon interne ! Si vous avez un doute ou une question, appelez votre enseignant avant de réaliser ces 2 solutions !

**REALISATION DES ANALYSES** :

 Création de la séquence d’analyse

Sélectionner « Sequence Set Up » et remplir le tableau de la manière suivante. Dans « File name » mettre le nom de votre étalon ou échantillon, dans « Path » double cliquer (My computer, OS(C), Xcalibur, TPLP), dans « Inst Meth » double cliquer et charger la méthode TPLPlimo (My computer, OS(C), Xcalibur, methods) puis dans « Position » indiquer la position du vial sur le passeur d’échantillon. Une fois ces 4 colonnes remplies, faire « entrée » sur le clavier et remplir les lignes suivantes de la même manière pour les solutions à analyser suivantes. Une fois votre séquence terminée, placer le curseur sur la ligne blanche en dessous de la dernière ligne remplie, cliquer sur File, Save as, Xcalibur, TPLPro-synthèse et enregistrer votre séquence d’analyse en y inscrivant un nom (n° de groupes par exemple) dans C:/Xcalibur/TPLPro-synthèse.

Pour injecter, placer le curseur sur la ligne que l’on souhaite analyser (la ligne devient bleue) puis cliquer sur l’icône « Run Sequence » et vérifier que le numéro des lignes indiquées correspond bien à celui que vous souhaitez, cliquer sur OK. L’injection démarre automatiquement

 Pour visualiser le chromatogramme pendant son acquisition, cliquer sur l’icône « Real Time Plot View ».

 Visualisation des spectres de masse

Une fois l’acquisition terminée, on peut analyser le chromatogramme obtenu. Pour cela, il faut revenir au menu principal en cliquant sur l’icône en dessous de « File » puis cliquez sur « Qual Browser ». Cliquer sur File, Open et ouvrer le chromatogramme que vous souhaitez traiter.

La page qui s’ouvre contient 2 fenêtres :

- Celle du haut présente le chromatogramme d’ions (TIC)

- Celle du bas qui correspond au spectre de masse

En ce qui concerne les solutions étalons, vérifier que le chromatogramme ne contient que 2 pics (limonène et carvone) sinon c’est qu’il y a une pollution dans la solution.

Pour supprimer le bruit de fond du chromatogramme, cliquer sur la punaise du spectre de masse pour l’activer (punaise de face sur fond vert). Clic droit sur le spectre de masse, sélectionner « Substract Spectra » puis « 2 Ranges ». Aller avec la souris sur la fenêtre du haut et tirer un trait horizontal à droite puis à gauche de chacun des pics.

Pour analyser un pic en particulier, activer la punaise du chromatogramme. A l’aide de la souris créer un cadre autour du pic à analyser afin de faire un zoom. Activer ensuite la punaise du spectre de masse et aller avec la souris sur la fenêtre du haut et cliquer au milieu du pic à analyser. Dans la fenêtre du bas apparaît alors le spectre de masse correspondant.

 Travail à réaliser

 - Identifier sur un chromatogramme de solution étalon les pics du limonène et de la carvone grâce à leur température d’ébullition, leur masse molaire et leur masse d’ion radical moléculaire

 -Retrouver les principaux fragments du limonène aux m/z suivants : 121 ; 93 ; 68 et 41.

**QUANTIFICATION DU LIMONÈNE :**

Pour connaître l’aire de chacun des pics, faire un clic droit et sélectionner « Peak Detection » puis « Toggle Detection in this Plot ». Clic droit de nouveau sur le chromatogramme et sélectionner « Display Options », aller sur l’onglet « Labels » et cochez la case « Area » et faire OK. Répéter cette opération pour chaque chromatogramme.

 Travail à réaliser

 - Tracer la droite d’étalonnage du rapport des aires (Alimo/Acarv) en fonction du rapport des concentrations (Climo/Ccarv) à l’aide des 4 solutions étalons.

 - Comparer les spectres de masse des 2 huiles essentielles : Sont-ils différents ? Y-a-t-il du limonène dans les 2 ?

 -Déterminer la concentration en limonène présent dans chacune des 2 huiles essentielles