

## TD Protocoles analytiques

Enseignant : Y. FRANCOIS

**Yannis FRANCOIS**

Laboratoire de Dynamique et Structure  
Moléculaires par Spectrométrie de Masse  
Tour de Chimie, 12ème étage

e-mail: yfrancois@unistra.fr

### Postulat du protocole analytique à résoudre

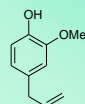
Dosage de l'eugénol dans un mélange complexe par HPLC/UV

Matériel à disposition :

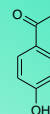
- Un mélange de quatre composés (Eugénol, Carvone, 3-hydroxyacétophénone, 4-hydroxyacétophénone)
- Le handbook
- Un spectromètre UV
- Une chaîne HPLC à détection UV
  - ✓ Phase stationnaire C18
  - ✓ Phase mobile : mélange Acétonitrile/eau (concentration variable)
  - ✓ Boucle d'injection 20 µL
- Les quatre composés standards
- Tout le matériel de laboratoire classique (pipette, fiole jaugée, etc...)

### Formule chimique des composés

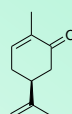
➤ Eugénol



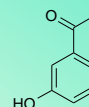
➤ 4-hydroxyacétophénone



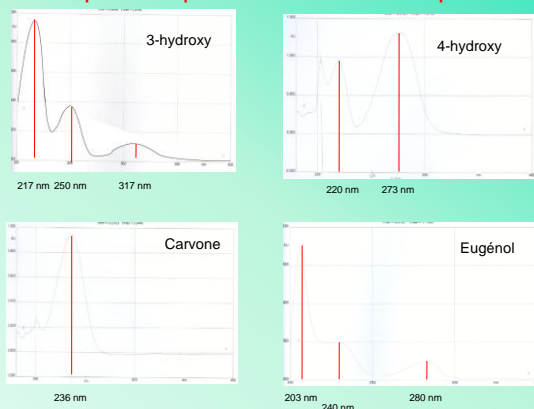
➤ Carvone



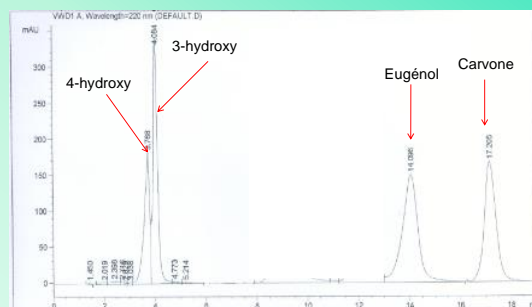
➤ 3-hydroxyacétophénone



## Propriétés spectrales UV des composés

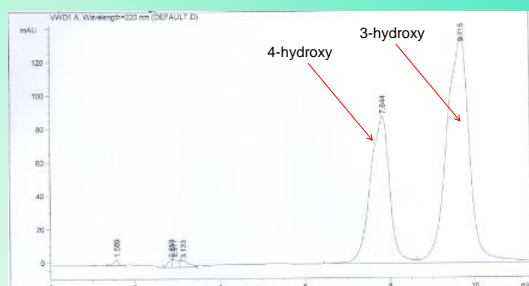


## Optimisation séparation



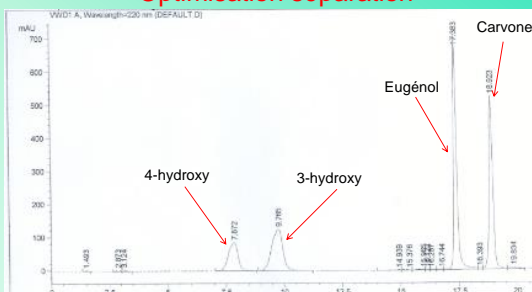
Condition : mode isocratique Eau/ACN 40/60

## Optimisation séparation



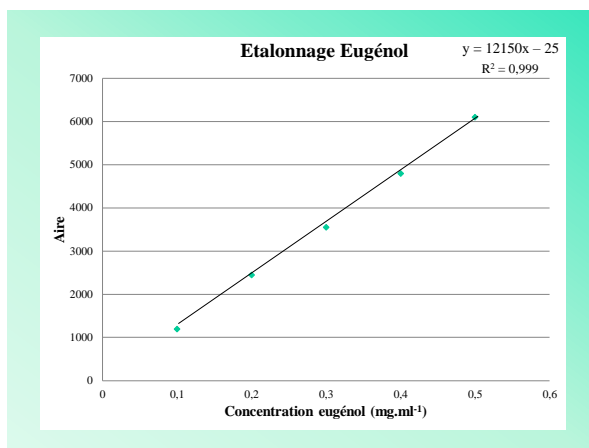
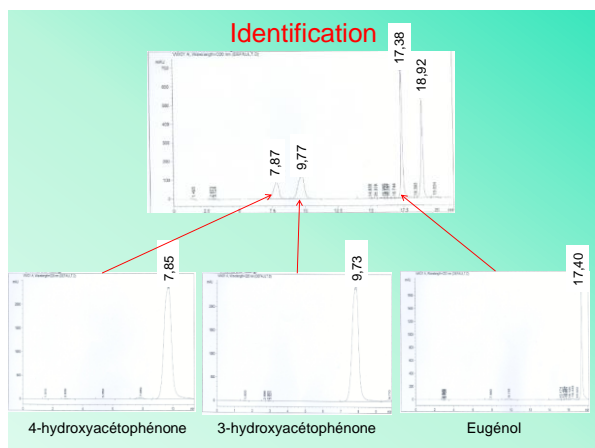
Condition : mode isocratique Eau/ACN 80/20

## Optimisation séparation



Condition : mode gradient

Temps	% ACN	% H <sub>2</sub> O
0.00	20	80
10.00	20	80
13.00	60	40
20.00	60	40
21.00	20	80



### Aspects quantitatifs

#### Critère de qualité

- Moyenne arithmétique  $\bar{x}$  de n mesure :
 
$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{\sum x_i}{n}$$
- Écart type ou déviation standard :
 
$$s = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$
- Coefficient de variation CV :
 
$$CV = 100 \times \frac{s}{\bar{x}}$$

Bonne indication de la dispersion des résultats

### Postulat du protocole analytique à résoudre

Dosage de l'eugénol extrait du clou de girofle par différentes techniques

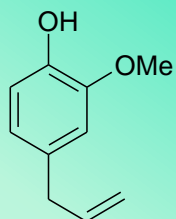
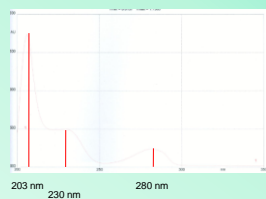
Matériel à disposition :

- Des clous de girofle
- Le Handbook
- Un appareil Soxhlet, une ampoule à décanter et un évaporateur rotatif
- un spectromètre UV
- Une chaîne CPG à détection FID
  - ✓ Phase stationnaire carbowax (polaire)
  - ✓ Phase mobile : Hélium
  - ✓ Injecteur manuel
- Une chaîne HPLC à détection UV
  - ✓ Phase stationnaire C18
  - ✓ Phase mobile : mélange Acétonitrile/eau (concentration variable)
  - ✓ Boucle d'injection 20 µL
- De la soude, de l'eugénol et de la carvone.
- Tout le matériel de laboratoire classique (pipette, fiole jaugée, etc...)

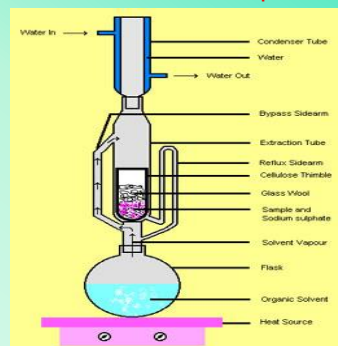
## Recherche littérature

### ➤ Eugénol

bp = 255°C



## Extraction solide – liquide



Appareil Soxhlet

## Extraction liquide – liquide

### Mode opératoire :

- Extraire l'Eugénol du mélange extrait du clou de girofle (lavage)
- Extraction avec de la soude 1 M (récupération de l'Eugénol en phase aqueuse)
- Acidification (pH 2) avec de l'acide chloridrique
- Extraction au dichlorométhane
- Evaporation à l'évaporateur rotatif
- Récupération dans un volume connu de MeOH
- Filtrage de l'extrait final

## Etude en UV

### Protocole :

- Fixer la longueur d'onde à 203 nm ( $\lambda_{max}$ )
- Réaliser une gamme d'étalonnage dans le domaine de linéarité de l'appareil
- Doser l'extrait

## Etude en HPLC/UV

### Protocole :

- Fixer la longueur d'onde à 203 nm ( $\lambda_{\text{max}}$ )
- Réaliser une gamme d'étalonnage dans le domaine de linéarité de l'appareil
- Doser l'extrait

## Etude en CPG FID

### Protocole :

- Déterminer la température du four pour avoir un pic efficace et le plus rapide possible
- Réaliser une gamme d'étalonnage dans le domaine de linéarité de l'appareil
- Doser l'extrait

**Attention !!!**  
**Injection manuelle**

## Méthode d'étalonnage

### Deux méthodes :

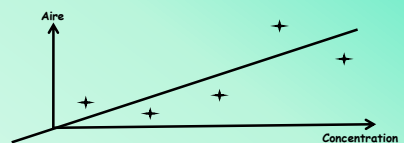
- Etalonnage externe
- Etalonnage interne

## Aspects quantitatifs

### Étalonnage interne

#### Rappel :

Le problème majeur de l'étalonnage externe est basé sur la non répétabilité de l'injection.



#### Résultat :

Droite d'étalonnage non exploitable car non représentative

Solution : étalonnage interne

## Aspects quantitatifs

### Étalonnage interne

#### Nomenclature :

$E_i$  : étalon interne  
 $E_{ech}$  : échantillon inconnue analysé  
 $E_{st}$  : échantillon standard

#### Principe :

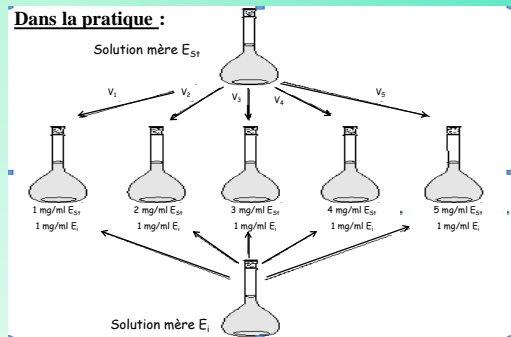
- Utiliser un  $E_i$  à une concentration fixe
- Optimiser la séparation des deux composés  $E_i$  et  $E_{ech}$
- Réaliser une droite d'étalonnage en faisant varier la concentration de l' $E_{st}$  et en gardant concentration de l' $E_i$  fixe
- Représenter la droite d'étalonnage :  

$$\text{Aire } E_{ech} / \text{Aire } E_i = f([E_{ech}] / [E_i])$$
- Injecter le mélange contenant l' $E_i$  et l' $E_{ech}$
- Reporter la valeur mesurée sur la courbe et en déduire  $[E_{ech}]$

## Aspects quantitatifs

### Étalonnage interne

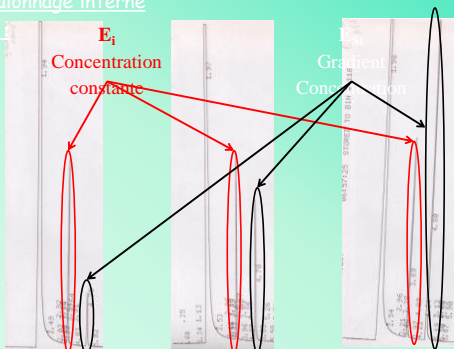
#### Dans la pratique :



## Aspects quantitatifs

### Étalonnage interne

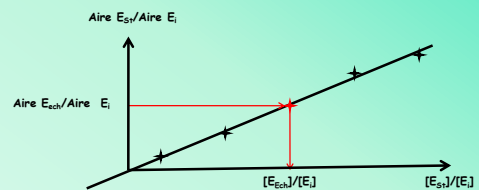
#### Résultat :



## Aspects quantitatifs

### Étalonnage interne

#### Résultat :



$$[E_{ech}] = (A_{E_{ech}} / A_{E_i}) \cdot [E_i]$$

## Aspects quantitatifs

### Étalonnage interne

#### Propriété de l'E<sub>i</sub> :

- Structure chimique très proche
- Temps de rétention très proche
- Concentration très proche

#### But de l'utilisation d'un E<sub>i</sub> :

- Utiliser un rapport de concentration
- Corriger des erreurs de répétabilité de volume injecté

## Aspects quantitatifs

### Critère de qualité

- Moyenne arithmétique  $\bar{x}$  de n mesure :

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{\sum x_i}{n}$$

- Écart type ou déviation standard :

$$s = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

- Coefficient de variation CV :

$$CV = 100 \times \frac{s}{\bar{x}}$$



Bonne indication de la dispersion des résultats

## Postulat du protocole analytique à résoudre

Dosage du magnésium dans la Contrex par spectroscopie d'absorption atomique

#### Matériel à disposition :

- Du sel de magnésium (MgSO<sub>4</sub>, 1 H<sub>2</sub>O)
- Le tableau périodique des éléments
- Un spectro d'absorbance atomique
- ut le matériel de laboratoire classique (pipette, fiole jaugée, etc...)

## Etude en SAA

#### Protocole :

- Déterminer la longueur d'onde d'étude
- Réaliser une gamme d'étalonnage dans le domaine de linéarité de l'appareil
- Préparation de la solution mère de Mg
- Droite d'étalonnage
- Doser la Contrex

**Attention !!!**  
**Effet de matrice**

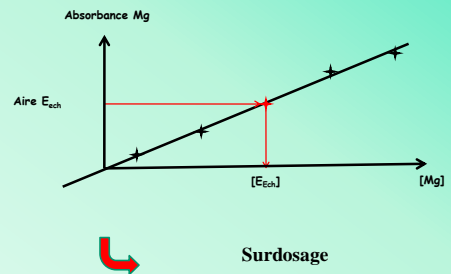
## TABLEAU PÉRIODIQUE DES ÉLÉMENTS

Tableau périodique des éléments montrant les numéros atomiques (Z), les symboles chimiques, et les noms des éléments. Le tableau est coloré par groupes (métaux alcalins, alcalino-terreux, métaux de transition, métalloïdes, non-métaux, gaz nobles). Des logos de CERMES, ATERNET, et science.gouv.fr sont présents en bas.

## Aspects quantitatifs

### Étalonnage

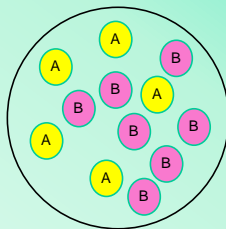
#### Résultat :



## Aspects quantitatifs

### Étalonnage par ajouts dosés

Mélange de A et B



On veut doser A

Le détecteur doit détecter A

Mais B interfère car le détecteur détecte un peu B

Alors on aura un signal correspondant à la quantité de A et un peu de la quantité de B

Du coup, [A] sera surestimée

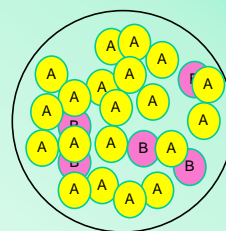


Effet de matrice

## Aspects quantitatifs

### Étalonnage par ajouts dosés

Mélange de A et B  
Dopé en A



On veut doser A

L'échantillon est dopé en A (concentration connue)

B interfère toujours

Mais l'effet de B est réduit jusqu'à négligeable

Du coup, [A] n'est plus surestimée



Suppression  
Effet de matrice

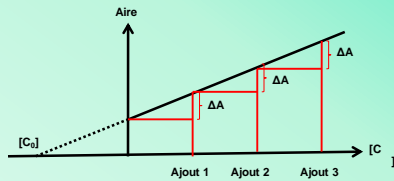


## Aspects quantitatifs

### Étalonnage par ajouts dosés

#### Principe :

Ajouter à une concentration inconnue mais constante, de notre composé des ajouts successifs de substance à analyser



## Aspects quantitatifs

### Critère de qualité

- Moyenne arithmétique  $\bar{x}$  de n mesure :

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{\sum x_i}{n}$$

- Écart type ou déviation standard :

$$s = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

- Coefficient de variation CV :

$$CV = 100 \times \frac{s}{\bar{x}}$$



Bonne indication de la dispersion des résultats