

# TP13 OPTIMISATION D'UNE METHODE D'IDENTIFICATION ET DE DOSAGE D'ALCOOLS PAR C.P.G.

## 1. Conditions opératoires et réactifs:

Colonne capillaire DBWAX (polaire)

Gaz vecteur (carrier) : Azote à un débit de 1 mL/mn

Gaz de la flamme du détecteur (FID°) : - Hydrogène mL/mn (60 kPa)

- Air mL/mn (100 kPa)

Températures : injecteur (inlet) : 240°C

four (oven): programme à gradient de température

détecteur (détector) : 250°C

Exploitation des résultats : logiciel AZUR ; (si intégrateur atténuation 258)

Volumes injectés : 1µL mesurés à la seringue "Hamilton" ; injecteur « split » 1/50

Le solvant utilisé est l'eau déminéralisée. En raison de la volatilité des produits analysés, conserver toutes les solutions en flacons, fioles ou tubes bouchés (parafilm) et dans la glace.

Solution étalon d'Ethanol à 10 g/L (en flacon bouché à 4 °C)

Solution étalon de Propanol-2 (isopropanol) Méthanol, Propanol-1, Butanol-1 à 10 g/L

## 2. Étude quantitative et découverte du logiciel Azur :

Programmation de la température du four (oven) pour un cycle : initial 1 min à 40°C, puis gradient (slope) de 10°C par min pendant 10 min (température finale de 120°C).

Préparer des solutions contenant environ 0,5 g/L des différents alcools proposés. Paramétrer l'acquisition sur le logiciel AZUR voir topo §2 acquisition.

Lorsque le Chromatographe est en position « Stand by » appuyer sur « Start », lorsque « waiting for start » s'affiche démarrer le cycle programmé en appuyant sur « Start » lors de l'injection.

Injecter ces solutions dans le chromatographe en arrêtant l'acquisition entre chaque injection. Identifier le pic de l'alcool. Noter les temps de rétention ( $T_R$ ) pour les différents alcools. Pour la série des alcools primaires, tracer la courbe :  $\log(T_R) = f(n)$  avec n égal au nombre de carbones.

- Déterminer le meilleur étalon interne pour le dosage de l'éthanol.
- Modifier les paramètres du programme pour diminuer le temps d'analyse (phase initiale, pente et durée du gradient, phase finale isotherme...)
- Réaliser un mélange contenant tous les alcools à environ 0,5 g/L ; injecter ce mélange, identifier les pics et comparer les temps de rétention à ceux des alcools purs.

## 3. Étude quantitative avec étalon interne :

Préparer des solutions étalons d'Éthanol contenant de 0,01 à 5 g/L et contenant exactement la même concentration finale d'étalon interne (1 g/L).

Travailler en isotherme à 100°C ; programmer un temps d'analyse de 10 min.

Injecter ces solutions dans le chromatographe. Identifier les pics et établir les rapports de surfaces. Noter les temps de rétention.

Établir le rapport : Surface du pic de l'Ethanol

$$R_s = \frac{\text{Surface du pic de l'Ethanol}}{\text{Surface du pic de l'étalon interne}}$$

Tracer les droites d'étalonnage : surface du pic = f[Éthanol] et  $R_s = f[\text{Éthanol}]$ . Conclure quant à l'intérêt de l'étalon interne et déterminer la zone de linéarité de la méthode.

## 4. Préparation des échantillons (ne sera pas réalisée)

Réaliser une dilution, dans l'eau déminéralisée, de l'échantillon à analyser, dilution telle que la teneur présumée en Éthanol soit comprise dans la zone de linéarité (déterminée en 3). Pour cette dilution, tenir compte de l'ajout de l'étalon interne dans la même proportion que les étalons.

Injecter dans le chromatographe les échantillons.

En déduire la concentration massique et molaire en éthanol des échantillons analysés.

Données :

	Masse volumique	Masse molaire	Pt ébullition
Méthanol	0,793	32,0	65,0
Éthanol	0,790	46,1	78,5
Propanol-1	0,803	60,1	97,1
Propanol-2	0,784	60,1	82,4
Butanol	0,809	74,1	117,5

# CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

Le but de cette manipulation est :

- de réviser l'utilisation du chromatographe et de ses annexes ;
- d'étudier quelques paramètres influençant la séparation (structure du soluté, pouvoir éluant de la phase mobile, débit) ;
- de revoir des notions importantes :  
fine granulométrie; force élutive ou pouvoir éluant; haute pression; élution isocratique ou en gradient; chromatographie en phase inverse; schéma fonctionnel du chromatographe.

Toute chromatographie peut être transposée en chromatographie liquide haute performance ou CLHP à condition de disposer d'un matériau de garnissage de colonne qui supporte les hautes pressions. La manipulation d'aujourd'hui consiste à séparer et identifier les constituants d'un mélange (HPLC analytique et qualitative).

La technique utilisée est la CLHP de partage, à polarité de phase inversée : la phase fixe, de fine granulométrie, est une silice (naturellement polaire) rendue apolaire par greffage de C18 (octadécyl) et la phase mobile est un mélange polaire méthanol-eau utilisé dans des conditions isocratiques. L'élution est suivie par spectrophotométrie à 252 nm.

Spectres d'absorption dans l'UV et calcul du  $\epsilon_M$  à 252 nm des solutés analysés : le tracé des spectres, le choix de  $\lambda$  optimale et la détermination expérimentale du coefficient d'absorption linéique molaire seront réalisés en manipulation annexe.

## 1. SOLUTES ET PREPARATION DES SOLUTIONS

Phase mobile :

Méthanol de qualité spéciale HPLC (servira également à réaliser toutes les solutions standards, inconnus et toutes les dilutions) et eau déminéralisée.

Solutés : préparer les solutions filles et un mélange des 4 solutés.

	solution mère dans le méthanol pur	solution fille dans le méthanol ou l'acétonitrile	volume final conseillé
Toluène	0,1mL dans 10 mL	s. mère diluée au 1/50	10 mL
4-nitrotoluène	10mg dans 10 mL	s. mère diluée au 1/50	10 mL
$\alpha$ -tétralone	0,1mL dans 10 mL	s. mère diluée au 1/500	10 mL
Nitrobenzène	0,1 mL dans 10 mL	s. mère diluée au 1/500	10mL
Mélange 4 solutés	Les mêmes	Les mêmes	10 mL

## 2. CONDITIONS OPERATOIRES

Longueur d'onde du détecteur : 252 nm (*à justifier d'après les spectres d'absorbances*)\*

Intégrateur : vitesse du chariot = 0,5 cm/min.

atténuation = 256 à ajuster selon les résultats

Phase mobile : méthanol/eau (ou acétonitrile/eau) 70/30 (préparer 0,5 L filtré et dégazé)

Débit : 0,8 mL/min.

## 3. MANIPULATION

### 3.1. Conseils pratiques

Des précautions s'imposent pour maintenir en bon état les têtes de pompe et la colonne :

- filtrer au préalable phase mobile et solutions sur membrane pour éliminer toute particule solide ;
- éviter d'imposer de brusques variations de débit, donc de pression, à la colonne, éviter de

dépasser une certaine pression fixée par le constructeur ; dégazer les solutions injectées environ 20 min dans une cuve à ultrason ou sous vide,

- protéger la colonne par une précolonne
- rincer en fin de manipulation la boucle et la colonne avec l'éluat (éventuellement avec du solvant pur) ; ne pas laisser la colonne sécher

Précautions indispensables pour obtenir des résultats corrects :

- rincer l'ensemble seringue-injecteur avec la nouvelle solution avant toute injection; tourner la poignée de la vanne d'injection le plus rapidement possible (avec les gestes adaptés) ;
- maintenir le réservoir de solvant pratiquement fermé pour éviter une évaporation des solvants qui modifierait la composition de la phase mobile et la contamination par l'atmosphère ;
- démarrer l'enregistrement simultanément à l'injection

### 3.2. Mesure des temps de rétention

Amorcer la pompe. Équilibrer la colonne avec la phase mobile pendant 20 min et vérifier la stabilité de la ligne de base. Régler le zéro du détecteur.

Régler l'intégrateur en choisissant notamment la vitesse de défilement du papier et l'atténuation ; ces deux paramètres pourront être modifiés en fonction des résultats obtenus (Traitement possible par logiciel AZUR).

Injecter 20 $\mu$ l de chacun des solutés, (faire une analyse critique du premier pic obtenu et modifier éventuellement la quantité injectée (dilution de la solution-mère) et les réglages de l'intégrateur), puis 20 $\mu$ l d'un mélange des 4 solutés. Injecter du méthanol pur pour bien observer le temps mort "tm" de la colonne. Noter les temps de rétention "tr" et la pression.

### 3.3. Influence du débit sur les temps de rétention

Refaire quelques injections avec une nouvelle phase mobile : méthanol/eau 80/20, avec le même débit. Équilibrer la colonne avec la nouvelle phase mobile pendant 20min et vérifier la stabilité de la ligne de base. Régler le zéro du détecteur). Noter les temps de rétention.

Calculer les rapports  $tr_{70/30} / tr_{80/20}$  pour chaque soluté, conclure.

## **4. RESULTATS**

Présenter les résultats sous forme de tableaux.

A partir de l'expérience réalisée en 3.2 discuter l'influence de la structure chimique sur tr.

Conclure quant à l'influence :  
\* de la nature et de la polarité de la phase mobile sur tr  
\* du débit sur tr

Calculer le nombre de plateaux théoriques de la colonne pour un soluté (cf sujet B TS)

Discuter quelques caractéristiques de la technique : volume mort ; durée moyenne d'une analyse (liée aux valeurs moyennes des temps de rétention) ; consommation de solvants par analyse ; quantités détectées dans les conditions d'analyse