

UNIVERSITE DE LORRAINE
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES

L2 Chimie

2024-25

Méthodes séparatives en chimie analytique

M. Hébrant/M. Mallet/A. Chakroun

Extraction liquide-liquide

Exercice 1 :

Afin de contrôler la teneur en diazépam dans une unité de fabrication de comprimés de valium, on effectue le dosage de cette molécule par extraction selon le protocole suivant :

On prélève 5 comprimés pesant chacun 0,12g et on les réduit en poudre. On prélève 500mg de cette poudre exactement pesée. On ajoute 20 mL de tampon pH 8,1. On extrait par 3 fois 10 mL d'éther. L'éther est évaporé et le résidu sec repris par 50mL de HCl molaire. Après dilution au 1/200ème avec le même acide, on effectue une mesure par spectrophotométrie UV à une longueur d'onde de 278nm et en utilisant une cuve de 1cm. L'absorbance mesurée est égale à 0,59. Le rendement total de l'extraction est de 96,5%.

1. Quelle est la teneur en Diazépam exprimée en mg par comprimé ?
2. Combien d'extraction auraient été nécessaires pour obtenir un rendement supérieur à 99% ?

Données :

$$\varepsilon = 1470 \text{ g}^{-1} 100 \text{ ml cm}^{-1}$$

Coefficient de partage $D = 4,12$ à $\text{pH}=8,1$

Exercice 2 :

On dissout 7,5 mg d'un composé A dans 100 mL d'eau distillée. 50 mL de cette solution sont mis en présence de 20 mL d'heptane. On agite jusqu'à obtention de l'équilibre entre les deux phases. On mesure alors les absorbances en cuve de 2 cm à 250 nm pour la phase aqueuse, à 245 nm pour la phase organique.

L'absorbance de la phase supérieure à 245 nm est 0,386 ; l'absorbance de la phase inférieure à 250 nm est de 0,278.

Sachant que les coefficients d'absorption molaires de A :

– à 250 nm en solution aqueuse est $800 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$

– à 245 nm dans l'heptane est de $900 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$

1. Quel est la constante de partage heptane / eau du composé A ?
2. Quelle est la masse molaire de A ?
3. Quelle quantité de A exprimée en mg reste dans la phase aqueuse si on extrait 50 mL de la solution initiale de composé A par 2 x 10 mL d'heptane (soit deux extractions successives à l'aide 10 mL d'heptane chacune)?

Remarques :

Densité de l'heptane = 0,74

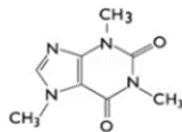
On suppose A non ionisable

Les méthodes de quantification :

Exercice 3.

On se propose de doser par HPLC de la caféine contenue dans le coca-cola® par deux méthodes différentes :

- a) la droite d'étalonnage externe
- b) la méthode des ajouts dosés



L'analyse est réalisée sur une colonne C18 (100 mm de long, 5µm de diamètre de particules) en mode isocratique avec pour éluant un mélange acétonitrile /eau (70/30 v/v). La pression est de 141 bars. La détection se fait en UV à 254 nm. La boucle d'injection a un volume de 20 µL.

Préparation de la solution mère (Sm) : une extraction a été réalisée sur 250 ml de coca-cola®. La totalité de la caféine recueillie a été dissoute dans de l'éluant et complétée à 20 ml dans une fiole jaugée.

Préparation de la solution fille (Sf) : Dans une fiole de 20 ml, on a introduit 30,0 µL de la solution mère préparée précédemment et on a complété à 20 ml avec de l'éluant.

a) La droite d'étalonnage externe :

Préparation de solutions étalons standards : à partir d'une solution de caféine de référence à 1,021 g L⁻¹ dans l'éluant, on a préparé 5 solutions diluées dans des fioles jaugées de 20 ml. Ces solutions sont injectées à l'aide d'une seringue de 250 µL.

Dosage de la caféine contenue dans le coca-cola® : on injecte 20µL de la solution fille (Sf) à l'aide d'une seringue de 250 µL. L'AUC du pic de la caféine est de 0,312.

Fiole	Volume de la solution de caféine de référence (µL)	AUC* du pic de la caféine
A	10	0,124
B	20	0,232
C	30	0,331
D	40	0,447
E	50	0,548

* AUC : Area Under Curve

b) Méthode des ajouts dosés :

Préparation des solutions standards et dosage de la caféine contenue dans le coca-cola : à partir d'une solution de caféine de référence à $1,021 \text{ g L}^{-1}$ dans l'éluant et de la solution mère (S_m) de caféine à doser, 5 solutions diluées sont préparées dans des fioles jaugées de 20 ml. Ces solutions sont injectées dans la boucle d'injection de $20 \mu\text{L}$.

Fiole	Volume de la solution de caféine de référence (μL)	Volume de la solution mère (S_m) de caféine (μL)	AUC du pic de la caféine
A	0	50	0.508
B	5	50	0.562
C	10	50	0.618
D	15	50	0.671
E	20	50	0.728

Déterminer la concentration en caféine selon les deux méthodes.

Exercice 4. On souhaite doser la molécule d'eugénol ($t^\circ\text{ébullition} = 254^\circ\text{C}$) contenue dans l'essence de girofle par chromatographie en phase gazeuse avec étalonnage interne (EI).

Les conditions de l'analyse chromatographique sont les suivantes :

Colonne : HP.INNO Wax (polyéthylène glycol : PEG) 30m x 0.53mm, $e = 1\mu\text{m}$.

Gaz vecteur : Azote, pression d'entrée : 210 kPa

Chromatographe : HP 4890, injecteur : 260°C , mode « split », rapport de division 100/4. Four : 185°C

Détecteur : détecteur à ionisation de flamme (FID) : 200°C H_2 : pression d'entrée 150kPa. Air : pression d'entrée : 300kPa.

1. La phase stationnaire est-elle polaire ou apolaire ? Cette phase- a-t-elle plus d'affinité pour les composés polaires ou apolaires ? Quel est le composé le plus polaire entre l'eugénol et le diphényl ?

L'étalon interne est une solution de diphényl ($T^\circ\text{ébullition} = 255^\circ\text{C}$) à la concentration de 70 mg.L^{-1} dans l'acétone ($T^\circ\text{ébullition}$ acétone = 56°C). On prépare 5 étalons en pesant précisément une masse d'eugénol pur auquel on ajoute $0,1 \mu\text{L}$ de la solution d'étalon interne.

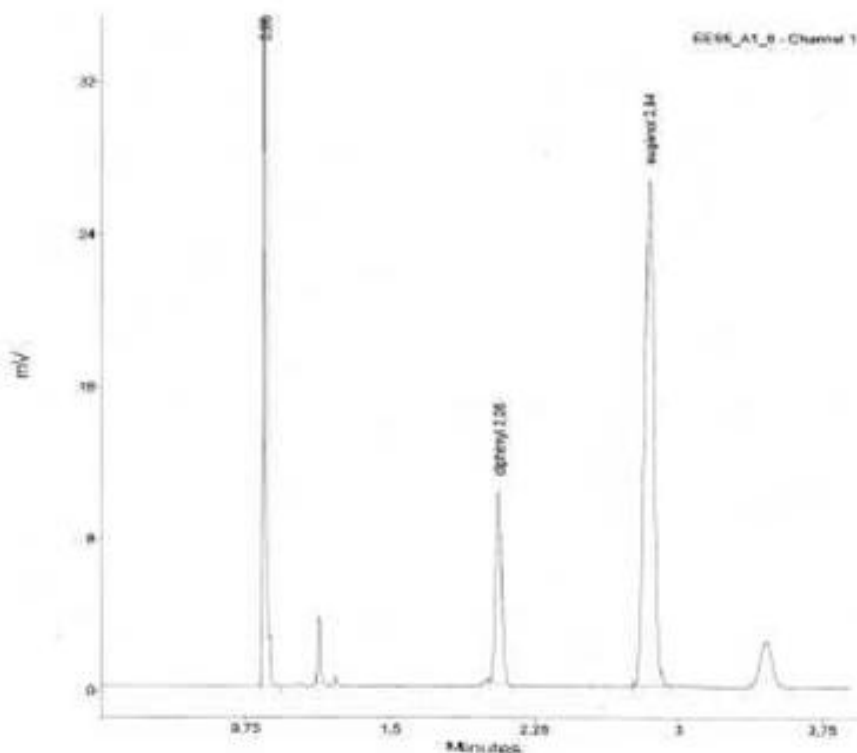
Etalon	Masse d'Eugénol pesée (mg)	El (diphényl)
1	32,28	0,1μL
2	36,74	
3	40,15	
4	43,13	
5	46,88	

On injecte successivement 0,1mL de chacun des étalons préparés. Sur chaque chromatogramme, on mesure l'aire du pic de l'eugénol et l'aire du pic de diphényl. Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant :

Etalon	Aire du pic d'Eugénol (mV x s)	Aire du pic diphényl (El) (mV x s)
1	87,4	29,04
2	96.68	28,44
3	108.09	28,60
4	122.4	30,45
5	115.36	26,16

On prépare ensuite l'échantillon d'essence de girofle à analyser : on pèse 506 mg d'essence de girofle et 1 mL d'étalon interne. On injecte 1 μL de l'échantillon à analyser.

Le chromatogramme obtenu est représenté ci-dessous.



L'aire du pic de l'Eugénol est de 109,64 et celle du diphényl est de 27,51 mV. Min

2. A quel composé correspond le pic au temps de rétention de 0,85 min ?

3. Calculer la masse d'eugénol contenu dans l'échantillon d'essence analysée.

Chromatographie liquide haute performance

Exercice 5.- Application du cours : écrire la relation entre R_s la résolution et α la sélectivité, en supposant le même nombre de plateaux théoriques pour deux solutés.

Exercice 6.- examen 2005 M1CPM (Exercice 3;10 points)

Analyse de molécules organiques. Le chromatogramme donné page suivante a été obtenu avec une phase stationnaire octadecylsilane, de granulométrie $5\mu\text{m}$. La colonne fait $L=150\text{mm}$ de long et $4,6\text{mm}$ de diamètre. On élue par un mélange de 65% d'acétonitrile et de 35% de solution aqueuse de tampon phosphate assurant un $\text{pH}=2,5$ à l'éluant. Débit $1,0\text{ mL/min}$, détection UV à 254 nm .

Questions indépendantes

Généralités

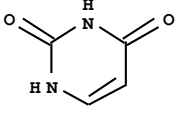
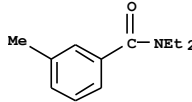
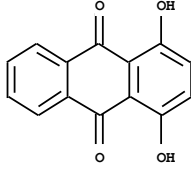
- Expliquer pourquoi le $\log D_{\text{oct}}$ est dépendant du pH (D_{oct} est le coefficient de partage d'une molécule, K_{oct} est sa constante de partage). Rappeler en quoi consiste la méthode de Rekker et dans quels cas elle s'applique).
- Sur l'exemple de la 3 butyl-pyridine, représenter graphiquement la variation de $\log D_{\text{oct}}$ en fonction du pH .

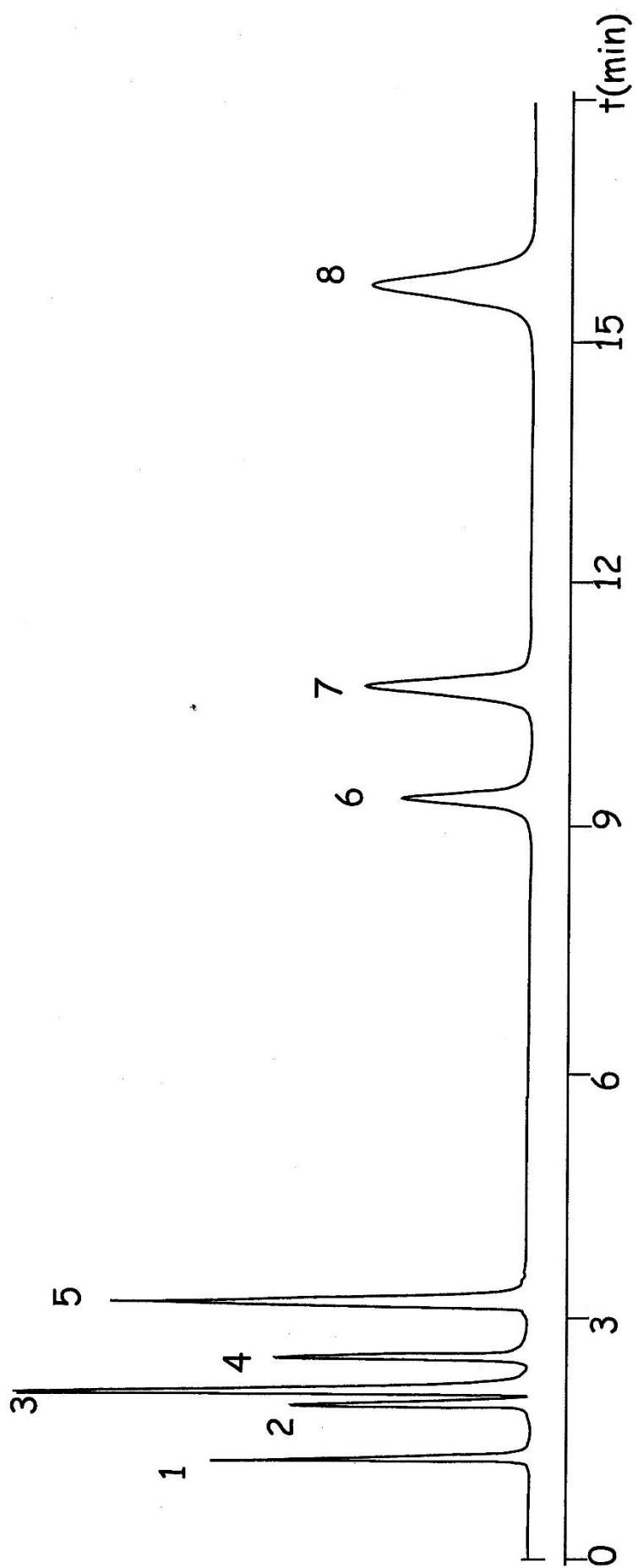
Chromatographie

- Sur quelle(s) interaction(s) repose la séparation qui est faite dans cette expérience ?
- Quel est le facteur de rétention du pic n°5 ?
- Quelle est la résolution entre les pics 6 et 7 ?
- Combien vaut le nombre de plateaux du pic n°8 ? Attendez-vous le même nombre pour les autres pics ?
- Dans quel ordre sont éluées les différentes molécules ? Pour répondre écrivez les lettres correspondantes sur le chromatogramme. Justifier votre réponse.
- Qualitativement quelles variations de chromatogramme attendez-vous en augmentant le pH de 2 unités ? Peut-on imaginer changer le temps de rétention du phénol en l'ionisant ?
- Qualitativement que deviennent les facteurs de rétention si
 - on prend une colonne de 250mm de long au lieu de 150mm ? Quel pourrait être l'avantage de faire ce changement ? Y aurait-il des inconvénients ?
 - on considère la même dimension de colonne mais remplie avec une phase stationnaire octyl silane au lieu de octadecyl silane ?
 - on diminue la proportion d'acétonitrile de l'éluant ?
 - on augmente le débit à 1.5 mL/min ?

j) A-t-on plus ou moins de propyl benzène que de butyl benzène dans le mélange analysé ?

Données :

Molécule	logP _{oct} (Rekker)	pK _{a1}	Lettre
Acide benzène butanoïque	2,419	4,76	A
3-butyl-Pyridine	2,780	5,56	B
Propyl benzène	3,741		C
 Uracile	-0,707	9,20	D
Butylbenzène	4,272		E
 Diethyltoluamide	1,958		F
 Quinizarine	3,696	7,54	G
Phénol	1,482	9,6	H



Exercice 7.- On analyse un mélange de 5 aldéhydes aromatiques sur une colonne 100 mm NUCLEODUR® 5 C18 (100 mm de long, 5 μ m de diamètre de particule, greffée octadécyle,). La phase mobile est un mélange d'acétonitrile 22% et d'eau 78% à pH 6.0, avec un débit de 1.0 ml/min (soit une vitesse linéaire de 0.28 cm/s), à 22°C, 5 μ l ont été injectés. La détection par spectroscopie UV est faite à 254 nm.

Les substances sont le 4-hydroxy-3-methoxy-benzaldehyde (vanilline), le benzaldehyde, le 4-carboxybenzaldehyde, le 4-hydroxybenzaldehyde, le 4-methoxy-3-ethoxy-benzaldehyde.

L'ionisation de la fonction hydroxyle, lorsqu'elle est présente sur la molécule, est négligeable dans ces expériences. La fonction carboxylique, lorsqu'elle est présente, a un $pK_a = 4.0$ dans l'éluant. On admet que les formes anioniques ne se partagent pas et restent en phase mobile.

a) En vous aidant des tables d'incrémentes de Rekker, ou en utilisant Chem sketch de ACDlabs donner une valeur du logP du 4-carboxybenzaldehyde sous forme neutre, précisez pour quel système biphasique il est calculé. Calculer ensuite le coefficient de partage de cette espèce dans ce système lorsque le pH de la solution aqueuse est de 6.

b) Dans quel ordre les produits sont ils élués à pH=6?

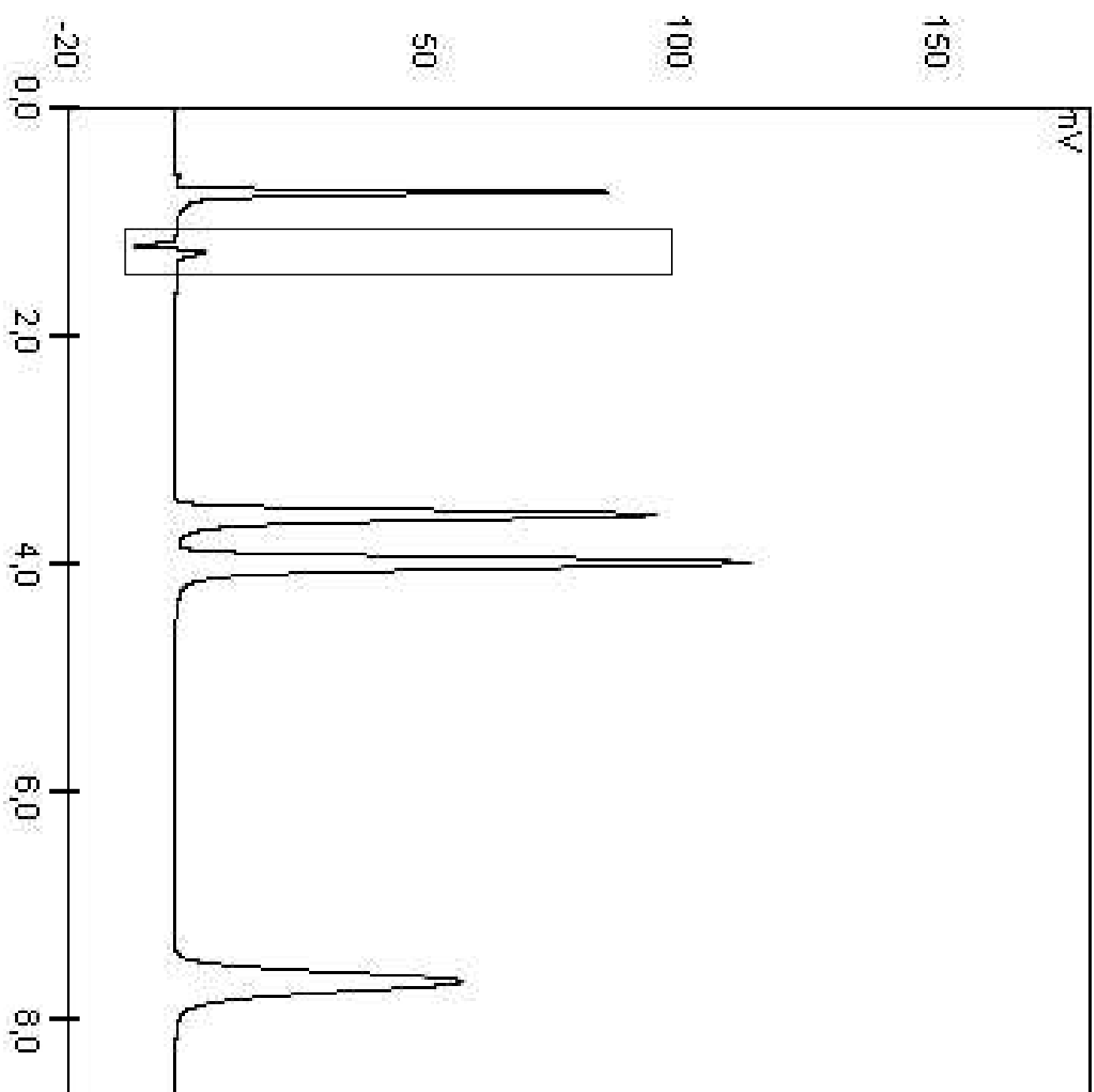
c) Le nombre de plateaux théoriques équivalents doit t'il être le même pour tous les pics dans ce cas? En vous aidant du graphique, calculer ces nombres pour les 2^{ème} et 4^{ème} pics. Commenter.

d) Combien vaut la résolution entre les 2nd et 3^{ème} pics? Commenter.

e) Comment varient les facteurs de capacités (dont on rappellera la définition) si:

- on divise par deux le débit?
- on augmente de 20 % la proportion d'acétonitrile dans l'éluant?
- on prend une colonne remplie de la même phase stationnaire, de même diamètre, mais de 250 mm de long?
- on considère les mêmes dimensions de colonne mais avec une phase greffée "octyle"?
- on prend un éluant ayant la même composition en acétonitrile et eau mais à pH= 3 au lieu de 6?

g) Quel est le facteur de capacité du dernier produit?



Chromatographie phase gazeuse

Exercice 8 - On étudie différents esters par chromatographie en phase stationnaire. La colonne est une WCOT DB1 (100PDMS) 30m 0,18mm 7 μ m, on travaille en mode isocratique à 150°C, avec un débit d'He de 1 mL/min

- a) En quelques lignes expliquez à quoi correspondent les différentes indications ci-dessus.
- b) Considérant que la droite de Kovats passe par l'origine et qu'elle a une pente de 0,370 retrouver les temps de rétention de ces différents composés. Complétez les tableaux ci-dessous.

Composé	Indices de Kovats	Temps de rétention (min)
Methylformate	396	
Isopropyl formate	552	
Hexyl acétate	988	
Methyl propionate	617	
Isobutyl butyrate	933	
n-Hexane		
n-Nonane		

Composés de référence	Temps de rétention (min)	ΔI Mac Reynolds	Indices de Kovats sur squalane
benzène	5,26	4	
butanol	4,93	58	
2-pentanone	5,79	43	
nitropropane	7,70	56	
pyridine	9,65	38	

c) L'hexylhexanoate a un indice de Kovats de 900. S'il fait partie du mélange quel problème cela peut-il poser ? Comment le résoudre ?

d) L'éthylbutyrate a un temps de rétention de 76.6 min dans ces conditions. Quel problème sa présence éventuelle peut poser ?

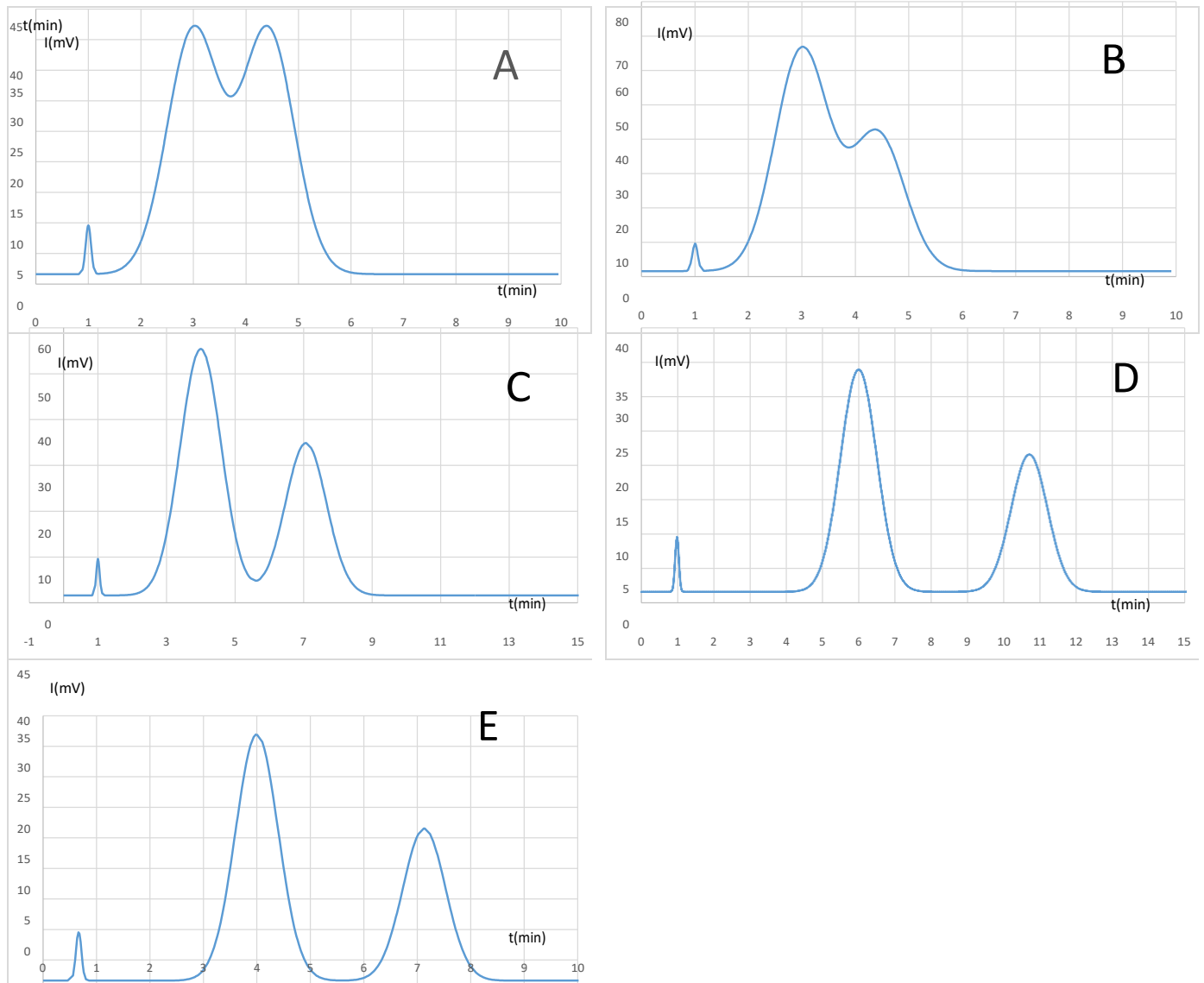
e) Quel type de détecteur pouvez-vous utiliser ?

Entrainement sujet de CT

Exercice 1

Un chimiste a fait une étude chromatographique en phase liquide (HPLC) d'un mélange de 2 composés. Pour simplifier, le composé qui a le temps de rétention le plus petit sera appelé composé 1, et l'autre composé 2. Les chromatogrammes obtenus aux différentes étapes d'optimisation sont donnés dans l'ordre alphabétique de A à E.

En vous basant sur l'étude des résultats expérimentaux ci-dessous répondez aux questions qui suivent les données.



Tous les essais sont faits avec la même colonne. C'est une colonne « Octadécyl silane » « end-capped ». Les dimensions indiquées sont 250 mm, 4,6mm, 5 μ m

Données chromatographiques	tr1 (min)	aire pic 1(mV.min)	tr2 (min)	aire pic 2 (mV.min)
A	3,00	~5025	4,42	5025
B	3,00	8130	4,42	5010
C	4,00	8075	7,07	4975
D	6,00	4060	10,7	2510
E	4,00	2710	7,13	1673

L'étalonnage sur le composé 1 dans les conditions expérimentales du chromatogramme D a permis d'établir l'équation

pour le pic de 1 : Aire(mV.min)= 1618 C₁(ppm)+ 313 et pour le pic 2 : Aire(mV.min)= 1277 C₂(ppm)+ 244

Données : masse molaire du composé 2 : 767, 67g.mol⁻¹

- Quelle est l'interaction principale mise en œuvre pour la séparation?
- Quelle nature d'éluant peut-il avoir été utilisé ? Quels sont les solvants les plus usuels pour ce type de chromatographie ?
- A quoi correspond la dimension 5µm indiquée dans les caractéristiques de la colonne ? Expliquez ce que signifie « end-capped ».
- Quel est le composé le plus hydrophobe ? 1 ou 2 ?
- Quelle modification de l'échantillon a été effectuée entre les chromatogrammes A et B ?
- Le chimiste a changé la composition de la phase mobile entre le chromatogramme B et C. En quoi consiste ce changement ?
- Le chimiste a à nouveau changé la composition de l'éluant entre C et D. Quel **autre** changement a-t-il fait ?
- Quelle(s) modification(s) de condition(s) expérimental(es) le chimiste a-t-il faite(s) entre le chromatogramme D et le E ?
- Combien vaut la concentration du composé 2 injectée lors de l'obtention du chromatogramme D ?
- Le mélange analysé dans le chromatogramme D a été obtenu par une préparation d'échantillon de type LLE (Liquid-Liquid Extraction) d'un échantillon de 5mL initialement dans l'eau par 0,5 mL d'une phase organique, avec un rendement de l'extraction = 87%. Quelle était la concentration (en mol.L⁻¹) du composé 2 dans l'échantillon initial ?

Exercice 2

La figure ci-dessous représente une superposition de chromatogrammes obtenus lors de l'injection de différentes solutions étalons en vue de l'analyse de différents sels d'une eau en bouteille par chromatographie ionique.

Le pic n°1 correspond au t₀=1.5 unité

Pour simplifier, le chromatogramme ne présente que les pics des 5 ions alcalins.

- Quel est le détecteur très généralement utilisé en chromatographie ionique ?
- Qu'est ce qui est représenté en abscisse ? Quelles sont les unités ? Qu'est ce qui est représenté en ordonnée ? Quelles sont les unités ?
- Quelle est la phase stationnaire de la colonne de séparation dans le cas de la séparation de cations ?
- Quel est l'éluant le plus souvent utilisé pour faire de la séparation de cations et qui est toujours utilisé si on fait de la suppression chimique ?
- Faites un pronostic sur l'ordre de sortie des cations lorsque la séparation ne repose que sur de l'échange d'ions ? Expliquez-en 2 phrases votre pronostic.
- Les différents sels présents dans l'eau en bouteille sont des hydrogénocarbonate, chlorure, et sulfate de

cations alcalins et alcalino-terreux.

- Ecrivez les formules chimiques de ces 3 différents anions.

- Est-ce que ces anions jouent un rôle dans la séparation ? Le résultat de la séparation est-il différent si l'étalonnage est fait uniquement avec des sels de chlorure.

g) Que signifie t_0 ? Qu'est ce qui est détecté à t_0 ?

h) A l'aide du graphique et en considérant le tracé supérieur, le calculez le facteur de rétention et le nombre de plateaux théoriques équivalents calculé sur le pic n°5, la résolution entre les pics situés entre 4 et 5.

i) Le pic 6 présente-t-il un phénomène de « tailing » ou de « fronting » ? Qu'est ce qui peut engendrer ce phénomène ?

j) L'espèce correspondant au pic 4 est-elle plus concentrée dans les étalons que celle du pic 5 ?

