

UE5 Sciences Analytiques

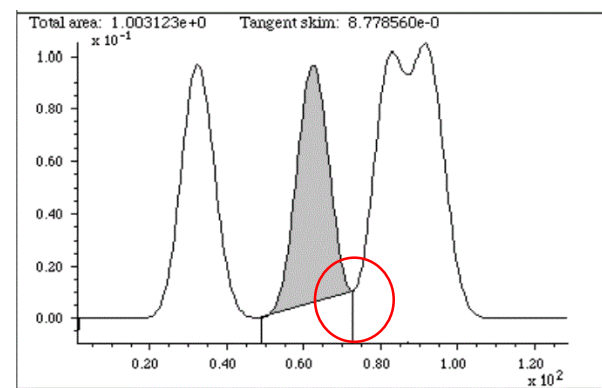
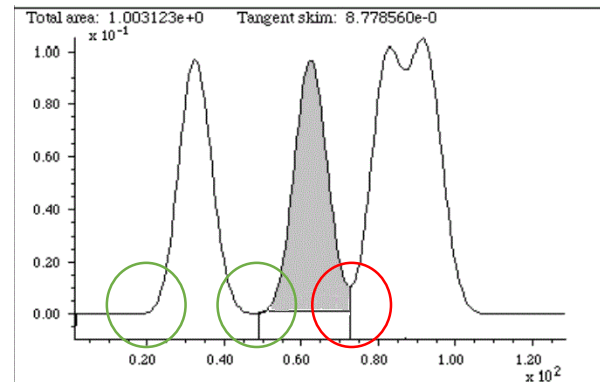
UE5B Techniques séparatives

- Analyse Quantitative par les techniques séparatives

Pierre Chaminade
Lip(Sys)² Chimie Analytique Pharmaceutique
Université Paris-Saclay

Généralités

- Les techniques instrumentales CLHP, CG, EC, génèrent un enregistrement du signal du détecteur en fonction du temps: chromatogramme ou électrophérogramme
- Il est important de séparer le plus possible les composants de l'échantillon car plusieurs logiques peuvent être utilisées dans le traitement du signal et celles-ci peuvent varier suivant l'intensité des pics
- L'aire et/ou la hauteur du pic sont liés à la quantité et/ou la concentration de l'analyte traversant le détecteur
- Il est nécessaire de réaliser un étalonnage de l'appareil pour calculer la quantité d'analyte présente dans l'échantillon.
- Suivant les techniques, le principe d'étalonnage peut varier



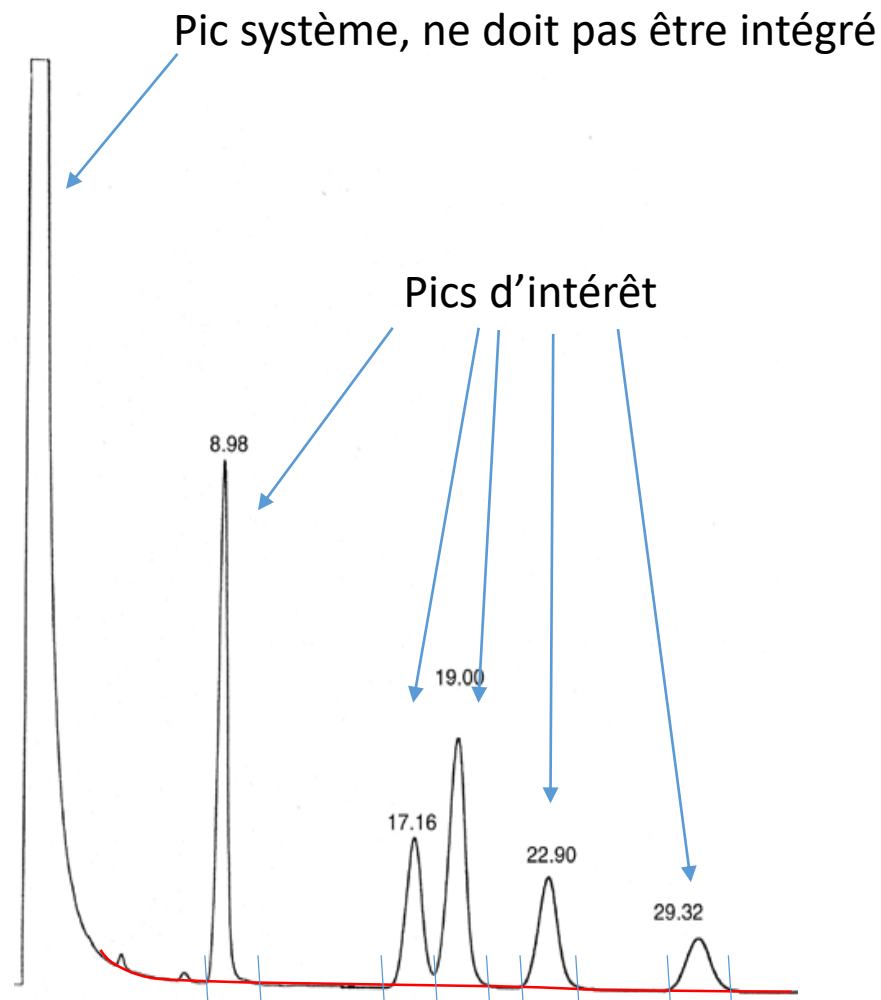
Mesure de l'aire des pics

1^{ère} étape, trouver la ligne de base

2^{ème} étape trouver les débuts et fin de pics

La hauteur correspond à la réponse du détecteur au sommet du pic diminuée de la valeur de la réponse à la ligne de base.

L'aire est calculée en sommant l'intensité du signal depuis le début jusqu'à la fin du pic.

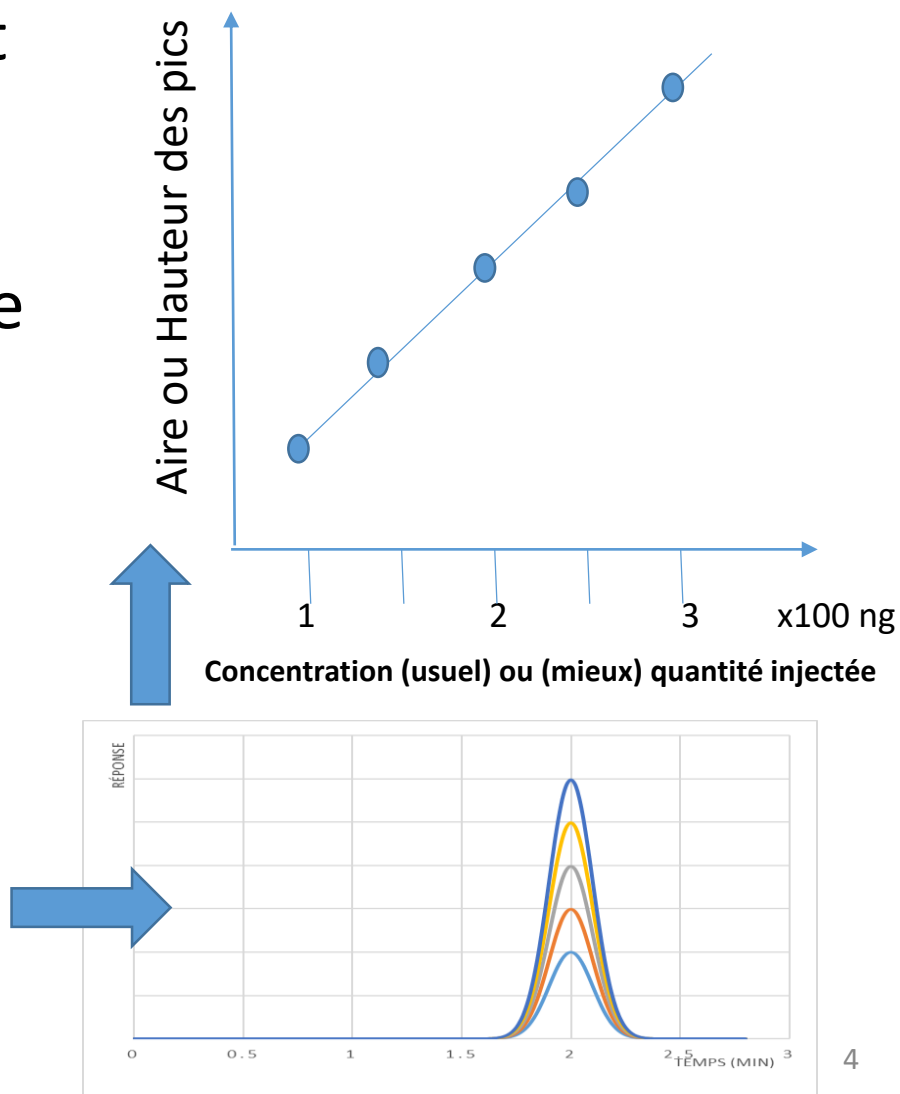


CLHP / Etalonnage externe

- En CLHP, le volume injecté est fiable
- Etalonnage simple, on injecte un étalon (ou « standard ») de chaque composé à quantifier afin d'établir la fonction de réponse du détecteur

Point de gamme	1	2	3	4	5
Analyte (mg)	1	1,5	2	2,5	3
Volume (ml)	100	100	100	100	100
Vol. Injecté	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l

Quantité injectée	100 ng	150 ng	200 ng	250 ng	300 ng
-------------------	--------	--------	--------	--------	--------

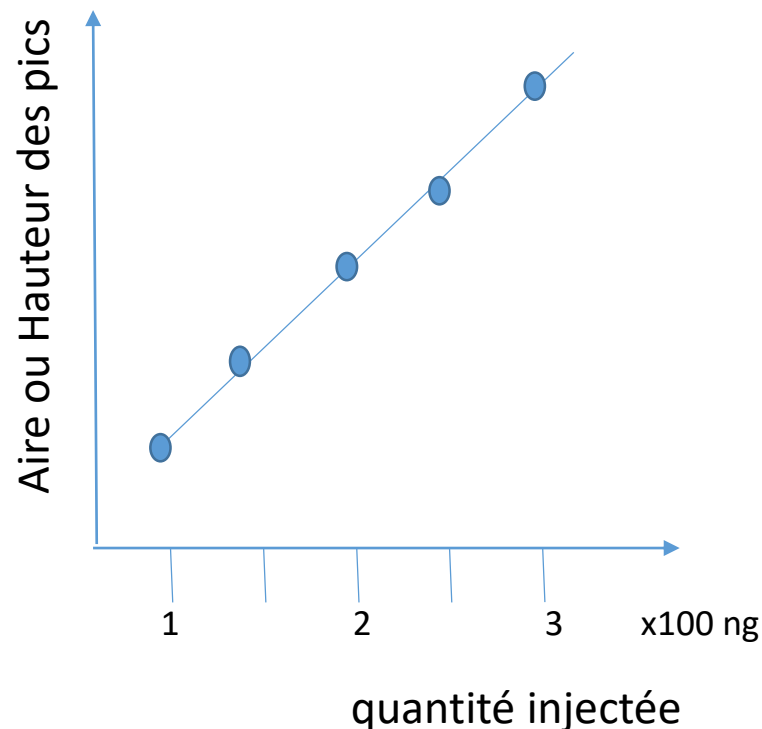


CLHP / Etalonnage externe

- Droite d'étalonnage

$$A_{i,j} = A_{0,i} + B_i q_{i,j}$$

- $A_{i,j}$ est l'aire du pic i au point de gamme j
- $A_{0,i}$ est l'ordonnée à l'origine
 - Si elle est NS $\neq 0$ la méthode est directement proportionnelle
- B_i est la pente $\Delta A / \Delta q$
 - Plus elle est grande et plus la méthode est sensible pour le composé i
- q_i est la quantité d'analyte i injectée dans l'appareil



CLHP / Etalonnage externe

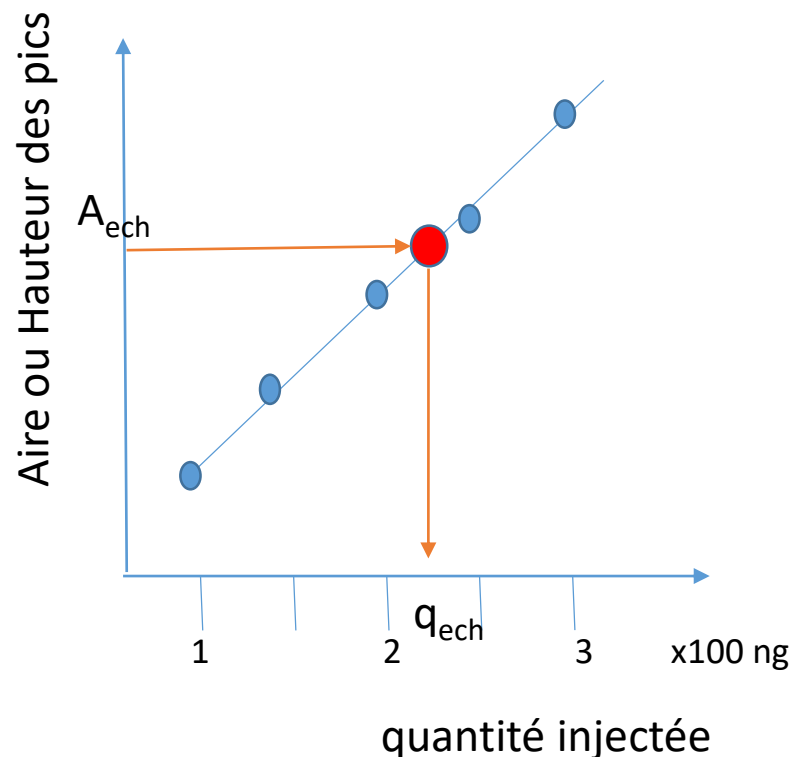
Quantité d'analyte dans l'échantillon (ech)

- Peut être déduit de la gamme
- Peut être calculé à partir de l'équation de la gamme

$$q_{i,ech} = A_{i,ech} / B_i$$

- Ou plus simplement à partir d'un étalon (*et*) de concentration proche de celle à vérifier

$$q_{i,ech} = \frac{A_{i,ech}}{A_{i,et}} q_{i,et}$$



CPG / Etalonnage interne

- En CPG, le volume injecté présente des variations d'une injection à l'autre
- L'aire (la hauteur) du pic varie donc en fonction de quantité d'analyte mais aussi du volume injecté
- On ajoute un composé, l'étalon interne (ei), en quantité fixe dans la gamme et dans l'échantillon
- L'aire ou la hauteur du pic d'ei varie en fonction du volume injecté ... il va permettre corriger la réponse de l'analyte

CPG / Etalonnage interne

• Gamme d'étalonnage

Point de gamme	1	2	3	4	5
Analyte (mg)	1	1,5	2	2,5	3
Etalon interne	2	2	2	2	2
Volume (ml)	1000	1000	1000	1000	1000
Vol. Injecté	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l

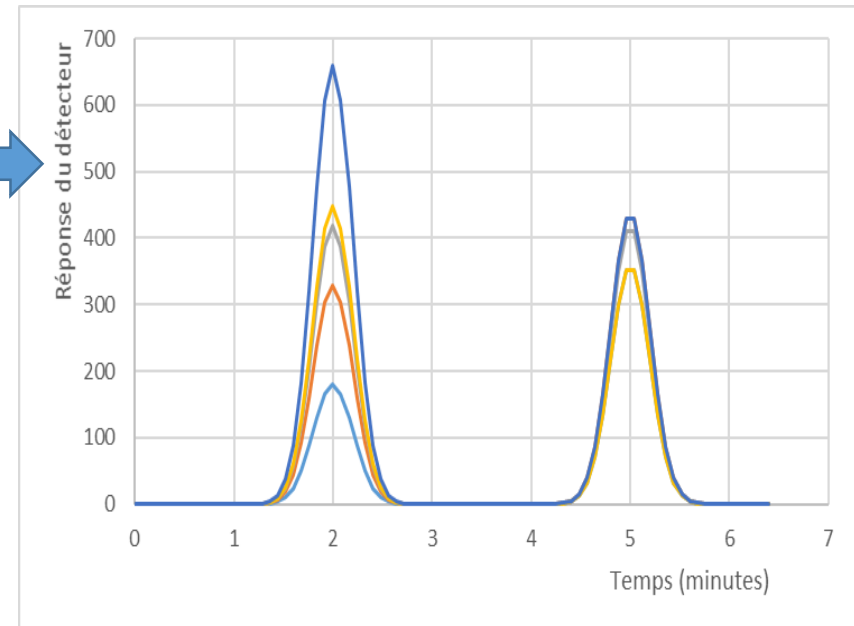
Quantité injectée

Analyte	1 ng	1,5 ng	2 ng	2,5 ng	3 ng
ei	2 ng	2 ng	2 ng	2 ng	2 ng

• Echantillon

Vol. Injecté	1 μ l
Quantité Analyte injectée	?
Quantité d'ei injectée	2 ng

Dans chaque chromatogramme, on divise l'aire (ou la hauteur) du pic de l'analyte par celui de l'étalon interne pour tenir compte de l'imprécision du volume réellement injecté.



CPG / Etalonnage interne

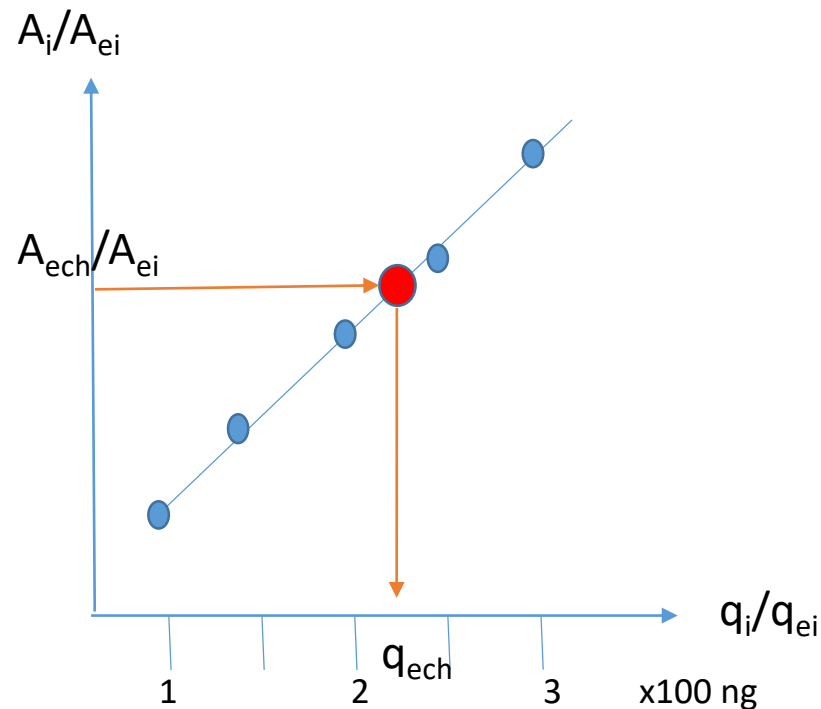
- Droite d'étalonnage

$$\frac{A_{i,j}}{A_{ei,j}} = \left(\frac{A_i}{A_{ei}} \right)_0 + B_i \frac{q_{i,j}}{q_{ei,j}}$$

- Quantité d'analyte dans l'échantillon

$$\frac{q_{i,ech}}{q_{ei,ech}} = (1/B_i) \frac{A_{i,ech}}{A_{ei,ech}}$$

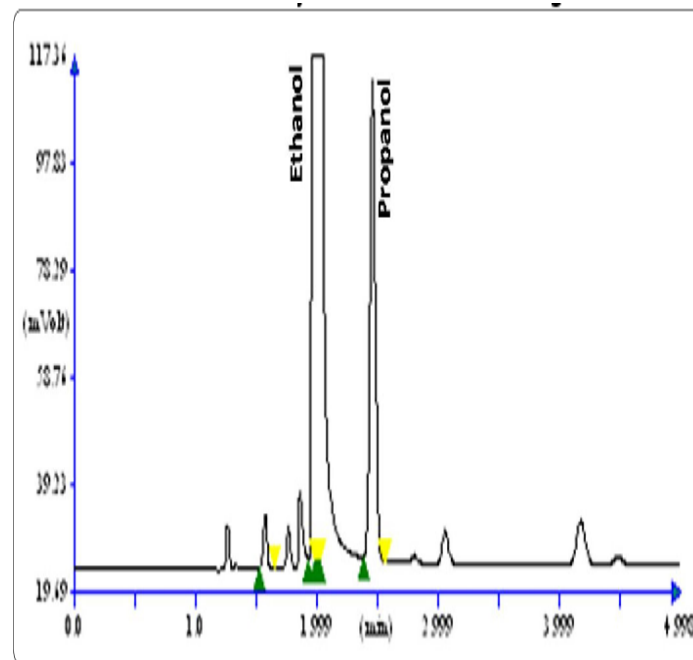
$$\frac{q_{i,ech}}{q_{ei,ech}} = \frac{A_{i,ech} / A_{ei,ech}}{A_{i,et} / A_{ei,et}} \frac{q_{i,et}}{q_{ei,et}}$$



Quand les quantités d'étalon interne sont strictement identiques dans tous les étalons et l'échantillon, on peut simplifier la formule

Propriétés de l'étalon interne

- Chimiquement proche de l'analyte
- Initialement absent de l'échantillon.
- Suffisamment séparé de l'analyte et des autres composants de l'échantillon
- Idéalement élué à proximité de l'échantillon
- Stable et de pureté connue et élevée
- Réponse similaire à celle de l'analyte



GC-FID chromatogram of ethanol along with propanol as internal standard in blood sample.

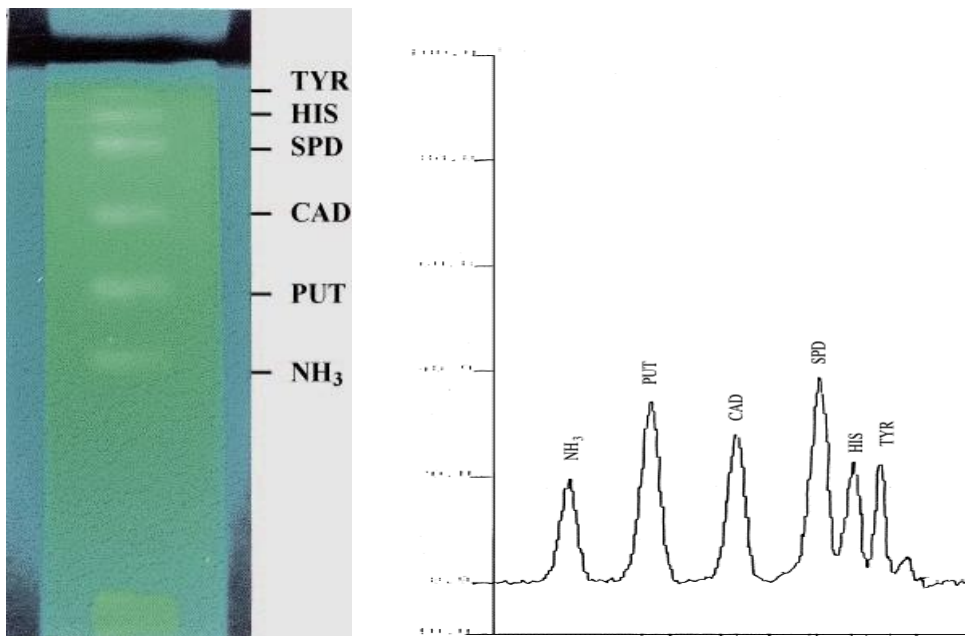
Sudhaker S, Jain R. Effect of using Propanol as internal standard on quantitative determination of ethanol in different biological matrices by head space-Gas ChromatographyFlame Ionization Detector. *Madridge J Anal Sci Instrum.* 2016; 1(1): 1-3.

Electrophorèse capillaire

- Différentes techniques d'injection
- Volume injecté pas toujours fiable
- → Etalonnage interne
- Variation du flux électroosmotique d'une analyse à l'autre
- → variation du temps de migration d'une analyse à l'autre
- → variation de l'aire du pic
- Utilisation du rapport A/t_m

Chromatographie couche mince et électrophorèse sur gel

- Quantification possible car la taille des spots et leur intensité de coloration dépend de la quantité d'analyte présente
- Nécessite l'utilisation d'un densitomètre



A comparison of the TLC-densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products
R Jeya Shakila, T.S Vasundhara, K.V Kumudavally, Food Chemistry, 2001