

**UNIVERSITE PARIS-SACLAY  
UFR DE PHARMACIE**

**DFGSP2**

**UE5-B SCIENCES ANALYTIQUES**  
Travaux pratiques

**TECHNIQUES SEPARATIVES**

**ANNEE 2024-2025**

## MATERIEL NECESSAIRE

### **Obligatoirement:**

- Une blouse en coton
- Une paire de lunettes de sécurité
- Une calculatrice

*Il est conseillé aux étudiants portant des lunettes de vue d'avoir en plus une paire de sur-lunettes de protection, avec protection latérale vis-à-vis d'éventuelles projections.*

---

## PERSONNEL INTERVENANT DANS LES TRAVAUX PRATIQUES

### **Enseignant responsable des TP UE5 B:**

Athena KASSELOURI : [athena.kasselouri@universite-paris-saclay.fr](mailto:athena.kasselouri@universite-paris-saclay.fr)

### **Enseignants intervenant dans les TP UE5 B:**

Joudi BAKAR

Athena KASSELOURI

Danielle LIBONG

Thanh Duc MAI

Rime MICHAEL-JUBELI

Thuy TRAN-MAIGNAN

Jiangyan ZHOU

## INFORMATION

**Lors de la 1<sup>ère</sup> séance de chaque groupe, le sous-groupe a doit se présenter en salle 4319 et le sous-groupe b en salle 2407.**

Les travaux pratiques comportent **2 séances**, en relation avec le cours du Pr. Pierre Chaminade.

Chaque groupe est divisé pour les travaux pratiques en deux sous-groupes a et b. La division est faite par ordre alphabétique. Le premier jour le sous-groupe a fait la première séance (**TP1**) et le sous-groupe b la deuxième séance (**TD /TP2**). Le lendemain les deux sous-groupes sont inversés.

La séance **TP1** est une séance de manipulation en chromatographie liquide haute performance (CLHP) qui a lieu en salle 4319 (HM3). La séance **TD/TP2** comporte deux parties : la première partie consiste à un TD de simulation chromatographique sur ordinateur et a lieu en salle 2407 (HM4). La deuxième partie (TP2) est une manipulation en chromatographe en phase gazeuse (CG) et a lieu en salle 4205 (HM2). Un planning détaillé est inclus à la page suivante.

		<b>2<sup>ème</sup> année</b>	
		<b>UE5 B Sciences analytiques</b>	
		<i>Techniques séparatives</i>	
		<b>TP1 CLHP</b>	<b>TD simulation/TP2 CG</b>
		4319	2407/4205
		<b>13h30-16h30</b>	<b>13h30-15h: salle 2407</b> <b>15h15-16h45: salle 4205</b>
lundi	16-sept		
mardi	17-sept		
mercredi	18-sept		
jeudi	19-sept	<b>3a</b>	<b>3b</b>
vendredi	20-sept	<b>3b</b>	<b>3a</b>
samedi	21-sept		
dimanche	22-sept		
lundi	23-sept	<b>11a</b>	<b>11b</b>
mardi	24-sept	<b>11b</b>	<b>11a</b>
mercredi	25-sept		
jeudi	26-sept	<b>12a</b>	<b>12b</b>
vendredi	27-sept	<b>12b</b>	<b>12a</b>
samedi	28-sept		
dimanche	29-sept		
lundi	30-sept	<b>4a</b>	<b>4b</b>
mardi	01-oct	<b>4b</b>	<b>4a</b>
mercredi	02-oct		
jeudi	03-oct	<b>5a</b>	<b>5b</b>
vendredi	04-oct	<b>5b</b>	<b>5a</b>
samedi	05-oct		
dimanche	06-oct		
lundi	07-oct	<b>7a</b>	<b>7b</b>
mardi	08-oct	<b>7b</b>	<b>7a</b>
mercredi	09-oct		
jeudi	10-oct	<b>8a</b>	<b>8b</b>
vendredi	11-oct	<b>8b</b>	<b>8a</b>
samedi	12-oct		
dimanche	13-oct		
lundi	14-oct	<b>1a</b>	<b>1b</b>
mardi	15-oct	<b>1b</b>	<b>1a</b>
mercredi	16-oct	<b>13a</b>	<b>13b</b>
jeudi	17-oct	<b>2a</b>	<b>2b</b>
vendredi	18-oct	<b>2b</b>	<b>2a</b>
samedi	19-oct		
dimanche	20-oct		
lundi	21-oct	<b>9a</b>	<b>9b</b>
mardi	22-oct	<b>9b</b>	<b>9a</b>
mercredi	23-oct	<b>13b</b>	<b>13a</b>
jeudi	24-oct	<b>10a</b>	<b>10b</b>
vendredi	25-oct	<b>10b</b>	<b>10a</b>
samedi	26-oct		
dimanche	27-oct		
lundi	28-oct		
mardi	29-oct	<b>6a</b>	<b>6b</b>
mercredi	30-oct	<b>6b</b>	<b>6a</b>
jeudi	31-oct		
vendredi	01-nov		
	02-nov		
	23-nov		
	24-nov		
lundi	25-nov		
mardi	26-nov		
mercredi	27-nov		
jeudi	28-nov	<b>16-17 (9h-12h)</b>	<b>18 (9h-12)</b>
vendredi	29-nov	<b>18</b>	<b>16-17</b>
	30-nov		
	01-déc		
lundi	02-déc		
mardi	03-déc		
mercredi	04-déc	<b>14-15a (9h-12h)</b>	<b>14-15b (9h-12h)</b>
jeudi	05-déc	<b>14-15b (9h-12h)</b>	<b>14-15a (9h-12h)</b>
vendredi	06-déc		

<b>RAPPELS</b>	<b>2</b>
<b>SEANCE TP1</b>	<b>3</b>
<i>TP1 Séparation d'un principe actif pharmaceutique de ses impuretés : exemple acide acétylsalicylique par CLHP phase inverse</i>	<i>4</i>
<b>SEANCE TD/TP2</b>	<b>8</b>
<i>TD Simulations en chromatographie liquide</i>	<i>9</i>
<i>TP2 Mise en évidence d'impuretés dans l'éthanol anhydre par chromatographie en phase gazeuse</i>	<i>15</i>
<b>ANNEXES</b>	<b>19</b>

# RAPPELS

## CHROMATOGRAPHIES EN PHASES LIQUIDE ET GAZEUSE (PRINCIPE)

### INTRODUCTION

La chromatographie est une méthode qui permet de séparer des composants, grâce à leur migration différentielle le long d'un dispositif séparateur. Il existe plusieurs techniques chromatographiques mais elles ont toutes comme caractéristique commune : une séparation due à une distribution des solutés entre deux phases : l'une mobile et l'autre stationnaire.

Les systèmes chromatographiques vont dépendre :

- de la nature de la phase mobile.
- de la nature de la phase stationnaire.
- des mécanismes de séparation.
- de la technique.

Lorsque la phase mobile est un gaz, la chromatographie est dite chromatographie en phase gazeuse ou chromatographie gaz-liquide, et chromatographie en phase liquide lorsque la phase mobile est un liquide. En chromatographie gaz-liquide (CGL ou CG) et en chromatographie liquide haute performance (CLHP), le dispositif séparateur consiste en une colonne chromatographique qui contient la phase stationnaire. La phase stationnaire peut être déposée sur une plaque sur laquelle la migration des composés se fait avec une phase mobile liquide. Dans ce cas il s'agit de chromatographie sur couche mince (CCM).

### PRINCIPE D'UNE ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE SUR COLONNE

Une analyse chromatographique se déroule de façon schématique comme suit : en faisant passer continuellement la phase mobile à travers le dispositif séparateur (colonne chromatographique) qui contient la phase stationnaire. L'échantillon qui contient une masse très faible de solutés à séparer est introduit dans la colonne par injection. A la sortie de la colonne, la phase mobile passe à travers un détecteur qui met en évidence les composés de l'échantillon qui ont été séparés sur la colonne. Le détecteur délivre les signaux à un enregistreur : on obtient un graphe (enregistré en général en fonction du temps) appelé **chromatogramme**.

En principe, chaque espèce chimique séparée donnera un pic chromatographique et le temps nécessaire pour obtenir l'élution du composé peut être utilisé pour caractériser l'espèce tandis que la hauteur ou l'aire du pic chromatographique sont proportionnels à la quantité de composé injecté et pourront ainsi être utilisés pour doser le composé dans une solution inconnue.

(Rappel sur les grandeurs caractéristiques d'une séparation : voir annexe I).

# **SEANCE 1 : TP1**

***TP1 : Séparation d'un principe actif pharmaceutique de ses impuretés : exemple acide acétylsalicylique (Par CLHP de phases inversées)***

## *Séparation d'un principe actif pharmaceutique de ses impuretés : exemple acide acétylsalicylique*

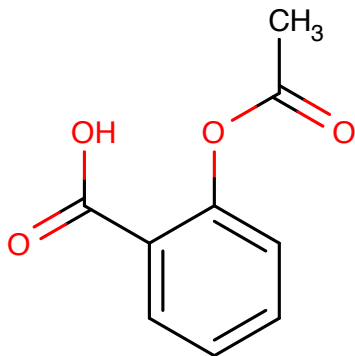
### **Objectifs :**

- 1- Vérification expérimentale de lois de la théorie chromatographique
- 2- Séparation d'une impureté du principe actif pharmaceutique par CLHP
- 3- Choix de la phase mobile
- 4- Identification des composés par CLHP

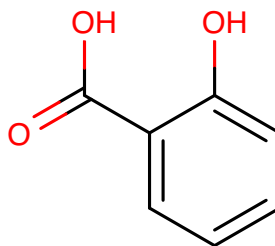
### **Généralités :**

Les 2 composés à séparer diffèrent par l'estérification d'une fonction phénol ce qui leur confère des propriétés d'affinité avec les phases stationnaires et mobiles utilisées suffisamment différentes pour permettre leur séparation et leur identification.

Formules chimiques :



**Acide acétylsalicylique**



**Acide salicylique.**

## ***CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (CLHP)***

### **Matériel :**

#### Chaîne CLHP :

Colonne : dimensions 125x4.6mm, 5 $\mu$ m ; phase stationnaire silice greffée en C18.

Pompe isocratique; vanne d'injection Rheodyne avec boucle de 20 $\mu$ L.

Détecteur UV (réglé à 237nm) avec acquisition sur microordinateur (logiciel d'acquisition Azur ou Chromeleon).

#### Phase mobiles :

Pour des raisons matérielles, les conditions pharmacopée (voir monographie de la pharmacopée européenne jointe en annexe III) sont modifiées : l'acétonitrile est remplacé par du méthanol. Deux phases mobiles sont disponibles avec différents % de méthanol et d'eau. Les 2 contiennent de l'acide phosphorique.

Solutions préparées (voir monographie de la pharmacopée européenne jointe en annexe III) :



- Solution témoin b : mélange acide salicylique (0,010 mg/mL) et acide acétylsalicylique (0,020 mg/mL).
- Solution NaNO<sub>3</sub> à 0,25 mg/l (afin de mesurer le temps mort de la colonne).
- Solution à examiner : solution d'acide acétylsalicylique.
- Solution témoin a : solution d'acide salicylique.

### 1- RECHERCHE DES CONDITIONS DE SEPARATION.

Injecter, dans chacune des conditions suivantes, 20µL de la **solution NaNO<sub>3</sub>** et ensuite 20µL de la **solution témoin b** après stabilisation du système avec la phase mobile utilisée:

Essai	Phase mobile (contient toujours 0,2% d'acide phosphorique)	Composition (% vol/vol)	Débit (ml/min)
1	Méthanol : eau	70 : 30	1,0
2	Méthanol : eau	50 : 50	1,0
3	Méthanol : eau	50 : 50	1,2

A l'issue de ces essais, reporter les résultats dans le compte rendu et choisir la meilleure phase mobile pour obtenir la séparation demandée.

### 2- LOI DE DARCY

- Indiquez si les pressions obtenues sont en accord avec la Loi de Darcy

MeOH (%)	η (mPa.s)
0	0,945
20	1,398
40	1,719
50	1,663
60	1,541
70	1,363
100	0,573

### 3- IDENTIFICATION

Dans les conditions choisies en 1 injectez 20µL de la **solution témoin a**.

### 4- ESSAI LIMITE

Dans les conditions choisies en 1 injecter 20µL de la **solution à examiner** et répondre à la question sur la conformité du lot de matière première testée (solution à examiner) ; renseigner le compte rendu.

### 5- QUANTIFICATION

Calculez la concentration d'acide salicylique contenu dans la **solution à examiner** en utilisant la **solution témoin a** comme référence.

.

**CLHP : SEPARATION D'ACIDE SALICYLIQUE ET D'ACIDE ACETYLSALICYLIQUE**  
**(Appareil No )**

NOM Prénom :	date :
NOM Prénom :	GROUPE :
Enseignant :	

**1. RECHERCHE DES CONDITIONS DE SEPARATION**

Phase mobile Composition	Débit (mL/min)	Pression (bar)	Pic	Solution NaNO <sub>3</sub>	Solution témoin b	
					Pic 1	Pic2
			Temps de rétention			
			Largeur à mi-hauteur			
			Facteur de rétention			
			Résolution			
			Temps de rétention			
			Largeur à mi-hauteur			
			Facteur de rétention			
			Résolution			
			Temps de rétention			
			Largeur à mi-hauteur			
			Facteur de rétention			
			Résolution			

Définir le temps mort ( $t_0$ ). Quel est l'effet de la composition de la phase mobile sur le  $t_0$  ? Pourquoi ?

Quelle formule est utilisée pour calculer la résolution ?

Indiquer quelles sont les conditions opératoires retenues pour la séparation. Pourquoi ?

**2. COMMENTAIRES SUR LA LOI DE DARCY**

Est-ce que les résultats obtenus sont en accord avec la loi de Darcy (variation de la pression en fonction de la viscosité et du débit)?

### 3. IDENTIFICATION

En vous basant sur vos manipulations répondre à la question : l'acide acétylsalicylique est-il le pic 1 ou le pic 2 ?

### 4. ESSAI LIMITE

En se basant sur les protocoles de préparation décrits dans la pharmacopée européenne (annexe III), calculez les concentrations des solutions :

- solution à examiner :

- solution témoin a :

A partir des chromatogrammes obtenus, remplir le tableau suivant :

	<b>t<sub>r</sub> acide salicylique</b>	<b>Aire acide salicylique</b>
<b>Solution témoin a</b>		
<b>Solution à examiner</b>		

**Acide salicylique** : aire solution à examiner / aire solution témoin a =

Donnez la spécification de la pharmacopée concernant la teneur en acide salicylique :

D'après vos résultats, est-ce que le lot de matière première testée (solution à examiner) est conforme ?

### 5. QUANTIFICATION

Quelle est la concentration d'acide salicylique dans la **solution à examiner** ?

## **SEANCE 2 : TD/TP2**

***TD : Simulations en chromatographie liquide***

***TP2 : Mise en évidence d'impuretés dans l'éthanol anhydre par CG capillaire.***

## TD : Simulations en chromatographie liquide

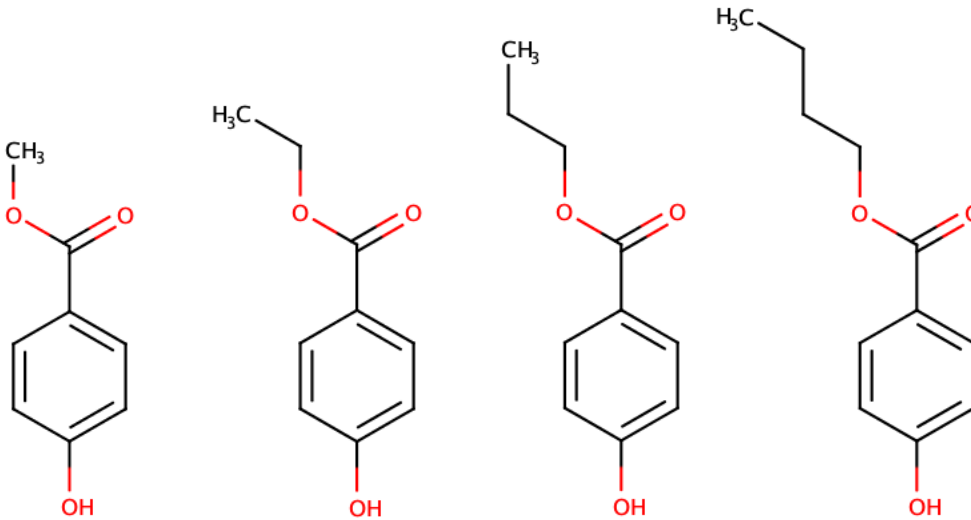
Au cours de ce TD nous allons utiliser un simulateur HPLC développé par le département des sciences analytiques, de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques, à l'Université de Genève. Vous pouvez télécharger le simulateur, (**Practical HPLC simulator v1.0**) sous la forme d'un fichier Excel, à partir de l'adresse :

<https://farma-unites.unige.ch/en/rudaz-lab/tools/practical-hplc-simulator>

Vous pouvez aussi le télécharger via ecampus : UE 5 Sc. Analytiques /UE5B TP Techniques séparatives/ TD simulations.

### Analyse d'un mélange de parabènes (mix. 1)

#### 1.1. Propriétés physicochimiques des composés



Méthyle parabène  
LogP=1,67  
pKa=8,5

Éthyle parabène  
LogP=2,03  
pKa=8,5

Propyle parabène  
LogP=2,55  
pKa=8,5

Butyle parabène  
LogP=3,00  
pKa=8,5

#### 1.2. Ordre d'élution.

Considérez les conditions opératoires suivantes :

Colonne : Waters Acquity BEH C18 (150x4,6 mm, 5 $\mu$ m).

Phase mobile : Acétonitrile /tampon phosphate pH=7: 40/60 v/v

Débit : 1mL/min

Température : 30°C

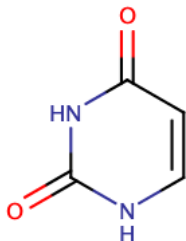
Détecteur : 220nm

Est-ce que vous pouvez prévoir l'ordre d'élution à partir des propriétés physicochimiques ?

Ouvrez le simulateur HPLC. Introduisez les conditions opératoires ci-dessus pour étudier le mélange 1. Comparez l'ordre d'élution obtenu avec l'ordre prédit et expliquez les différences.

### 1.3. Temps mort

Le temps mort peut être évalué par injection des composés non retenus. Dans cette analyse, le temps mort est évalué en utilisant de l'uracile.



$$\log P = -0,86, \text{ pKa} = 8,8$$

Expliquez pourquoi ce composé n'est pas retenu dans les conditions chromatographiques utilisés.

### 1.4. Simulations

#### 1.4.1. Choix de la longueur d'onde

Choisissez la longueur d'onde optimale, en utilisant la fenêtre des spectres et la fenêtre du détecteur (« UV DETECTOR »).

#### 1.4.2. Phase mobile:

Modifiez sur la fenêtre de la pompe (« PUMP ») la composition de la phase mobile et plus précisément le % d'acétonitrile, en faisant ainsi varier sa polarité. Quel est l'impact sur les :

- Temps mort
- Temps de rétention (durée d'analyse)
- Facteur de rétention (exemple : méthyle parabène)
- Séparation (résolution critique)

Remplacez le tampon utilisé dans phase mobile par un tampon de pH 9. Quel est l'impact sur les :

- Temps mort
- Temps de rétention (durée d'analyse)
- Facteur de rétention (exemple : méthyle parabène)
- Séparation (résolution critique)

#### 1.4.3. Débit

Introduisez sur la fenêtre de la pompe les valeurs suivantes de débit : 1mL/min, 2mL/min. Décrire les variations observées sur les :

- Temps mort
- Temps de rétention (durée d'analyse)

- c. Facteur de rétention (exemple : méthyle parabène)
- d. Séparation (résolution critique)

#### 1.4.4. Colonne

Modifiez sur la fenêtre « COLUMN OVEN » la longueur de la colonne et comparez les colonnes de 150mm et 50mm. Décrire les variations observées sur les :

- a. Temps mort
- b. Temps de rétention (durée d'analyse)
- c. Facteur de rétention (exemple : méthyle parabène)
- d. Séparation (résolution critique)
- e. Nombre de plateaux (propyle parabène)

**Renseignez le rapport de simulation.**

## RAPPORT DE SIMULATION

NOM Prénom :	GROUPE :
Enseignant :	date :

### Analyse d'un mélange de parabènes (mix. 1)

**Question 1** : En utilisant les valeurs de LogP, justifiez l'ordre de sortie des composés. Pourquoi le temps mort est-il évalué par l'uracile ?

**Question 2** : Expliquez comment vous choisissez la longueur d'onde optimale.



**Question 3 :** Justifiez l'utilisation du tampon dans la phase mobile. `

	Temps mort (min)	Durée d'analyse (min)	Facteur de rétention (méthyle parabène)	Résolution critique
pH=7				
pH=9				

**Question 4 :** Quels paramètres varient avec le % d'acétonitrile ? Quelle est la composition optimale de la phase mobile ?

	Temps mort (min)	Durée d'analyse (min)	Facteur de rétention (méthyle parabène)	Résolution critique
40% acétonitrile				
50% acétonitrile				
30% acétonitrile				

**Question 5 :** Quelles sont les conséquences d'une augmentation du débit au double?

	Temps mort (min)	Durée d'analyse (min)	Facteur de rétention (méthyle parabène)	Résolution critique
D=1mL/min				
D=2mL/min				

**Question 6 :** Quels paramètres sont influencés par un changement de la longueur de la colonne ? Pourquoi ?

	Temps mort (min)	Durée d'analyse (min)	Facteur de rétention (méthyle parabène)	Résolution critique	Nombre de plateaux (propyle parabène)
L=150mm					
L=50mm					

## ***TP2 : Mise en évidence d'impuretés dans l'éthanol anhydre par CG capillaire.***

### **Objectifs :**

- Mise au point des conditions chromatographiques pour la séparation en CG capillaire
  - 1- Influence de la température sur la rétention
  - 2- Identification des pics
  - 3- Choix des conditions de température (gradient ou isotherme)
- Mise en évidence d'impuretés dans l'éthanol anhydre à usage pharmaceutique et étude de la conformité suivant les normes de la pharmacopée.

### **Généralités :**

Les appareils de CG peuvent être utilisés en isotherme (température constante tout au long de l'analyse) ou en gradient de température. Dans ce dernier cas l'analyse commence à une température relativement basse afin de laisser sortir le solvant d'injection, puis est graduellement augmentée jusqu'à la température limite d'utilisation de la colonne. De cette façon, on peut effectuer la séparation chromatographique avec un maximum d'efficacité : les composés les plus volatils sont élués en début d'analyse puis, progressivement sont élués les composés ayant un plus haut point d'ébullition. L'analyse sera plus ou moins longue en fonction de la pente du gradient de température exprimée en °C/min. On utilise la méthode du gradient de température pour bénéficier d'un maximum d'efficacité de séparation lors de l'analyse d'un mélange complexe de composition inconnue. Dans le cas de la séparation isotherme, la durée de l'analyse mais aussi la qualité de séparation dépendront de la température choisie. On utilise préférentiellement ce mode de séparation pour les dosages en ayant pris soin de séparer le composé à doser des autres composants du mélange.

Le détecteur le plus utilisé en CG est le détecteur à ionisation de flamme qui répond en fonction du nombre d'atomes de carbone présent dans la molécule. Il s'agit donc d'un détecteur quasi universel qui offre une réponse similaire pour tous les composés dont le squelette carboné est similaire.

**MATERIEL :** Toutes les solutions fournies sont préparées dans l'éthanol.

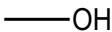
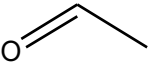
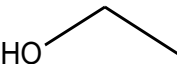
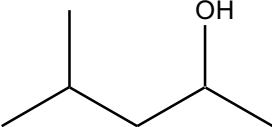
### Descriptif et réglages de l'appareil CG :

- Nature du gaz vecteur: N<sub>2</sub>.
- Injecteur : Température : 200°C.
- Détecteur : Température, nature des gaz, 280°C, air et H<sub>2</sub>.
- Enregistreur : PC avec le logiciel d'acquisition.
- Caractéristiques de la colonne chromatographique : 6 % Cyanopropylphényl  
94 % diméthyl-siloxane (voir annexe II) ; dimensions 30m x 0.32 mm x 1.8µm.

Solutions préparées : (voir monographie de la pharmacopée européenne jointe en annexe IV)

- Solution à examiner a (éthanol anhydre)
- Solution témoin a (200 ppm de méthanol dans l'éthanol anhydre (V/V))
- Solution témoin b (mélange de méthanol (10ppm) et de l'acétaldéhyde (10ppm) dans l'éthanol anhydre (V/V)).

Les caractéristiques de quatre composés sont regroupées sur le tableau suivant :

Méthanol	Acétaldéhyde	éthanol	4-méthylpentan-2-ol
			
$T_{eb}^{\circ} = 64.7\text{ }^{\circ}\text{C}$	$T_{eb}^{\circ} = 20.1\text{ }^{\circ}\text{C}$	$T_{eb}^{\circ} = 78.4\text{ }^{\circ}\text{C}$	$T_{eb}^{\circ} = 131.8\text{ }^{\circ}\text{C}$

$T_{eb}^{\circ}$  =point d'ébullition

### 1. RECHERCHE DES CONDITIONS RESPECTANT LES SPECIFICATIONS PHARMACOPEE.

Injecter, dans chacune des conditions suivantes, 1 $\mu$ L de la **solution témoin b**:

Essai 1 : Isotherme à  $T_1 = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$

Essai 2 : Isotherme à  $T_1 = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$

A l'issue de ces essais, reporter les résultats dans **le compte rendu et choisir la température pour obtenir la séparation demandée par la pharmacopée.**

### 2. IDENTIFICATION

Dans les conditions choisies en 1, injectez 1 $\mu$ L de la **solution témoin a**.

### 3. ESSAI LIMITE

Dans les conditions choisies en 1 injecter 1 $\mu$ L de la **solution à examiner a** et répondre à la question sur la conformité du lot de l'éthanol anhydre testée (solution à examiner a) ; renseigner le compte rendu.

# MISE EN EVIDENCE D'IMPURETES DANS L'ETHANOL ANHYDRE

(Appareil No )

NOMS : .....

Groupe : ..... Date de la séance : ..... Nom de l'enseignant : .....

## TP Chromatographie gazeuse (Appareil No )

### 1. RECHERCHE DES CONDITIONS RESPECTANT LES SPECIFICATIONS PHARMACOPEE

	Solution témoin b	Pic 1	Pic 2	Pic 3
<b>Essai 1</b> <b>T<sub>1</sub> = 40 °C</b>	Temps de rétention			
	Largeur à mi-hauteur			
	Résolution			
<b>Essai 2</b> <b>T<sub>2</sub> = 60 °C</b>	Temps de rétention			
	Largeur à mi-hauteur			
	Résolution			

Quelle est l'influence de la température sur la rétention ? Est-ce qu'il y aurait un avantage à utiliser un gradient de température ?

Quelle est l'ordre d'éluion des trois composés (méthanol, éthanol, acétaldéhyde) ? Pourquoi ? A votre avis le 4-méthylpentan-2-ol sera plus ou moins retenu que les trois autres ?

Quelles sont les conditions opératoires retenues pour la séparation. Pourquoi ?

## 2. IDENTIFICATION

Identifier l'acétaldéhyde et le méthanol sur le chromatogramme de la solution témoin b.

## 3. ESSAI LIMITE

Regrouper dans le tableau suivant les résultats obtenus pour les solutions dans les conditions choisies en 1 :

	méthanol	
	$t_r$	Aire
témoin a		
à examiner a		

-**Méthanol** : aire solution à examiner a / aire solution témoin a =  
Spécification :

**Est-ce que l'éthanol anhydre analysé est conforme ?**

# **ANNEXES**

# ANNEXE I

## GRANDEURS CHROMATOGRAPHIQUES CARACTERISTIQUES D'UNE SEPARATION

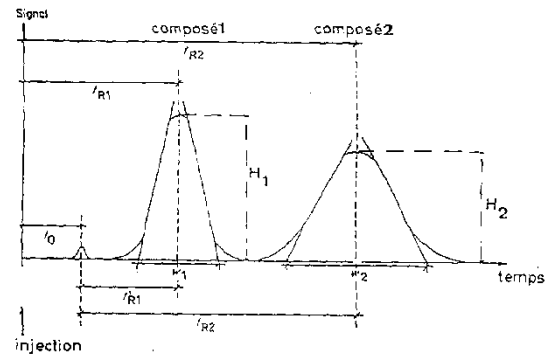
La rétention d'un composé dépend de sa distribution entre la phase mobile et la phase stationnaire.

On peut définir un **coefficient de distribution** (ou de partage)

$$K_D \text{ tel que } K_D = \frac{C_S}{C_M}$$

avec  $C_S$  concentration du composé dans la phase stationnaire.

$C_M$  concentration du composé dans la phase mobile.



- Paramètres caractéristiques d'un chromatogramme

### 1. GRANDEURS DE RETENTION.

- VOLUME DE RETENTION.  $V_R$

$$V_R = t_r D = t_r u S \varepsilon_c = t_r u \frac{\pi d_c^2}{4} \varepsilon_c$$

$t_r$  : temps de rétention.

$D$  : débit de la phase mobile.

$u$  : vitesse linéaire de la phase mobile.

$S$  : section de la colonne.

$\varepsilon_c$  : porosité totale de la colonne.

- $\varepsilon_c$  : POROSITE totale de la colonne

$$\varepsilon_c = \frac{V_M}{V_C} = \frac{V_I + V_P}{V_C}$$

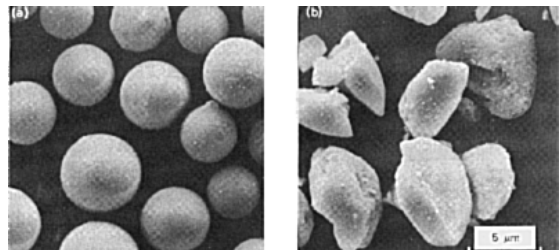
Valeurs typiques : 0.80 pour un support poreux.

$V_C$ : volume de la colonne =  $L S$

$V_I$ : volume interstitiel

$V_P$ : volume poreux.

$V_M$ : volume de phase mobile contenue dans la colonne =  $t_0 D$ .



Particules de silice sphériques et irrégulières

- $t_0$  : TEMPS MORT de la colonne chromatographique :

$$t_0 = V_M/D \quad \text{ou} \quad t_0 = L/u \quad L : \text{Longueur de la colonne.}$$



Relation avec la porosité :

$$\epsilon_c = \frac{V_M}{V_C} = \frac{4t_0 D}{\pi d_c^2 L}$$

RELATION ENTRE V<sub>R</sub> ET K.

$$V_R = V_M + K_D V_S$$

V<sub>S</sub> : volume de phase stationnaire (ou surface spécifique).

- k : FACTEUR DE RETENTION (*Facteur de capacité*)

$$k = \frac{C_S V_S}{C_M V_M} = K_D \frac{V_S}{V_M} \qquad k = \frac{V_R - V_M}{V_M} = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

Pour une colonne chromatographique donnée  $V_S/V_M$  est approximativement constant quel que soit la composition de la phase mobile. En revanche  $K_D$  varie selon la nature et la composition de la phase mobile.

Le facteur de rétention est indépendant du débit et de la longueur de colonne.

Le temps de rétention est lié à k par

$$t_r = t_0 (k + 1) = \frac{L}{u} (1 + k)$$

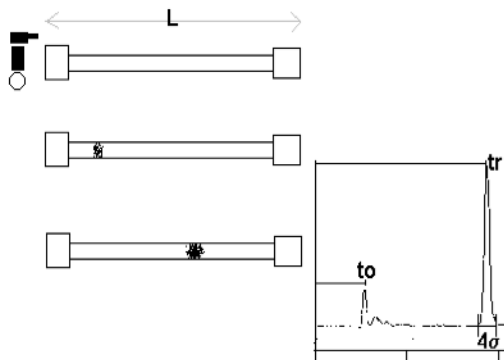
## 2. SELECTIVITE.

Caractérisation de la distance séparant les sommets de deux pics voisins.

$$\alpha = \frac{t_{r2} - t_0}{t_{r1} - t_0} = \frac{k_2}{k_1} = \frac{K_{D2}}{K_{D1}}$$

## 3. EFFICACITE DE LA COLONNE CHROMATOGRAPHIQUE.

Tous les pics n'ont pas la même largeur. Plus une colonne chromatographique est efficace et plus les pics sont fins, plus cette colonne a la potentialité de séparer des composés.



Dans une colonne de longueur L, un soluté injecté sous un volume très faible (20µl en général), migre sous la forme d'une bande d'élution de variance  $\sigma^2$  qui s'élargit au cours du trajet dans la colonne. A la sortie de la colonne, le pic chromatographique assimilé à une gaussienne possède une largeur à la base  $\omega_b = 4\sigma$ . L'élargissement de la bande d'élution au cours de la migration dans la colonne sur un trajet

$$\frac{\partial \sigma^2}{\partial z} = H .$$

H correspond à la « hauteur équivalente à un plateau théorique »<sup>1</sup> ou HEPT. Pour une colonne de longueur L, on obtient par intégration de l'équation précédente :  $H = \int_0^L \frac{\partial \sigma^2}{\partial z} = \frac{\sigma^2}{L}$  ou la variance est exprimée en unité de longueur. Pour un pic de temps de rétention  $t_r$ , en exprimant la variance du pic en unité de temps, on obtient :  $H = \frac{\sigma^2}{t_r^2} L$ .

Plutôt que de caractériser la colonne par la HEPT, on préfère utiliser N, le nombre de plateaux théoriques :  $N = \frac{L}{H} = \frac{t_r^2}{\sigma^2}$  et, puisque la largeur du pic chromatographique à la base est égale à

$$4\sigma : N = 16 \left( \frac{t_r^2}{\omega_b^2} \right).$$

D'une façon générale la variance du pic chromatographique est liée à sa largeur selon la relation  $\sigma = \frac{\omega_h}{2\sqrt{-2\ln(h)}}$  ou h est la hauteur fractionnaire du pic. Ainsi si h= 0.5 soit la mi-

hauteur du pic, le nombre de plateaux peut être calculé selon la relation  $N = 5.54 \left( \frac{t_r}{\omega_{0.5}} \right)^2$

#### 4. RESOLUTION.

La résolution quantifie la séparation entre 2 pics voisins.  $R_{S1,2} = 2 \frac{(t_{r2} - t_{r1})}{(\omega_{b1} + \omega_{b2})}$

$\omega_b$  représente la largeur à la base du pic.

En supposant que les largeurs des pics sont égales, on peut développer l'expression suivante :

$$R_S = \frac{1}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k_2}{k_2 + 1} \right) \sqrt{N_2}$$

Cette expression permet de relier la résolution aux trois paramètres chromatographiques principaux :

l'efficacité	représenté par	N
la force éluante	représentée par	k du 2 <sup>ème</sup> pic
la sélectivité	représenté par	$\alpha$

<sup>1</sup> Théorie des plateaux : par analogie avec la distillation, approximation selon laquelle on considère que le déplacement d'un composé dans la colonne chromatographique se fait par une succession d'équilibres. Ceci permet de découper la colonne en plusieurs zones ou plateaux théoriques. Plus la colonne possède de plateaux théoriques et plus elle est efficace (discriminante).

## COMPARAISON CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE ET GAZEUSE/ APPAREILLAGE

La chromatographie en phase gazeuse (CG) s'adresse à des composés volatils et non thermosensibles ce qui restreint son potentiel. Elle est complémentaire de la chromatographie en phase liquide qui ne présente pas ces limitations.

En chromatographie en phase gazeuse, les interactions qui gouvernent la séparation concernent uniquement le soluté et la phase stationnaire ; en chromatographie en phase liquide, les interactions avec la phase mobile s'ajoutent aux deux précédentes. En revanche la température est un paramètre important en CG alors qu'il joue un moindre rôle en chromatographie liquide. Le succès d'une séparation en CG est très dépendant du choix de la phase stationnaire (Cf Annexe II) alors qu'en chromatographie liquide, la nature des solvants utilisés dans la phase mobile offre des possibilités supplémentaires de mise au point de la séparation.

Trois caractéristiques comparées des gaz et des liquides renforcent les différences précédentes et ont influencé le développement du matériel :

1. les coefficients de diffusion dans les liquides sont beaucoup plus faibles que dans les gaz
2. la viscosité des liquides est environ 100 fois celle des gaz
3. les liquides sont quasi incompressibles jusqu'à environ 300 bars.

1. Les faibles coefficients de diffusion rencontrés en chromatographie liquide induisent des échanges lents entre la phase mobile et stationnaire et obligent à des faibles vitesses linéaires de phase mobile. Ceci conduit à une moindre efficacité de la CLHP comparée à la CG. En outre, la vitesse des échanges en CG ainsi que la faible viscosité des gaz (point suivant) a permis de développer des colonnes de très faible diamètre (colonnes dites capillaires) et de très grande longueur (multiple de 10 m) où la phase stationnaire est déposée sur les parois et non plus sur des particules remplissant la colonne. La CG est donc intrinsèquement beaucoup plus efficace que la CLHP.

2. La viscosité des liquides conduit à des pertes de charge en colonne beaucoup plus importante qu'en CG. En CLHP, la perte de charge  $\Delta P$  (Pa) peut être reliée aux conditions

opératoires en utilisant la **loi de Darcy** : 
$$\Delta P = \phi \frac{\eta L u}{d_p^2}$$
. La perte de charge est donc liée

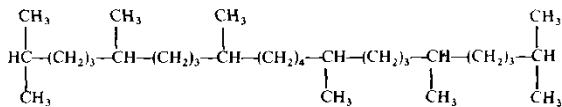
à la viscosité  $\eta$  (Pa.s) de la phase mobile ainsi qu'à sa vitesse linéaire  $u$  (m.s<sup>-1</sup>) et à la longueur de colonne  $L$  (m) ainsi qu'au diamètre des particules de phase stationnaire  $d_p$  (m). Le facteur  $\phi$  est un nombre sans dimension qui exprime la résistance à l'écoulement dans la colonne en raison de la forme des particules de phase stationnaire et de leur tassement. La viscosité des liquides étant environ 100 fois plus importante que celle des gaz une pompe est nécessaire en CLHP pour forcer le passage de la phase mobile à travers la phase stationnaire. En CG, une pression de 2 à 3 bars appliquée sur la tête de colonne suffit à assurer le passage du gaz à travers la colonne.

3. Les liquides peuvent être pompés à débit constant (de l'ordre du ml/min) à travers la colonne sous des pressions atteignant usuellement 100 à 200 bars.

## ANNEXE II : Quelques structures de phases stationnaires en CG

### Phases stationnaires greffées apolaires.

SQUALANE (< 0 à 120°C)

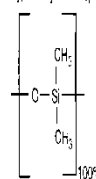


**Squalane** : Phase apolaire de référence. N'est plus utilisée dans la pratique compte tenu de sa température limite d'utilisation de 120°C.

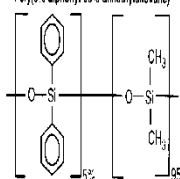
#### 100% poly(diméthylsilicone)      Utilisation -60 à 320°C.

Séparation en fonction du point d'ébullition des composés.  
Applications : Alcools, fractions pétrolières, hydrocarbures, FAMES (Esters Méthyliques d'acides gras),  
**SE30** : phase stationnaire poly-diméthylsilicone imprégnée.

Poly(diméthylsiloxane)



Poly(5%-diphényl-95%-diméthylsiloxane)



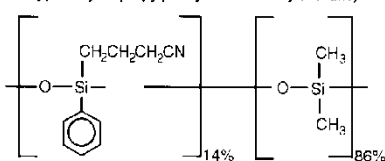
**5% phényl 95% diméthylsilicone**: similaire plus orientée médicament, pesticides, herbicides. Solvants résiduels.

### Phases stationnaires greffées de polarité intermédiaires.

#### 20% phényl 80% diméthylsilicone--35% phényl 65% diméthylsilicone --50% phényl 50% diméthylsilicone

Utilisation : subambiante à 300°C, Compatible avec les solvants d'injection aqueux  
Applications : composés aromatiques.

Poly(14%-cyanopropylphényl-86%-diméthylsiloxane)



#### 14%-Cyanopropylphényl-86%-diméthylsiloxane.

Utilisation : sub-ambiante à 280°C.  
Application : carbohydrates (modifiés).

### Phases stationnaires greffées polaires.

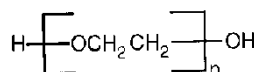
#### Poly(éthylène glycol).

#### CARBOWAX

Utilisation 50°C à 220°C.

Applications: solvants polaires, arômes.

Poly(ethylene glycol)

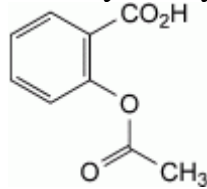


# ANNEXE III

MONOGRAPHIE PHARMACOPEE EUROPEENNE ACIDE ACETYLSALICYLIQUE

## ACETYLSALICYLIQUE (ACIDE)

### Acidum acetylsalicylicum



$C_9H_8O_4$

$M_r$  180,2

[50-78-2]

#### DÉFINITION

Acide 2-(acétyloxy)benzoïque.

*Teneur* : 99,5 pour cent à 101,0 pour cent (substance desséchée).

#### CARACTÈRES

*Aspect* : poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, ou cristaux incolores.

*Solubilité* : peu soluble dans l'eau, facilement soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.

*F* : environ 143 °C (fusion instantanée).

#### IDENTIFICATION

*Première identification* : A, B.

*Seconde identification* : B, C, D.

- A. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge ([2.2.24](#)).
- Comparaison* : [acide acétylsalicylique SCR](#).
- B. Chauffez à ébullition pendant 3 min 0,2 g d'acide acétylsalicylique avec 4 mL de [solution diluée d'hydroxyde de sodium R](#) et refroidissez. Ajoutez 5 mL d'[acide sulfurique dilué R](#). Il se forme un précipité cristallin. Filtrez et lavez, puis desséchez le précipité à 100-105 °C. Le point de fusion ([2.2.14](#)) est de 156 °C à 161 °C.
- C. Dans un tube à essai, mélangez 0,1 g d'acide acétylsalicylique avec 0,5 g d'[hydroxyde de calcium R](#). Chauffez le mélange. Il se dégage des vapeurs qui colorent en bleu-vert ou jaune-vert un morceau de papier filtre imprégné de 0,05 mL de [solution de nitrobenzaldéhyde R](#). Humectez le papier filtre avec de l'[acide chlorhydrique dilué R](#). La coloration vire au bleu.
- D. Dissolvez à chaud environ 20 mg du précipité obtenu au cours de l'identification B dans 10 mL d'[eau R](#), puis refroidissez. La solution donne la réaction (a) des salicylates ([2.3.1](#)).

#### ESSAI

*Aspect de la solution*. La solution est limpide ([2.2.1](#)) et incolore ([2.2.2, Procédé II](#)).

Dissolvez 1,0 g d'acide acétylsalicylique dans 9 mL d'[éthanol à 96 pour cent R](#).

*Substances apparentées*. Chromatographie liquide ([2.2.29](#)). *Préparez les solutions juste avant l'emploi*.

*Solution à examiner*. Dissolvez 0,100 g d'acide acétylsalicylique dans de l'[acétonitrile pour chromatographie R](#) et complétez à 10,0 mL avec le même solvant.

*Solution témoin (a)*. Dissolvez 50,0 mg d'[acide salicylique R](#) (impureté C) dans la phase mobile et complétez à 50,0 mL avec la phase mobile. Prélevez 1,0 mL de solution et complétez à 100,0 mL avec la phase mobile.

*Solution témoin (b)*. Dissolvez 10 mg d'[acide salicylique R](#) (impureté C) dans la phase mobile et complétez à 10,0 mL avec la phase mobile. Prélevez 1,0 mL de solution, ajoutez 0,2 mL de solution à examiner et complétez à 100,0 mL avec la phase mobile.

*Solution témoin (c)*. Dissolvez à l'aide d'ultrasons le contenu d'un flacon d'[acide acétylsalicylique pour identification des pics SCR](#) (contenant les impuretés A, B, D, E et F) dans 1,0 mL d'[acétonitrile R](#).

Colonne :

— dimensions :  $l = 0,25$  m,  $\varnothing = 4,6$  mm,

— phase stationnaire : [gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R](#) (5  $\mu\text{m}$ ).

Phase mobile : [acide phosphorique R](#), [acétonitrile pour chromatographie R](#), [eau R](#) (2:400:600 V/V/V).

Débit : 1 mL/min.

Détection : spectrophotomètre à 237 nm.

Injection : 10  $\mu\text{L}$ .

Enregistrement : 7 fois le temps de rétention de l'acide acétylsalicylique.

Identification des impuretés : utilisez le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) pour identifier le pic dû à l'impureté C ; utilisez le chromatogramme fourni avec l'[acide acétylsalicylique pour identification des pics SCR](#) et le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c) pour identifier les pics dus aux impuretés A, B, D, E et F.

Rétention relative par rapport à l'acide acétylsalicylique (temps de rétention = environ 5 min) : impureté A = environ 0,7 ; impureté B = environ 0,8 ; impureté C = environ 1,3 ; impureté D = environ 2,3 ; impureté E = environ 3,2 ; impureté F = environ 6,0.

Conformité du système : solution témoin (b) :

— résolution : au minimum 6,0 entre les pics dus à l'acide acétylsalicylique et à l'impureté C.

Limites :

— impuretés A, B, C, D, E, F : pour chaque impureté, au maximum 1,5 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,15 pour cent),

— impuretés non spécifiées : pour chaque impureté, au maximum 0,5 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,05 pour cent),

— total : au maximum 2,5 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,25 pour cent),

— limite d'exclusion : 0,3 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,03 pour cent).

Métaux lourds ([2.4.8](#)) : au maximum 20 ppm.

Dissolvez 1,0 g d'acide acétylsalicylique dans 12 mL d'[acétone R](#) et complétez à 20 mL avec de l'[eau R](#). 12 mL de solution satisfont à l'essai B. Préparez la solution témoin avec une solution à 1 ppm de plomb (Pb) obtenue par dilution de la [solution à 100 ppm de plomb \(Pb\) R](#) avec un mélange de 6 volumes d'[eau R](#) et de 9 volumes d'[acétone R](#).

Perte à la dessiccation ([2.2.32](#)) : au maximum 0,5 pour cent, déterminé sous vide sur 1,000 g d'acide acétylsalicylique.

Cendres sulfuriques ([2.4.14](#)) : au maximum 0,1 pour cent, déterminé sur 1,0 g d'acide acétylsalicylique.

DOSAGE

Dans une fiole à bouchon rodé, dissolvez 1,000 g d'acide acétylsalicylique dans 10 mL d'[éthanol à 96 pour cent R](#).

Ajoutez 50,0 mL d'[hydroxyde de sodium 0,5 M](#) et fermez la fiole. Laissez reposer pendant 1 h. Titrez par l'[acide chlorhydrique 0,5 M](#) en présence de 0,2 mL de [solution de phénolphtaléine R](#). Effectuez un titrage à blanc.

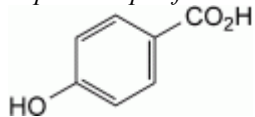
1 mL d'[hydroxyde de sodium 0,5 M](#) correspond à 45,04 mg de  $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$ .

CONSERVATION

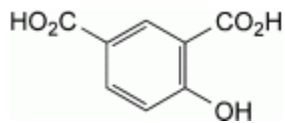
En récipient étanche.

IMPURETÉS

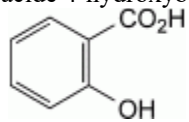
Impuretés spécifiées : A, B, C, D, E, F.



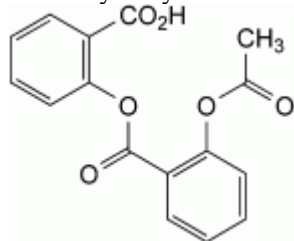
A. acide 4-hydroxybenzoïque,



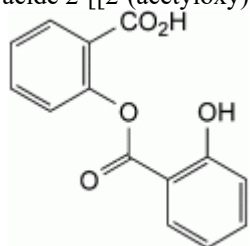
B. acide 4-hydroxybenzène-1,3-dicarboxylique (acide 4-hydroxyisophthalique),



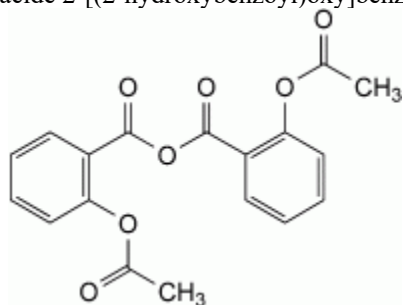
C. acide 2-hydroxybenzèncarboxylique (acide salicylique),



D. acide 2-[[2-(acétyloxy)benzoyl]oxy]benzoïque (acide acétylsalicylsalicylique),



E. acide 2-[(2-hydroxybenzoyl)oxy]benzoïque (salsalate, acide salicylsalicylique),

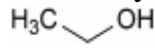


F. anhydride 2-(acétyloxy)benzoïque (anhydride acétylsalicylique).

# ANNEXE IV

## MONOGRAPHIE PHARMACOPEE EUROPEENNE

### ÉTHANOL ANHYDRE Ethanolum anhydricum



C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O

M<sub>r</sub> 46,07

[64-17-5]

#### DÉFINITION

*Teneur* : au minimum 99,5 pour cent V/V de C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O (99,2 pour cent m/m), à 20 °C, calculé à partir de la densité en utilisant les tables alcoométriques (5.5).

#### CARACTÈRES

*Aspect* : liquide incolore, limpide, volatil et inflammable, hygroscopique.

*Solubilité* : miscible à l'eau et au chlorure de méthylène.

L'éthanol anhydre brûle avec une flamme bleue, sans fumée.

Eb : environ 78 °C.

#### IDENTIFICATION

*Première identification* : A, B.

*Seconde identification* : A, C, D.

- A. Densité (voir Essai).
- B. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (2.2.24).  
*Comparaison* : [spectre de référence de l'éthanol anhydre de la Ph. Eur.](#)
- C. Dans un tube à essai, mélangez 0,1 mL d'éthanol anhydre et 1 mL d'une solution de [permanganate de potassium R](#) à 10 g/L, puis ajoutez 0,2 mL d'[acide sulfurique dilué R](#). Couvrez immédiatement d'un papier filtre humecté d'une solution récemment préparée contenant 0,1 g de [nitroprussiate de sodium R](#) et 0,5 g d'[hydrate de pipérazine R](#) dans 5 mL d'[eau R](#). Après quelques minutes, il se développe sur le papier une coloration bleue intense qui pâlit après 10-15 min.
- D. A 0,5 mL d'éthanol anhydre, ajoutez 5 mL d'[eau R](#), 2 mL de [solution diluée d'hydroxyde de sodium R](#), puis lentement 2 mL d'[iode 0,05 M](#). Il se forme un précipité jaune dans les 30 min.

#### ESSAI

*Aspect*. L'éthanol anhydre est limpide (2.2.1) et incolore (2.2.2, *Procédé II*) comparé à l'[eau R](#). Diluez 1,0 mL d'éthanol anhydre dans de l'[eau R](#) et complétez à 20 mL avec le même solvant. Après 5 min, cette solution reste limpide (2.2.1) comparée à l'[eau R](#).

*Acidité ou alcalinité*. A 20 mL d'éthanol anhydre, ajoutez 20 mL d'[eau exempte de dioxyde de carbone R](#), puis 0,1 mL de [solution de phénolphtaléine R](#). La solution est incolore. Ajoutez 1,0 mL d'[hydroxyde de sodium 0,01 M](#). La solution est rose (30 ppm, exprimé en acide acétique).

Densité (2.2.5) : 0,790 à 0,793.

Absorbance (2.2.25) : au maximum 0,40 à 240 nm, 0,30 de 250 nm à 260 nm et 0,10 de 270 nm à 340 nm. La courbe d'absorbance est lisse.

Examinez l'éthanol anhydre de 235 nm à 340 nm sous une épaisseur de 5 cm et en utilisant de l'[eau R](#) comme liquide de compensation.

Impuretés volatiles. Chromatographie en phase gazeuse (2.2.28).

*Solution à examiner (a)*. Ethanol anhydre.

*Solution à examiner (b)*. Ajoutez 150 µL de [4-méthylpentan-2-ol R](#) à 500,0 mL d'éthanol anhydre.

*Solution témoin (a)*. Prélevez 100 µL de [méthanol anhydre R](#) et complétez à 50,0 mL avec l'éthanol anhydre.

Prélevez 5,0 mL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec l'éthanol anhydre.



*Solution témoin (b).* Prélevez 50 µL de méthanol anhydre R et 50 µL d'acétaldéhyde R et complétez à 50,0 mL avec l'éthanol anhydre. Prélevez 100 µL de cette solution et complétez à 10,0 mL avec l'éthanol anhydre.

*Solution témoin (c).* Prélevez 150 µL d'acétal R et complétez à 50,0 mL avec l'éthanol anhydre. Prélevez 100 µL de cette solution et complétez à 10,0 mL avec l'éthanol anhydre.

*Solution témoin (d).* Prélevez 100 µL de benzène R et complétez à 100,0 mL avec l'éthanol anhydre. Prélevez 100 µL de cette solution et complétez à 50,0 mL avec l'éthanol anhydre.

*Colonne :*

- *matériau :* silice fondue,
- *dimensions :*  $l = 30$  m,  $\varnothing = 0,32$  mm,
- *phase stationnaire :* poly[(cyanopropyl)(phényl)][diméthyl]siloxane R (épaisseur du film 1,8 µm).

*Gaz vecteur :* hélium pour chromatographie R.

*Vitesse linéaire :* 35 cm/s.

*Rapport de division :* 1:20.

*Température :*

	Intervalle (min)	Température (°C)
Colonne	0 - 12	40
	12 - 32	40 → 240
	32 - 42	240
Chambre à injection		200
Détecteur		280

*Détection :* ionisation de flamme.

*Injection :* 1 µL.

*Conformité du système :* solution témoin (b) :

- *résolution :* au minimum 1,5 entre le premier pic (acétaldéhyde) et le deuxième pic (méthanol).

*Limites :*

- *méthanol* dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (a) : au maximum 0,5 fois de la surface du pic correspondant dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (200 ppm V/V),
- *acétaldéhyde + acétal :* au maximum 10 ppm V/V, exprimé en acétaldéhyde.

Calculez la somme des teneurs en acétaldéhyde et en acétal en parties par million (V/V) à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{10 \times A_E}{A_T - A_E} + \frac{30 \times C_E}{C_T - C_E}$$

$A_E$  = surface du pic correspondant à l'acétaldéhyde dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (a),

$A_T$  = surface du pic correspondant à l'acétaldéhyde dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b),

$C_E$  = surface du pic correspondant à l'acétal dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (a),

$C_T$  = surface du pic correspondant à l'acétal dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c).

- *benzène :* au maximum 2 ppm V/V.

Calculez la teneur en benzène en parties par million (V/V) à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{2B_E}{B_T - B_E}$$

$B_E$  = surface du pic correspondant au benzène dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (a),

$B_T$  = surface du pic correspondant au benzène dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (d).

L'identité du benzène peut être confirmée, le cas échéant, en utilisant un autre système chromatographique approprié (phase stationnaire présentant une polarité différente).

— *total des autres impuretés* dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (b) : au maximum la surface du pic correspondant au 4-méthylpentan-2-ol dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (b) (300 ppm),

— *limite d'exclusion* : 0,03 fois la surface du pic correspondant au 4-méthylpentan-2-ol dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner (b) (9 ppm).

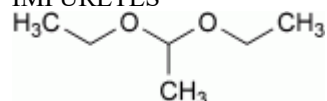
Résidu à l'évaporation : au maximum 25 ppm *m/V*.

Evaporez à siccité au bain-marie 100 mL d'éthanol anhydre, puis desséchez à 100-105 °C pendant 1 h. La masse du résidu est au maximum de 2,5 mg.

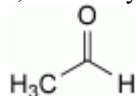
#### CONSERVATION

A l'abri de la lumière.

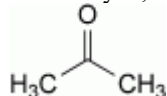
#### IMPURETÉS



A. 1,1-diéthoxyéthane (acétal),



B. acétaldéhyde,



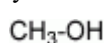
C. propan-2-one (acétone),



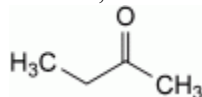
D. benzène,



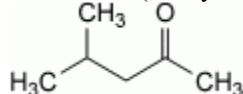
E. cyclohexane,



F. méthanol,



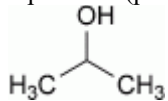
G. butan-2-one (méthyléthylcétone),



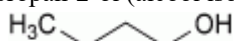
H. 4-méthylpentan-2-one (méthylisobutylcétone),



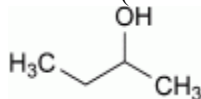
I. propan-1-ol (propanol),



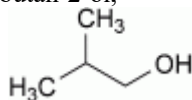
J. propan-2-ol (alcool isopropylique),



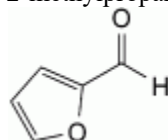
K. butan-1-ol (butanol),



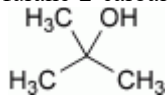
L. butan-2-ol,



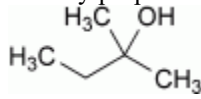
M. 2-méthylpropan-1-ol (isobutanol),



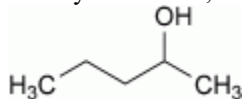
N. furane-2-carbaldéhyde (furfural),



O. 2-méthylpropan-2-ol (alcool *tert*-butylique),



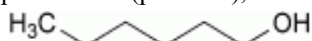
P. 2-méthylbutan-2-ol,



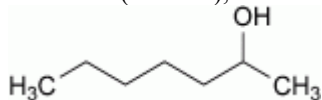
Q. pentan-2-ol,



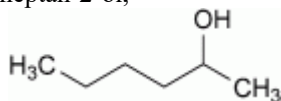
R. pentan-1-ol (pentanol),



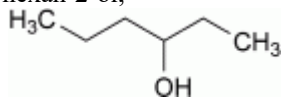
S. hexan-1-ol (hexanol),



T. heptan-2-ol,



U. hexan-2-ol,



V. hexan-3-ol.