

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université de Jijel
Faculté des Sciences Exactes et Informatique
Département de Chimie



Cours

Méthodes d'Analyses Quantitatives

Destiné aux étudiants de 3^{ème} année Licence
Spécialité Chimie pharmaceutique

Par

Dr. KEMEL Meriem

Année 2024

Avant-propos

Chers étudiants,

C'est avec un grand enthousiasme que je vous accueille dans ce cours en ligne dédié à l'analyse quantitative et à la préparation des échantillons de médicaments en chimie pharmaceutique. Dans ce domaine essentiel de la pharmacie, nous plongerons dans les techniques et les méthodes qui permettent de mesurer avec précision la composition des médicaments et d'assurer leur qualité, leur sécurité et leur efficacité.

Que ce cours soit pour vous une source d'inspiration et de développement professionnel, et qu'il vous prépare à relever avec succès les défis de la chimie pharmaceutique.

Bienvenue à bord !

SOMMAIRE

<i>Introduction générale</i>	1
 <i>Chapitre 1 : Méthodes de prétraitement de l'échantillon</i>	
<u>Partie I : Extraction Liquide-Liquide (ELL)</u>	4
I.1 Définition	4
I.2 Principe	4
I.3 Processus d'extraction à l'aide d'un solvant	4
I.3.1 Les conditions requises pour la faisabilité de l'extraction	5
I.3.2 Critères de sélection d'un solvant d'extraction	5
I.4 Solvants d'Extraction	5
I.5 Les facteurs influençant l'extraction liquide-liquide	6
I.6 Impact du pH sur le coefficient de distribution	7
I.6.1 Cas d'un acide faible	7
I.6.2 Cas d'une base faible	8
I.7 Relations relatives aux quantités	9
I.7.1 Rapport de quantité	9
I.7.2 Rendement de l'extraction	10
I.7.3 Extraction répétée	10
<u>Partie II : Extraction Solide-Liquide (ESL)</u>	11
II.1 Définition.....	11
II.2 Les différentes étapes d'une ESL	11
II.3 Facteurs influençant l'extraction solide-liquide	11
II.4 Critères de sélection du solvant	11
II.5 Facteurs impactant l'extraction solide-liquide	12
II.6 Extracteur de Soxhlet	12
II.6.1 Principe de fonctionnement	12
II.6.2 Les différentes étapes de l'extraction	13
II.6.3 Avantages / Inconvénients	14
II.7 Hydrodistillation	14
II.7.1 Principe	14
II.8 Extraction par entraînement à la vapeur d'eau	15

II.9 Extraction assistée par micro-ondes (MAE)	15
II.8 Autres méthodes complémentaires	16
II.10.1 Macération	16
II.10.2 Infusion	16
II.10.3 Percolation	16
II.10.4 Décoction	16
II.10.5 Recristallisation	16
II.10.6 Filtration	16
Partie III : Extraction sur Phase Solide (SPE)	17
III.1 Définition	17
III.2 Principe	17
III.3 Objectif de la SPE	17
2.2.4 Macération et extraction.....	17
III.4 Supports SPE	17
III.5 Procédure d'extraction par SPE	18
III.6 Mécanisme mis en jeu	19
III.6.1 Adsorption	19
III.6.2 Partage	20
III.6.3 Echange d'ions	21
III.7 Dispositifs SPE	21
III.7.1 Collecteur d'extraction sous vide	21
III.8 Choix de l'adsorbant SPE	21
III.8.1 Les silices	22
III.8.2 Les polymères organiques	22
III.9 Les paramètres guidant le développement d'une procédure SPE	24
III.10 Avantages de la SPE/ LLE	24
III.11 Inconvénient de la SPE/ LLE	25
III.12 Applications	25
Partie IV : Microextraction en Phase Solide (SPME)	29
VI.1 Définition	29
VI.2 Principe de la SPME	29
VI.3 Appareillage	29
VI.3.1 Étude du revêtement des fibres SPME	30

VI.3.1.1 Nature du revêtement	31
VI.4 Les modes de dissolution sur la fibre SPME	32
VI.4.1 Mode espace de tête (Head Space)	32
VI.4.2 Mode d'immersion	33
VI.5 Procédure d'extraction par SPME	33
VI.5.1 Vaporisation des analytes cibles, dans le cas d'un couplage SPME/ CPG	33
VI.5.2 Dissolution des analytes cibles, dans le cas d'un couplage SPME/ HPLC	34
VI.6 Aspect thermodynamique (étude de l'équilibre)	35
VI.6.1 Fibre en immersion dans une matrice homogène liquide	35
VI.6.2 Extraction à partir de l'espace de tête	36
VI.7 Amélioration du rendement d'extraction pour une analyse par SPME.....	37
VI.7.1 La température	37
VI.7.2 Le pH	37
VI.7.3 La force ionique	37
VI.7.4 Le temps de contact entre la fibre et la matrice	37
VI.7.5 L'agitation	38
VI.7.6 La nature de la phase polymérique appliquée sur la fibre	39
VI.7.7 Le temps de vaporisation des analytes cibles	39
VI.8 Les avantages	39
VI.9 Les applications en SPME	39
VI.9.1 Exemple d'application	40
Travaux dirigés du chapitre 1.....	42

Chapitre 2 : Méthodes d'Analyses Quantitatives

Partie I : Dosage Spectrophotométrique	54
I.1 Rappel	54
I.2 Principe du dosage spectrophotométrique	54
I.3 Appareillage	54
I.4 Comment une molécule absorbe-t-elle dans le domaine UV-visible	56
I.5 Dosage par Spectrophotométrie	56
I.5.1 Dosage direct	56
I.5.2 Dosage indirect	56
I.6 Construction de la courbe d'étalonnage	57

I.7 Exemples d'application	58
I.7.1 Dosage du Paracétamol	58
I.7.2 Dosage indirect du fer dans un médicament par spectrophotométrie	60
I.2 Rappel sur la spectroscopie infrarouge et son rôle dans l'analyse des médicaments.....	62
I.2.1 Principe de base.....	62
I.2.2 Applications de la FT-IR dans l'analyse quantitative.....	63
I.2.3 Utilisation des bandes caractéristiques pour les analyses quantitatives.....	63
I.2.4 Développement de techniques et validation de méthodes.....	64
I.2.5 Avantages de la spectroscopie IR pour les déterminations quantitatives.....	66
I.2.6 Défis et Limitations.....	66
Partie II : Dosage Chromatographique	67
II.1 Rappel	67
II.2 Méthodes d'étalonnage pour la quantification des substances pharmaceutiques	68
II.2.1 Principe de l'étalonnage.....	68
II.2.1 Etalonnage externe	69
II.2.2 Etalonnage interne	70
II.2.3 Courbe d'étalonnage	73
II.2.4 Normalisation des aires	74
Travaux dirigés du chapitre 2	75
<i>Conclusion générale</i>	79
<i>Références bibliographiques.....</i>	80

Les méthodes séparatives occupent une place privilégiée dans l'analyse des composés pharmaceutiques. Dans le contexte de l'analyse quantitative, les méthodes d'extraction sont systématiquement employées pour purifier les substances pharmaceutiques de la matrice résiduelle, qu'elle provienne des échantillons environnementaux ou de fluides biologiques.

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) a longtemps été un outil indispensable dans l'analyse des produits médicamenteux. Cependant, au cours des années quatre-vingts, elle a perdu de son importance au profit de la chromatographie en phase liquide (HPLC). Actuellement, plus de quatre-vingt-dix pour cent de l'analyse des molécules médicamenteuses sont menés par HPLC. Néanmoins, la CPG conserve son utilité dans l'analyse de composés volatils tels que les huiles essentielles, les coupes pétrolières, les acides gras et certains barbituriques. Son couplage avec la spectrométrie de masse en fait un outil analytique puissant, alliant sélectivité et sensibilité.

La spectrophotométrie, en raison de ses caractéristiques de sensibilité, de rapidité et de simplicité, occupe une place prépondérante dans l'analyse quantitative des médicaments. Fondée sur la mesure de l'absorption de la lumière par une substance chimique à diverses longueurs d'onde, cette méthode constitue un outil essentiel dans le domaine, offrant une approche efficace pour déterminer les concentrations de médicaments dans des échantillons.

La mise en œuvre d'une analyse nécessite la disponibilité d'un échantillon, qui contient généralement les analytes recherchés ainsi que d'autres composés constituant la matrice. Le prétraitement des échantillons vise à pré-concentrer des substances en teneur trop faible pour être détectées directement ou à les séparer d'une matrice excessivement complexe.

Ce polycopié est principalement consacré aux traitements réservés aux échantillons destinés aux analyses chromatographiques. Il propose également une présentation détaillée des techniques de dosage quantitatives les plus utilisées à l'échelle industrielle, organisées en deux chapitres : les méthodes de dosage spectrométriques et chromatographiques (utilisées en CPG et en HPLC), ainsi que les techniques de préparation de l'échantillon. Des travaux dirigés relatifs à chaque technique sont proposés à la fin de chaque chapitre.



En tant qu'outil pédagogique, ce polycopié sera d'une grande utilité pour nos étudiants, compte tenu de l'importance cruciale de la matière qu'il couvre. Destiné aux étudiants de troisième année et de Master dans différentes spécialités telles que la chimie pharmaceutique, et la chimie analytique, ce cours offre une exploration approfondie des méthodes d'analyse des produits d'intérêts.

Chapitre 1

Méthodes de prétraitement de l'échantillon

Pour effectuer une analyse chimique, il est essentiel que l'analyte, représentant la substance à quantifier, soit présent en quantité adéquate et dans une forme compatible avec l'instrument utilisé. La plupart des échantillons requièrent donc un traitement préalable spécifique, étape chronophage qui influence le résultat tout autant que la mesure en elle-même et la précision de l'instrument. Étant donné que la moitié des analyses relèvent de la catégorie des analyses de traces (moins de 1 ppm de l'analyte dans l'échantillon brut), des méthodes d'enrichissement significatives sont nécessaires. Selon les appareils et les techniques, différentes méthodes d'extraction sont employées (Figure 1) [1].

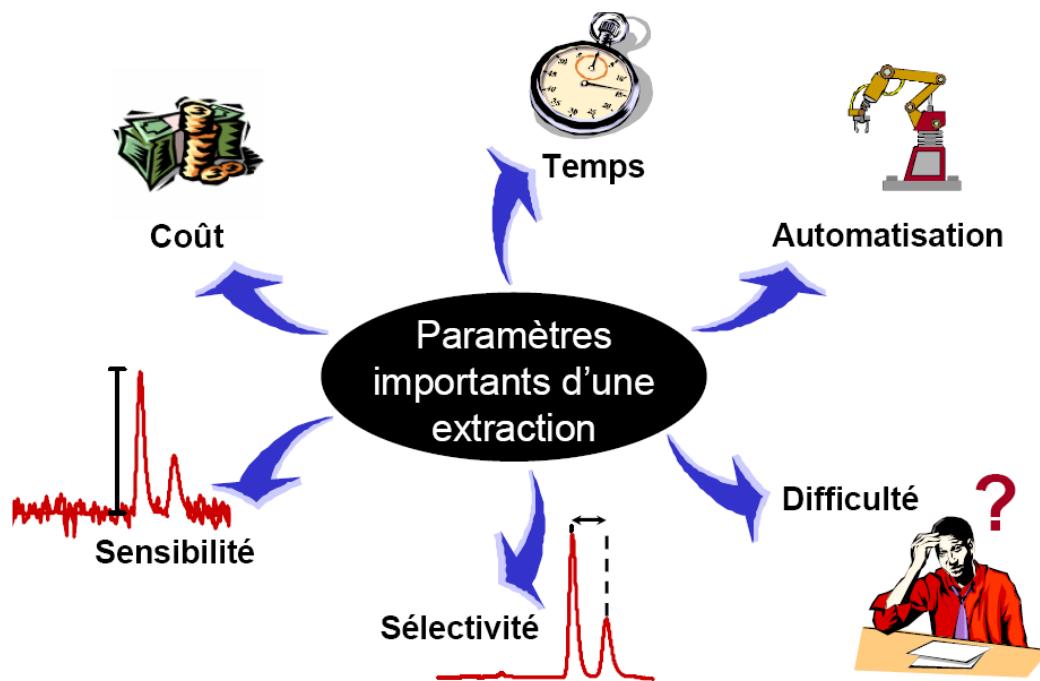


Figure 1. Paramètres influençant une technique de prétraitement de l'échantillon.

Lorsqu'il s'agit de quantifier des traces parmi des milliers de composés beaucoup plus abondants, il subsiste toujours une préoccupation quant à l'influence potentielle des résultats par la composition de la matrice. Ces interférences entre les analytes et les autres composés imposent la nécessité d'un prétraitement de l'échantillon. Pour pallier à cette étape supplémentaire, gourmande en temps, des efforts ont été déployés pour simplifier et automatiser les méthodes traditionnelles telles que l'adsorption, l'extraction ou la précipitation [2].

Partie I : Extraction Liquide-Liquide (ELL)

I.1 Définition

L'extraction liquide-liquide, parfois désignée sous le terme d'extraction par solvant, constitue une procédure de séparation impliquant le transfert de matière entre deux phases liquides non miscibles. Cette opération s'effectue sans échange de chaleur. L'objectif primordial de l'extraction liquide-liquide est de transférer une espèce chimique d'un solvant où elle est difficilement extractible vers un autre solvant, plus volatile et non miscible, où elle peut être aisément isolée. Ce solvant est communément désigné comme le solvant d'extraction [3].

I.2 Principe

Le principe repose sur la répartition du soluté entre les deux phases liquides, en fonction de son attraction respective envers chacune d'elles. Il se crée ainsi un équilibre de répartition, symbolisé par le coefficient de partage ou de distribution, noté K. Cette mesure est définie comme le rapport entre les concentrations respectives du soluté dans le solvant organique et dans la phase résiduelle [3]. Une extraction de qualité est caractérisée par une constante d'équilibre K plus élevée.

$$K = \frac{\text{Concentration de l'analyte dans la phase organique}}{\text{Concentration de l'analyte dans la phase résiduelle}}$$

$$K = \frac{[A]_{\text{org}}}{[A]_{\text{aq}}}$$

K : étant le coefficient de partage ou de distribution.

Le coefficient de distribution ou de partage connaît une augmentation lorsque des solvants organiques apolaires sont utilisés.

I.3 Processus d'extraction à l'aide d'un solvant

L'extraction liquide-liquide s'effectue en mettant en contact étroit le solvant d'extraction avec la solution à l'aide d'appareils conçus pour mélanger les deux phases (ampoules à décanter, colonnes, mélangeurs). La séparation des phases est réalisée par décantation gravimétrique ou centrifugation (Figure I.1) [4].



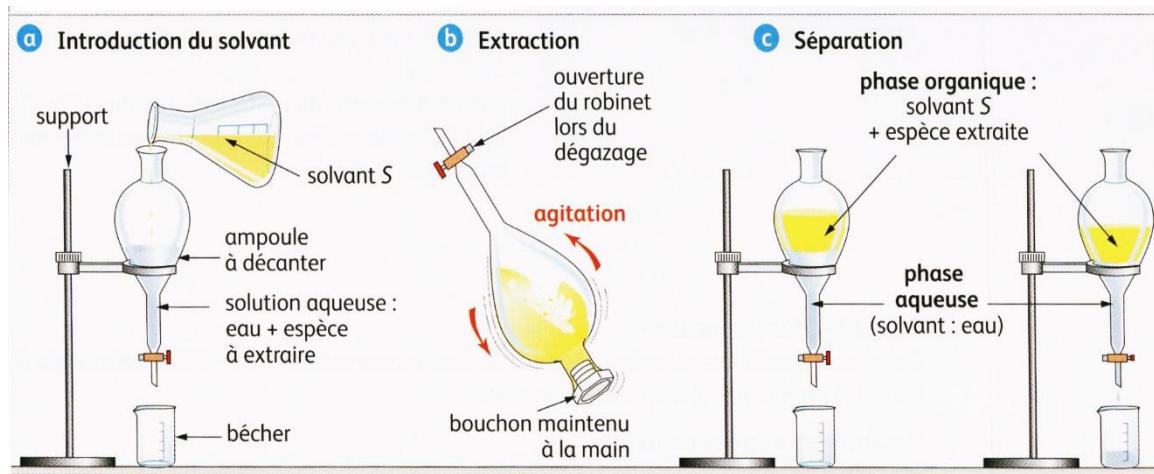


Figure I.1. Les différentes étapes d'une extraction liquide-liquide.

I.3.1 Les conditions requises pour la faisabilité de l'extraction

- Les deux phases doivent être non miscibles.
- Le soluté doit préférer le solvant d'extraction au diluant.
- Faible viscosité pour les deux phases.
- Différences de masses volumiques.
- Absence de réactions chimiques entre les composants du mélange.

I.3.2 Critères de sélection d'un solvant d'extraction

- Forte affinité du solvant pour les solutés.
- Bonne solubilité entre le solvant d'extraction et le soluté à extraire.
- Tension de vapeur adéquate pour le solvant.
- Minimalité de la toxicité du solvant d'extraction.
- Possibilité de recyclage du solvant d'extraction.

I.4 Solvants d'Extraction

Solvants	Densité	Tébu (°C)
Ether diéthylique	0,71	35
Dichlorométhane	1,34	40
Pentane	0,63	36
Cyclohexane	0,78	81
Toluène	0,87	111
Acétate d'éthyle	0,90	77

♣ Solvants polaires

Les solvants dotés d'un moment dipolaire permanent sont catégorisés en tant que solvants polaires. Ces solvants sont généralement caractérisés par leur affinité hydrophile, ce qui signifie qu'ils sont compatibles avec l'eau. Des exemples de solvants fortement polaires et hydrophiles incluent H_2O , NH_3 , ROH , RCOOH , RNH_2 , tandis que les esters et les éthers oxydes présentent un degré de polarité modéré. Les solvants polaires ont la capacité de dissoudre des composés polaires hydrophiles [5].

♣ Solvants apolaires

Tous les solvants qui ne présentent pas de moment dipolaire permanent, sont définis comme étant des solvants apolaires. Les solvants apolaires sont considérés comme des solvants ayant un caractère hydrophobe (incompatible avec l'eau) [5].

Exemples de solvants apolaires et hydrophobes : les hydrocarbures aliphatiques et les hydrocarbures cycliques. Par contre, les hydrocarbures aromatiques, halogénés, nitrés, CS_2 et CCl_4 sont peu polaires. Les solvants apolaires dissolvent les molécules hydrophobes.

♣ Solvants protiques

Ce sont tous les solvants qui possèdent un hydrogène mobile lié directement à un atome porteur d'un ou deux doublets non liants : H_2O , NH_3 , ROH , $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$, RCOOH , R-CONH_2 .

♣ Solvants aprotiques

- Les solvants aprotiques polaires : esters, DMF, nitriles, dérivés nitrés, sulfones
- Les solvants aprotiques apolaires : Les hydrocarbures et leurs dérivés.

I.5 Les facteurs influençant l'extraction liquide-liquide

Les facteurs qui influent sur l'extraction comprennent la nature du solvant, la matrice, et les propriétés physicochimiques du soluté. La matrice, notamment dans les matrices biologiques, est complexe avec des molécules interférentes endogènes ou exogènes. Idéalement, un solvant organique sélectif vis-à-vis du soluté serait utilisé, mais en pratique, cela reste un défi.

Le soluté, la substance à extraire, possède des caractéristiques physicochimiques propres qui influent sur le coefficient de partage. La structure chimique, la présence d'hétéroatomes, et la longueur de la chaîne carbonée jouent un rôle crucial.

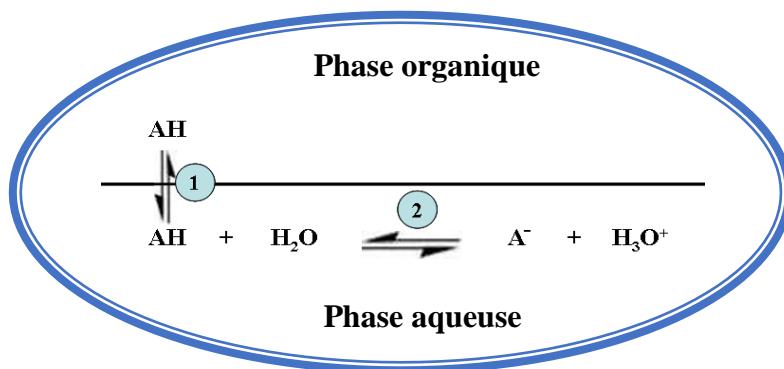
Le pH a également une influence significative, car seules les molécules globalement neutres sont extractibles par les solvants organiques. La règle fondamentale est que les molécules ioniques ne sont pas extractibles, et ajuster le pH peut favoriser la forme moléculaire de l'analyte.

La connaissance de la constante d'acidité (pK_a) est cruciale pour déterminer le pH optimal de travail. En travaillant dans un intervalle de pH spécifique, la forme moléculaire de l'analyte est favorisée. Dans le cas d'ampholytes, le pH optimal est le pH isoélectrique. Si la neutralisation de la molécule n'est pas possible, la formation de paires d'ions peut être une solution alternative [6].

I.6 Impact du pH sur le coefficient de distribution

I.6.1 Cas d'un acide faible

Considérons une solution aqueuse contenant une molécule organique à caractère acide faible, noté AH, que l'on souhaite extraire à l'aide d'un solvant organique. Les divers équilibres associés à cette situation sont illustrés dans le schéma ci-dessous :



Selon l'équilibre 1, seule la forme moléculaire AH est soluble dans la phase organique, ce qui la rend extractible. Le coefficient de distribution (partage) peut être exprimé comme suit :

$$K = \frac{[AH]_{\text{org}}}{[AH]_{\text{aq}}}$$

Dans une solution aqueuse, conformément à l'équilibre 2, l'acide faible peut exister sous deux formes : la forme non ionisée (AH) et la forme ionique (A⁻). Le taux de distribution (D) est alors défini par :

$$D = \frac{[AH]_{\text{org}}}{[AH]_{\text{aq}} + [A^-]_{\text{aq}}}$$

D : le coefficient de distribution conditionnel (dépendant du pH).

Dans la plupart des cas, K et D sont liés par une relation simple qui tient compte de tous les équilibres présents dans les deux phases. En appliquant la loi d'action de masse à l'équilibre 2 :



$$K_a = \frac{[A^-]_{aq} [H_3O^+]_{aq}}{[AH]_{aq}} \Rightarrow [A^-]_{aq} = \frac{K_a}{[H_3O^+]_{aq}} [AH]_{aq}$$

En remplaçant $[A^-]$ dans l'expression de D on obtient [7, 8]:

$$D = \frac{[AH]_{org}}{[AH]_{aq} + \frac{K_a}{[H_3O^+]_{aq}} [AH]_{aq}}$$

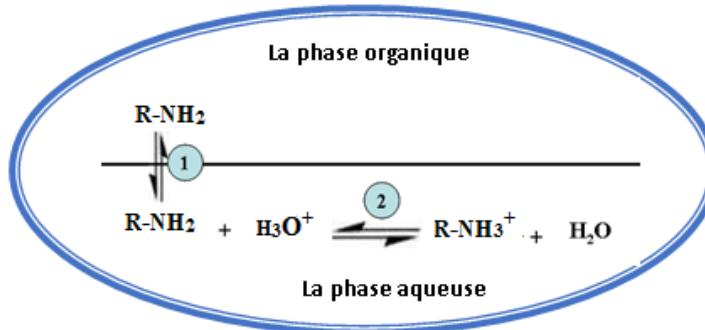
$$D = \frac{[AH]_{org}}{[AH]_{aq} \left(1 + \frac{K_a}{[H_3O^+]_{aq}} \right)}$$

$$D = \frac{K}{\left(1 + \frac{K_a}{[H_3O^+]_{aq}} \right)} = \frac{K}{(1 + 10^{pH - pK_a})}$$

On observe ainsi que le taux de distribution dépend, dans ce cas, du pH de la phase aqueuse.

I.6.2 Cas d'une base faible

Considérons une solution aqueuse contenant une amine R-NH₂ que l'on souhaite extraire à l'aide d'un solvant organique. Les équilibres associés à cette situation sont présentés dans le schéma ci-dessous :



D'après l'équilibre 1, seule la forme moléculaire R-NH₂ est soluble dans la phase organique, rendant ainsi l'amine extractible. Le coefficient de partage peut être exprimé comme suit :

$$K = \frac{[R - NH_2]_{org}}{[R - NH_2]_{aq}}$$

En solution aqueuse, selon l'équilibre 2, l'amine peut se présenter sous deux formes : la forme non ionisée ($R-NH_2$) et la forme ionique ($R-NH_3^+$) [7, 8]. Le taux de distribution est alors défini par :

$$D = \frac{[R - NH_2]_{org}}{[R - NH_2]_{aq} + [R - NH_3^+]_{aq}}$$

En appliquant la loi d'action de masse à l'équilibre 2 :

$$K_a = \frac{[R - NH_2]_{aq} [H_3O^+]_{aq}}{[R - NH_3^+]_{aq}} \Rightarrow [R - NH_3^+]_{aq} = \frac{[H_3O^+]_{aq}}{K_a} [R - NH_2]_{aq}$$

En remplaçant $[R - NH_3^+]$ dans l'expression de D on obtient :

$$D = \frac{[R - NH_2]_{org}}{[R - NH_2]_{aq} \left(1 + \frac{[H_3O^+]_{aq}}{K_a} \right)} \Rightarrow D = \frac{K}{\left(1 + \frac{[H_3O^+]_{aq}}{K_a} \right)} = \frac{K}{(1 + 10^{pK_a - pH})}$$

I.7 Relations relatives aux quantités

I.7.1 Rapport de quantité

L'analyse de l'efficacité d'une extraction nécessite la connaissance de la quantité extraite par le solvant à partir d'une quantité initiale q_0 présente dans une solution aqueuse. Pour ce faire, il est essentiel de déterminer, à chaque équilibre atteint, la quantité extraite dans le solvant d'extraction, notée q_{org} , ainsi que celle demeurant dans la phase résiduelle, notée q_{aq} [9]. C'est dans ce contexte qu'intervient un paramètre appelé le rapport de quantité α , défini comme suit :

$$\alpha = \frac{q_{org}}{q_{aq}}$$

Ce coefficient est parfois désigné comme le coefficient de partage relatif aux quantités, et il ne constitue pas une constante [8]. En effet, α peut être lié à D par l'intermédiaire de la relation suivante :

$$\alpha = \frac{q_{org}}{q_{aq}} = \frac{C_{A(org)} V_{org}}{C_{A(aq)} V_{aq}}$$

$$\alpha = K \frac{V_{org}}{V_{aq}} \quad \alpha = D \frac{V_{org}}{V_{aq}}$$

Cette équation souligne clairement que α dépend du rapport des volumes de chaque phase.

I.7.2 Rendement de l'extraction

L'efficacité de l'extraction se manifeste à travers le rapport entre la quantité de soluté extraite (q_{org}) et la quantité initiale de soluté (q_0), exprimé comme suit :

$$r = \frac{q_{org}}{q_0}$$

I.7.3 Extraction répétée

La réalisation de plusieurs extractions successives en fractionnant le volume total de solvant se révèle intéressante, conduisant à un rendement supérieur par rapport à celui obtenu lors d'une seule extraction avec la totalité du volume de solvant [10]. Cela est représenté par l'équation suivante :

$$C_n = C_o \left(\frac{1}{1 + D \frac{V_{org}}{V_{aq}}} \right)^n$$

Où n représente le nombre de cycles d'extractions réalisés.

Partie II : Extraction Solide-Liquide (ESL)

II.1 Définition

Les méthodes d'extraction reposent sur les interactions moléculaires, lesquelles sont principalement influencées par les polarités distinctes des composants d'un mélange. L'extraction solide-liquide constitue un processus de transfert de matière entre une phase solide, représentée par la substance à extraire, et une phase liquide, représentée par le solvant d'extraction. Cette technique permet une extraction rapide et efficace des composés organiques présents dans des matrices solides [11].

II.2 Les différentes étapes d'une ESL

L'extraction solide-liquide implique un contact étroit entre le solide et le solvant, se déroulant en trois étapes distinctes :

- La dissolution du soluté au sein des particules de solvant.
- La diffusion de la solution de l'intérieur du solide vers l'extérieur.
- Le transfert du soluté contenu dans la solution, proche du solide, vers la masse restante du solvant.

Ces trois phases déterminent la vitesse globale de l'extraction solide-liquide [12].

II.3 Facteurs influençant l'extraction solide-liquide

- La nature et la taille des particules exercent une influence directe sur la vitesse d'extraction.
- Le choix du solvant est soumis à certains critères.

II.4 Critères de sélection du solvant

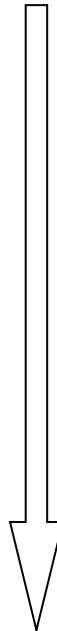
- ❖ Le solvant doit demeurer à l'état liquide aux températures et pressions où l'extraction est effectuée.
- ❖ Le solvant doit être non miscible avec la phase initiale contenant le composé à extraire.
- ❖ Le composé à extraire doit être très soluble dans le solvant.

Donc, le choix de solvant dépend de la polarité du soluté.

Les solvants fréquemment utilisés dans ce type d'extraction incluent l'eau, l'éthanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle, l'hexane et le dichlorométhane.

Classement par polarité croissante de certains solvants

Cyclohexane
Tétrachlorométhane
Trichloréthène
Toluène
Benzène
Dichlorométhane
Éther diéthylique
Trichlorométhane
Acétate d'éthyle
Pyridine
Propanone
Propan-1-ol
Éthanol
Méthanol
Eau



II.5 Facteurs impactant l'extraction solide–liquide

L'augmentation de la température exerce une influence positive en accroissant la solubilité et la facilité de diffusion du soluté, tout en réduisant la viscosité du solvant. Cependant, une élévation excessive de la température peut également favoriser la dissolution de composés indésirables ou entraîner la détérioration des composés extraits [13].

II.6 Extracteur de Soxhlet

Comparée à l'extraction discontinue (ampoule à décanter), l'extraction continue est un processus plus prolongé, mais elle offre l'avantage d'être plus exhaustive. L'extracteur de Soxhlet constitue un dispositif spécialement conçu pour l'extraction continue solide-liquide.

II.6.1 Principe de fonctionnement

Une quantité de solvant (5 à 10 fois la masse de l'échantillon solide à extraire) est portée à ébullition, puis condensée à l'aide du condenseur à boules dans le réservoir à siphon, qui contient le solide à extraire dans une cartouche de papier épais. Le contact entre le solvant et le produit à extraire se prolonge pendant l'accumulation du solvant dans le réservoir. Lorsque le niveau de solvant atteint un certain seuil, il amorce le siphon et retourne dans le ballon, entraînant avec lui la substance dissoute. Ce cycle peut être répété plusieurs fois en fonction de la facilité d'obtention du produit [14].

Lorsque le ballon est soumis à la chaleur (2), les vapeurs de solvant traversent le tube adducteur (3), se condensent dans le réfrigérant (9) et retournent dans le corps de l'extracteur (4,5). Ce processus entraîne la macération du solide dans le solvant, chauffé par les vapeurs situées en dessous. Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube-siphon (6). À ce stade, le liquide retourne dans le ballon, entraînant avec lui les substances extraites, et le solvant présent dans le ballon s'enrichit progressivement en composés solubles (Figure II.1).

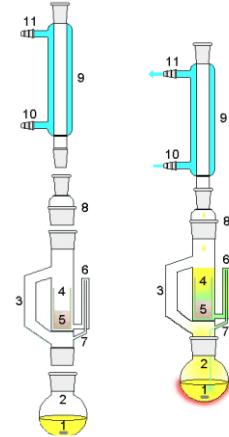


Figure II.1. Montage de Soxhlet

II.6.2 Les différentes étapes de l'extraction

L'extraction par Soxhlet est souvent utilisée pour extraire des composés organiques à partir de matrices solides telles que des plantes, des aliments ou des échantillons environnementaux. Cette méthode permet une extraction efficace en continu tout en minimisant les pertes de solvant [14].

a)- Préparation de l'échantillon

- Réduire l'échantillon solide en une taille appropriée pour faciliter l'extraction.
- Pesar précisément l'échantillon.

b)- Assemblage de l'appareillage

Installer l'appareillage, qui se compose d'un ballon de distillation, d'un extracteur Soxhlet et d'un réfrigérant.

c)- Insertion de l'échantillon

Insérez l'échantillon dans la cartouche et positionnez-la dans le tube extracteur de l'appareil.

d)- Choix du solvant

Sélectionner un solvant approprié en fonction de la polarité des composés à extraire.

e)- Chauffage à reflux

- Chauffer le ballon de distillation pour faire évaporer le solvant.
- Les vapeurs du solvant remontent à travers le tube extracteur et entrent en contact avec l'échantillon solide.
- Le solvant condensé dans le réfrigérant retourne dans le tube extracteur, extrayant les composés de l'échantillon.

f)- Cycles d'extraction

- Les cycles de chauffage et de reflux se répètent automatiquement grâce au dispositif Soxhlet, permettant une extraction continue.
- Le mélange (solvant + composés extraits) est recueilli dans le même ballon.
- Le solvant est évaporé pour récupérer les composés extraits.

II.6.3 Avantages

- ✓ Extraction en continu
- ✓ Manipulations simples

II.6.4 Inconvénients

- ✓ Extractions longues (3 à 24 heures)
- ✓ Travail à température d'ébullition
- ✓ Grands volumes de solvants (100 à 1000 ml)

II.7 Hydrodistillation

La plupart des huiles essentielles sont obtenues en utilisant la technique de l'hydro-distillation, qui implique l'entraînement par la vapeur d'eau de la partie aérienne des plantes (à l'exception des huiles essentielles d'agrumes telles que le citron et l'orange). Le coût élevé des huiles essentielles est attribuable à la rareté plutôt qu'à la méthode d'extraction, car celle-ci demeure similaire pour la plupart des plantes. Il faut parfois plusieurs tonnes de plantes pour produire seulement un litre d'huile essentielle en raison de la faible quantité contenue dans les végétaux. Les températures nécessaires à l'hydrodistillation avoisinent généralement les 100 °C, protégeant ainsi les molécules odorantes d'intérêt pour l'industrie de la parfumerie.

II.7.1 Principe

Concernant le principe de l'hydro-distillation, il consiste à porter à ébullition un mélange d'eau et de matière végétale. Lorsque cela se produit, les cellules végétales éclatent, libérant les composés odorants qui sont ensuite entraînés par la vapeur d'eau. Ces composés sont récupérés dans un récipient distinct après avoir été condensés dans le réfrigérant. L'hydro-distillat obtenu se compose d'une phase aqueuse et d'une phase organique, cette dernière étant l'huile essentielle. En cas de densités similaires entre ces deux phases, une émulsion peut se former. Les techniques d'extraction reposent sur les interactions moléculaires, influencées principalement par les polarités différentes des constituants d'un mélange (Figure II.2) [15].

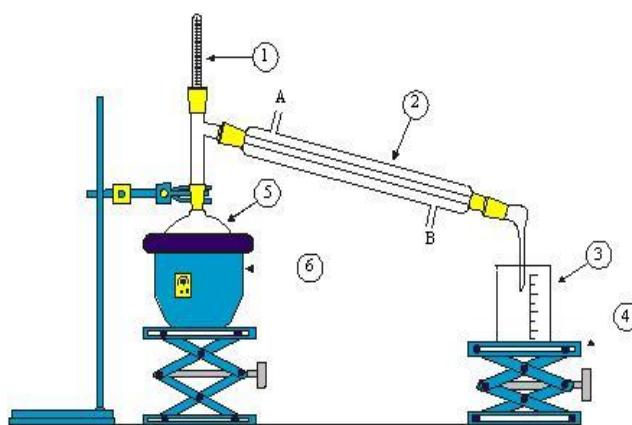


Figure II.2. Montage de l'hydrodistillation.

II.8 Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'hydro-distillation, cette technique utilise l'entraînement des substances aromatiques par la vapeur d'eau. La matière végétale n'est pas en contact direct avec l'eau, mais elle est traversée par un courant de vapeur d'eau qui va tirer les substances volatiles hydrophobes. La vapeur détruit la structure des cellules végétales, en entraînant les constituants volatils vers un système de refroidissement. La distillation par entraînement à la vapeur d'eau s'effectue en plaçant les plantes aromatiques dans un appareil de type Kaiser Lang en se servant d'un dispositif d'extraction de type Kaiser Lang modifié. La vapeur, chargée de l'huile essentielle se condense dans le serpentin du réfrigérant avant d'être récupérée dans un récipient. La durée de distillation est généralement longue (Figure II.3) [16].

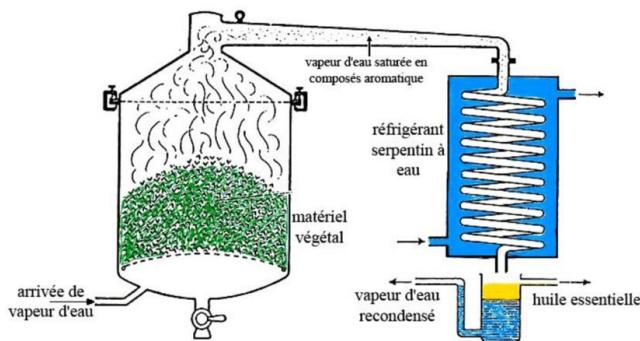


Figure II.3. Montage de l'entraînement à la vapeur d'eau

II.9 Extraction assistée par micro-ondes (MAE)

L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes consiste à placer la matière végétale dans un réacteur micro-ondes sans ajout d'eau ou de solvant organique. Le chauffage de l'eau contenue dans la plante permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des espèces odorantes de l'huile essentielle. Une fois libérée, l'huile essentielle est ensuite entraînée par la vapeur d'eau produite par la matière végétale (Figure II.4) [17].



Figure II.4. Montage de l'extraction assistée par micro-onde

II.10 Autres méthodes complémentaires**II.10.1 Macération**

La macération est un procédé consistant à laisser reposer une substance solide dans un liquide, généralement à température ambiante, en vue d'extraire les composés solubles. Ce processus peut être effectué dans un mélange hydro-alcoolique et dure jusqu'à 72 heures.

II.10.2 Infusion

L'infusion implique l'introduction d'un solide plus ou moins divisé dans un liquide chaud, ou le versement d'un liquide chaud sur un solide, en vue de dissoudre les constituants utiles. Le mélange est ensuite laissé à refroidir.

II.10.3 Percolation

La percolation se caractérise par le passage d'un solvant, généralement chaud, à travers un lit de solide, dissolvant ainsi les constituants solubles qu'il renferme [11].

II.10.4 Décoction

La décoction constitue une méthode d'extraction des principes actifs d'une préparation généralement végétale par dissolution dans de l'eau portée à ébullition. Cette technique est principalement appliquée aux parties les plus résistantes des plantes, telles que les racines, les graines, l'écorce et le bois [11].

II.10.5 Recristallisation

La recristallisation correspond à un changement d'état dans un liquide ou une vapeur, conduisant à la formation d'une phase solide cristallisée présentant une structure géométrique régulière et organisée. Cette opération permet de récupérer des substances dissoutes dans un solvant, de séparer les impuretés présentes dans un solide, ainsi que de purifier certains composés [12].

II.10.6 Filtration

Cette méthode consiste à séparer les particules solides des liquides à l'aide d'un filtre. Elle est souvent utilisée pour éliminer les particules en suspension dans les échantillons liquides avant l'analyse.

Partie III : Extraction sur Phase Solide (SPE)

III.1 Définition

La méthode d'extraction sur phase solide est fréquemment utilisée pour purifier ou concentrer un extrait brut avant d'analyser un ou plusieurs de ses composants. De plus en plus, cette approche remplace avantageusement la méthode d'extraction liquide/liquide, réalisée à l'aide d'une ampoule à décanter, une méthode qui est relativement plus lente et coûteuse [3].

III.2 Principe

Le principe fondamental de l'extraction sur phase solide est similaire à celui de la chromatographie en phase liquide :

- Le support solide agit en tant que phase stationnaire.
- L'éluant agit comme phase mobile.

Cette méthode repose sur la distribution des composés d'intérêt entre une phase solide (adsorbant) et une phase liquide (éluant). Ainsi, les analytes recherchés, présents à l'état de traces, sont séparés de la matrice interférente [18].

III.3 Objectif de la SPE

- Prétraiter les échantillons liquides avant l'analyse.
- Isoler ou piéger les analytes recherchés, présents en traces, au sein de matrices complexes sur un support solide.
- Concentrer les analytes contenus dans des matrices complexes.

Le traitement des échantillons liquides par la technique de SPE permet de résoudre le problème de la présence d'autres analytes non désirés, susceptibles d'interférer avec la méthode de séparation et de détection.

III.4 Supports SPE

L'évolution de la technique d'extraction sur phase solide a été rendue possible grâce au développement de supports permettant un gain en sélectivité par l'association de plusieurs mécanismes. Le choix de la colonne est déterminé par le volume de l'échantillon, sa concentration en analytes et les types d'échanges recherchés [19].

- Cartouches de différentes capacités
- Disques, offrant un débit plus important et une extraction plus rapide.
- Plaques à 96 puits

Paramètres	Cartouche	Disques
Dimensions	1.1 x 1.1 cm	0.05 x 4.7 cm
Surface	0.95 cm ²	11.34 cm ²
Poids du packing	500 mg	500 mg
Débit à 85 kPa	30 mL/min	100 mL/min
Vélocité linéaire	0.525 cm/s	0.15 cm/s



Figure III.1. Les différents dispositifs SPE disponible sur le marché [19].

III.5 Procédure d'extraction par SPE

1^{ère} étape : Conditionnement (ou solvatation) de l'adsorbant contenu dans la cartouche

Cette phase vise à conditionner la cartouche en imprégnant le support avec un solvant organique pour activer les groupements fonctionnels en surface.

Comment ?

Initialement, un solvant organique mouille le support hydrophobe, suivi d'un solvant de polarité similaire à celui de l'échantillon.

2^{ème} étape : Percolation de l'échantillon à travers le support

L'échantillon est appliqué sur la partie supérieure du lit d'adsorbant. Les interférents sans affinité pour l'adsorbant ne sont pas retenus, tandis que d'autres le sont plus ou moins fortement par rapport aux composés d'intérêt. Pour maximiser l'efficacité de la purification, il est crucial de contrôler la vitesse d'écoulement de l'échantillon.

3^{ème} étape : Lavage (rinçage) supplémentaire

Cette étape vise à éliminer les interférents faiblement retenus sur l'adsorbant par rapport aux composés d'intérêt.

Comment ?

Il s'agit de sélectionner un solvant à faible pouvoir éluant pour éliminer les interférents tout en maintenant les composés d'intérêt fixés.

4^{ème} étape : Elution des composés ciblés par percolation d'un solvant approprié.

Cette étape consiste à récupérer les composés d'intérêt fixés sur l'adsorbant. Le solvant d'élution doit maximiser les interactions avec les molécules cibles tout en minimisant celles avec les autres interférents susceptibles de rester adsorbés. Le solvant d'élution doit être le plus efficace possible, avec un volume minimal pour obtenir une concentration préalable significative [20].

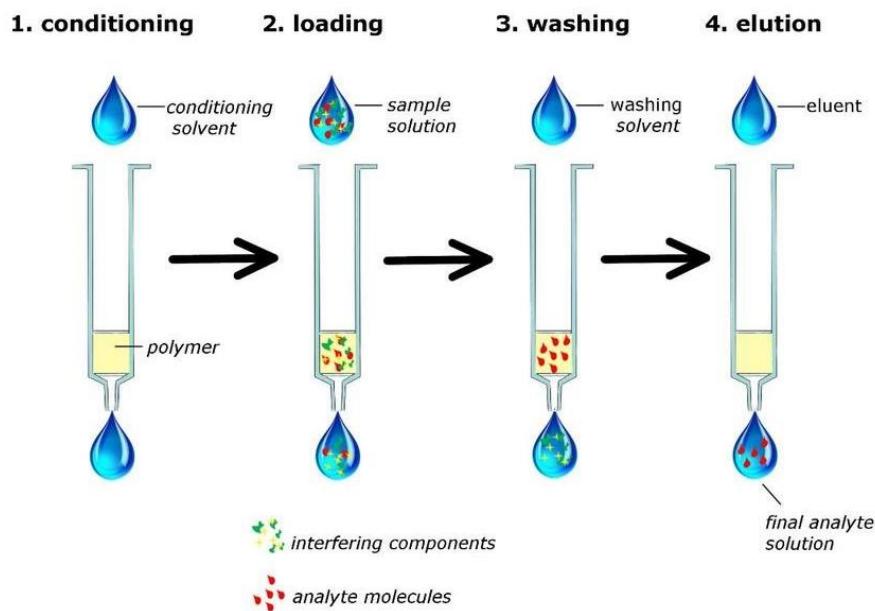


Figure III.2. Les étapes d'une extraction par SPE.

III.6 Mécanisme mis en jeu

Selon la nature de la phase stationnaire (l'adsorbant) et la phase mobile (l'éluant), différents mécanismes peuvent être distingués, tels que :

- L'adsorption.
- Le partage.
- L'échange d'ions.
- L'exclusion stérique.

III.6.1 Adsorption

Les phases stationnaires adsorbantes sont des supports dont la surface est intrinsèquement active, retenant les solutés principalement par adsorption.

Quelles sont ces phases adsorbantes ?

- **Les polymères poreux** : pour les composés aromatiques
- **Le Fluorisil (Mg_2SiO_3)** : pour les composés polaires
- **Le charbon actif** : pour les composés organiques
- **La silice** : pour les composés polaires et les composés acides
- **L'alumine** : pour les composés polaires et les composés basiques

Par exemple, la silice et l'alumine sont des phases polaires non greffées, utilisées pour extraire des composés polaires dissous dans des solvants apolaires ou peu polaires.

III.6.2 Partage

Le mécanisme de rétention (partage) des analytes résulte de l'interaction des forces de Van der Waals ou des forces dipolaires. Ces phases, qu'elles soient greffées ou non, peuvent être polaires ou apolaires.

Quelles sont ces phases ?

	Octadecyl C18
	Octyl C8
	Ethyl C2
	Phenyl
	Cyclohexyl
	Cyano (CN)
	Amino (NH2)
	Diol

III.6.3 Echange d'ions

Les interactions ioniques ou électrostatiques se produisent entre un soluté chargé et une phase solide portant des charges opposées à celles du soluté (échanges cationiques entre les charges positives et échanges anioniques entre les charges négatives). Les phases échangeuses d'ions sont plus sensibles au pH, à la force ionique et à la force du contre-ion qu'à la force du solvant. Elles utilisent les interactions ioniques comme mécanisme principal de rétention [21].

III.7 Dispositifs SPE

- **Un réservoir** : permet l'introduction de l'échantillon
- **Un support solide** : assure la rétention des solutés
- **Un embout** : facilite l'adaptation de la cartouche à un autre dispositif



- Les cartouches SPE sont en polypropylène.
- Les frittés sont en polyéthylène
- Les adsorbants les plus courants sont à base de silice greffée de taille de particules de 45 µm.
- La nature des greffons détermine le mode d'interaction :
 - ❖ Un greffon C18 (apolaire), engendre des interactions de type van der Waals
 - ❖ Une silice activée (polaire), induit des interactions par pont hydrogène.

III.7.1 Collecteur d'extraction sous vide

Un collecteur d'extraction sous vide, comprenant 12 entrées et relié à une pompe à vide à membranes, facilite les étapes de pré-concentration et de fractionnement lors de l'utilisation de cartouches SPE pendant l'extraction (Figure III.3).

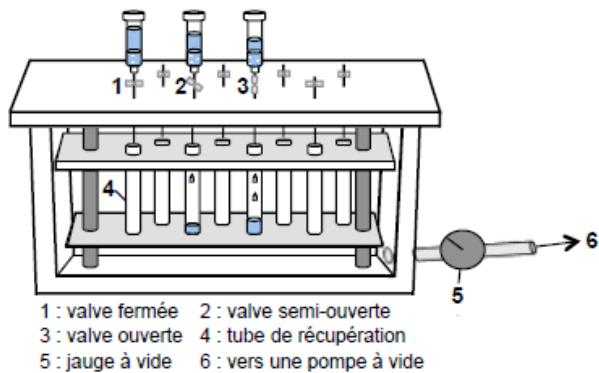


Figure III.3. Adaptateur des cartouches SPE.

III.8 Choix de l'adsorbant SPE

Quel que soit l'échantillon à purifier (environnemental, pharmaceutique, cosmétique, agrochimique, etc.), il est essentiel de sélectionner l'adsorbant d'extraction sur phase solide avec précision.

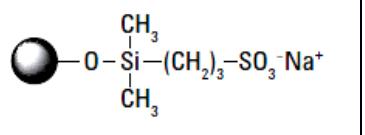
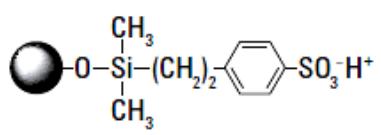
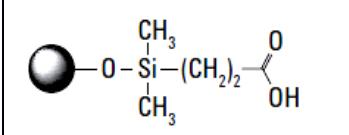
Ce choix détermine une sélectivité spécifique aux composés d'intérêt et une capacité de charge suffisante pour l'adsorption complète de ces composés. De manière générale, on rencontre deux grandes familles :

- Les silices
- Les polymères

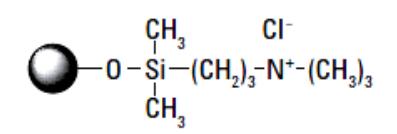
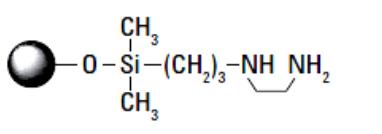
Ces deux familles présentent des caractéristiques distinctes, avec des applications, avantages et inconvénients variés [19, 21].

III.8.1 Les silices

Silice pour mode échange cationique

 PRS	 SCX	 CBA
--	--	---

Silice pour mode échange anionique

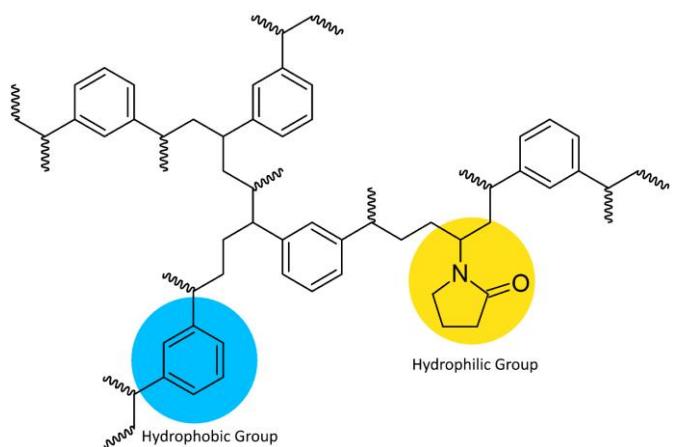
 SAX	 PSA
--	---

PRS : Phenyl-Retained Silica; **SCX** : Strong Cation Exchange; **CBA** : Carboxylic Acid; **SAX** : Strong Anion Exchange; **PSA** : Primary and Secondary Amine.

III.8.2 Les polymères organiques

• Phase HLB : Hydrophilic-Lipophilic Balance

La méthode HLB, introduite par Griffin en 1949, évalue l'équilibre entre la partie hydrophile et la partie lipophile d'une molécule de tensioactif, équilibre lié à la solubilité dans l'eau. La phase d'extraction HLB est composée d'une résine fabriquée à partir d'un copolymère de divinylbenzène et de vinyl pyrrolidinone, avec la fonction pyrrolidinone agissant comme groupe hydrophile incorporé. Cette fonction améliore également la rétention de certains analytes polaires [22].

Procédure de préparation et d'extraction sur une cartouche HLB

Conditionnement
MeOH/Eau

Percolation de l'échantillon
↓
Lavage
5% MeOH dans l'eau

Élution
MeOH

Evaporation et reconstitution

- **Polymère d'échange cationique :**

Conçus pour les molécules basiques

Procédure de préparation et d'extraction sur une cartouche WCX

MCX	WCX

- **Polymère d'échange anionique :**

Conçus pour les molécules acides

Procédure de préparation et d'extraction sur une cartouche WAX

MAX	WAX

Conditionnement
MeOH/Eau

Percolation de l'échantillon

1^{er} Lavage : acide formique 2%
2^{ème} Lavage : Méthanol

Élution

Méthanol avec NH₄OH 2%

Evaporation et reconstitution

Conditionnement
MeOH/Eau

Percolation de l'échantillon

1^{er} Lavage : 2% NH₄OH
2^{ème} Lavage : Méthanol

Élution

Méthanol avec acide formique

Evaporation et reconstitution

Mode-mixte

- ⊕ Les phases **Hydrophobique / Échange anionique C8/SAX** comprennent une base d'amine quaternaire et des greffons hydrophobes, utilisées pour extraire les acides faibles portant une ou plusieurs charges négatives.
- ⊕ Les phases **Hydrophobique / Échange cationique C8/SCX** : sont constituées d'un acide fort (sulfonique) et d'un greffon hydrophobe, utilisées pour extraire les bases faibles portant une ou plusieurs charges positives.
- ⊕ Les phases **Hydrophobique / Échange cationique faible C18/WCX** : sont composées d'un acide faible (carboxylique) et de greffons hydrophobes, utilisées pour extraire les bases fortes portant une ou plusieurs charges positives [21].

Mode multiple

RP/SCX-2/SAX

III.9 Les paramètres guidant le développement d'une procédure SPE

- La méthode séparative utilisée et la sensibilité de la détection.
 - Volume nécessaire pour la préconcentration,
 - Une détection très sélective.
- L'élimination des interférents n'est pas forcément nécessaire.
- Le nombre de composés à rechercher simultanément et leurs propriétés physico-chimiques (polarité, solubilité....).
- La nature de l'échantillon et la quantité disponible.
 - Pour les échantillons en phase aqueuse (comme ceux d'origine biologique ou environnementale), on utilise des supports hydrophobes.
 - Pour les échantillons en phase organique (où les composés polaires doivent être extraits), on utilise des supports tels que les silices vierges ou greffées, ainsi que les alumines.

La connaissance de ces trois paramètres permet :

- De choisir la nature chimique de l'adsorbant (PS)
- De déterminer la quantité de support conduisant à une forte affinité avec les analytes (volume de fixation final) [23].

III.10 Avantages de la SPE/ LLE

- ✓ Extraction plus complète de l'analyte.
- ✓ Consommation réduite en solvant organique.

- ✓ Collection plus facile de la fraction de l'analyte totale
- ✓ Élimination des particules indésirables
- ✓ Procédures manuelles plus faciles
- ✓ Rapidité
- ✓ Sélectivité : large choix de PS et de solvants
- ✓ Enrichissement des traces : améliore les limites de détection
- ✓ Possibilité de couplage avec d'autres méthodes de séparation.

III.11 Inconvénient de la SPE/ LLE

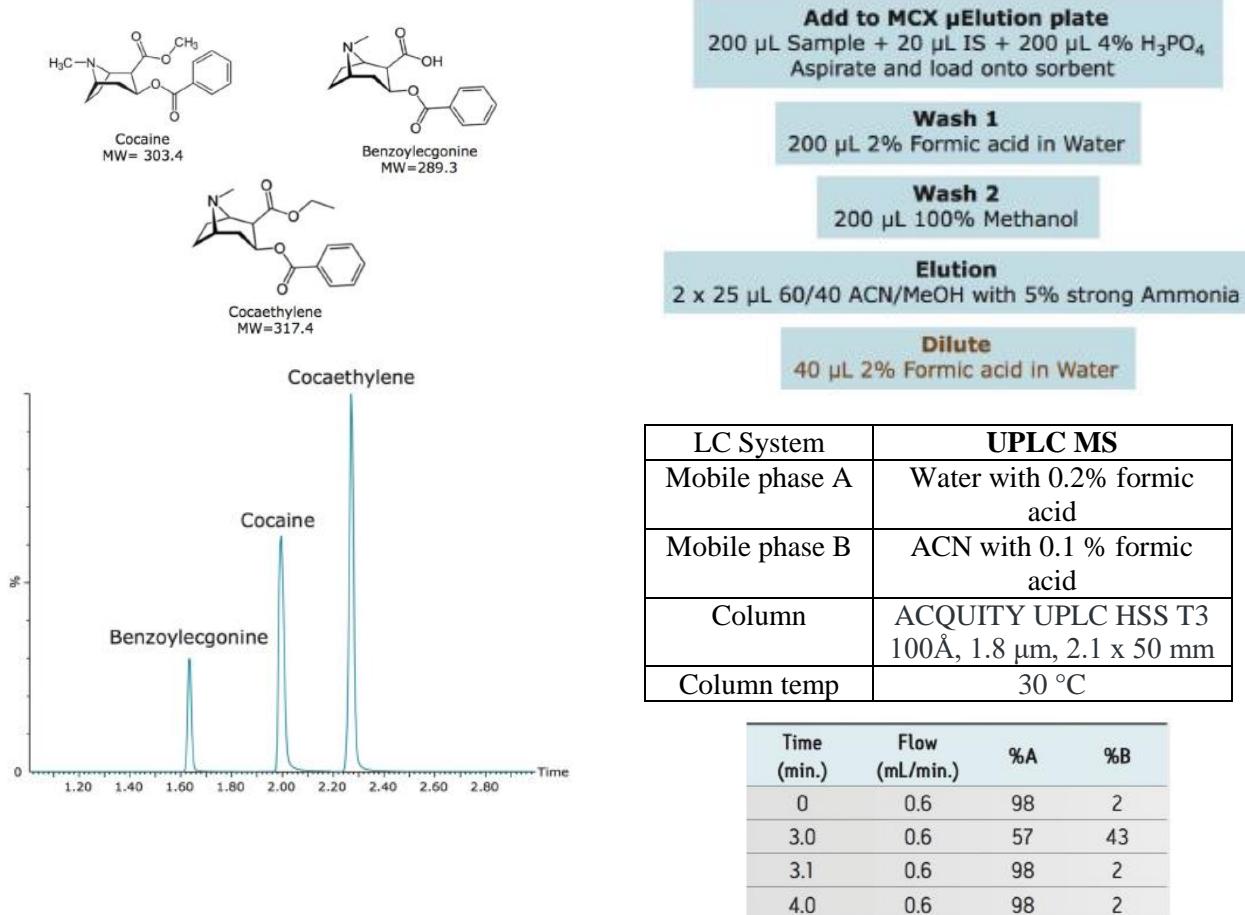
- Reproductibilité: Variabilité des cartouches
- Adsorption irréversible de certains analytes

III.12 Applications

Support	Applications [24].
C18	Isolement d'espèces hydrophobes en solution, telles que des drogues dans le sérum, le plasma et l'urine, ainsi que l'élimination de sels dans les peptides, d'acides organiques dans le vin, et de pesticides dans l'eau, par le biais d'une des phases les plus hydrophobes en phase inverse, permettant l'enrichissement de traces.
Copolymère styrène-divinylbenzène	Enrichissement des traces de pesticides polaires dans l'eau et isolation de métabolites de médicaments de nature polaire.
C8	Utilisation d'une phase inverse hydrophobe pour isoler des composés hydrophobes à partir de solutions aqueuses, tels que des médicaments présents dans le sérum, le plasma et l'urine, ainsi que des peptides sériques et plasmatiques.
Silice	Utilisation d'une phase normale polaire neutre pour isoler des composés de polarité faible à modérée à partir de solutions aqueuses, effectuer la classification des lipides, la séparation des pigments des plantes, ainsi que l'extraction de pesticides du sol et de résidus alimentaires.
Florisil	Utilisation d'une phase normale basique légèrement polaire pour isoler des composés de polarité modérée à partir de solutions aqueuses, tels que les pesticides alimentaires, les biphenyles polychlorés dans les huiles, ainsi que les pesticides extraits du sol et les résidus alimentaires.
Alumine	Utilisation d'une phase normale polaire acide pour isoler des composés hydrophiles à partir de solutions aqueuses, impliquant des échangeurs d'ions de basse capacité, tels que le sucre et la caféine dans des boissons, ainsi que des additifs alimentaires.
Échangeur de cations	Utilisation d'une phase échangeur de cations pour isoler des analytes cationiques en solution aqueuse et non aqueuse, ainsi que pour le fractionnement de protéines faiblement basiques et d'enzymes.

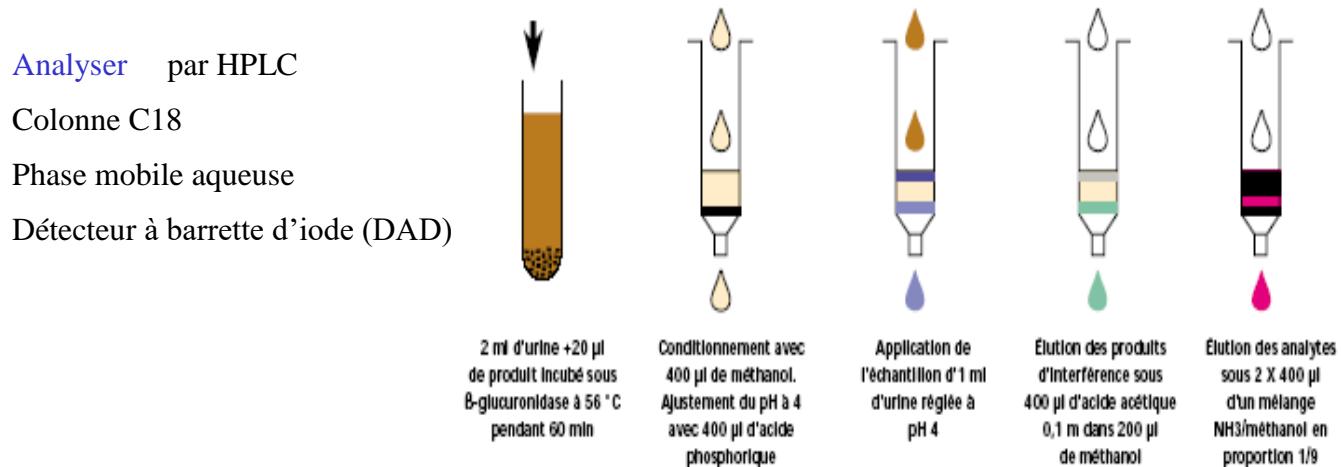
Échangeur d'anions	Utilisation d'une phase échangeur d'anions pour isoler des analytes anioniques en solution aqueuse et non aqueuse, extraire des protéines acides et faiblement acides ainsi que des enzymes, enlever des pigments acides de vins, de jus de fruit et d'extraits alimentaires, et éliminer de l'acide organique présent dans l'eau.
Mode mixte	Utilisation conjointe de phases inverse et échangeuse de cations pour isoler des médicaments basiques et amphotères à partir du sérum, du plasma et de l'urine.
Aminopropyl, NH₂	Utilisation de phases normale, inverse et d'un faible échangeur de cations pour l'isolement de médicaments et de métabolites à partir de fluides biologiques, ainsi que pour le fractionnement de pétrole, d'huile, de phénols et de pigments végétaux.
Cyanopropyl, CN	Utilisation de phases normale et inverse pour l'analyse d'analytes dans des solvants à la fois aqueux et organiques.
Diol, OH	Utilisation de phases normale et inverse pour l'analyse d'analytes en solution aqueuse et organique, notamment de médicaments et de métabolites présents dans des fluides biologiques.

Extraction de la cocaïne et ses métabolites du sérum

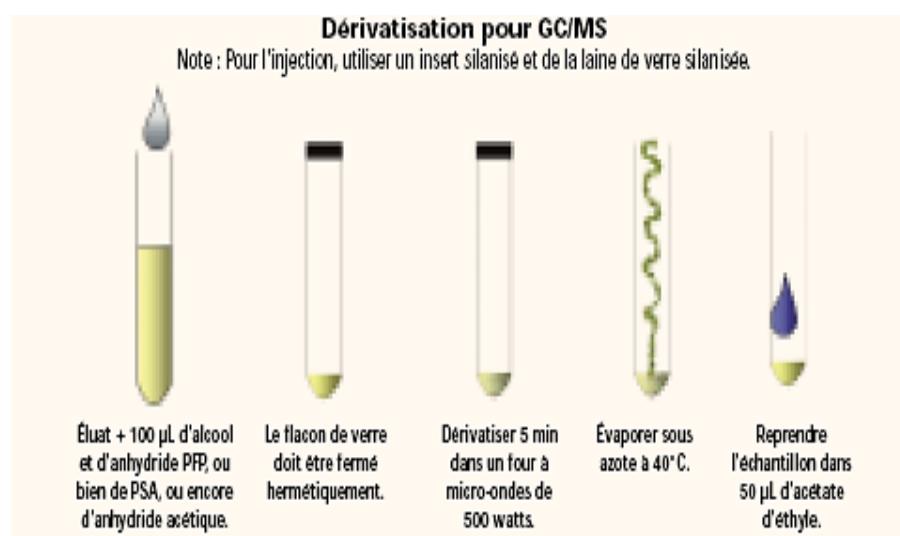


Extraction des produits dopants de l'urine

- Cartouche** Silice greffée C18 + échangeur de cations
- Conditionnement :** 400 µL de méthanol ajustement à pH=4 avec 400 µL de H₃PO₄
- Ajouter l'échantillon :** 1ml d'urine traitée réglé à pH=4 (au préalable 2ml d'urine + 20 µL de produit incubé sous β-glucuronidase à 56°C durant 1h)
- Lavage :** 400 µL d'acide acétique 0,1ml dans 200 µL de méthanol
- Élution:** 2 x 400 µL du mélange NH₃ + CH₃OH (1/9)

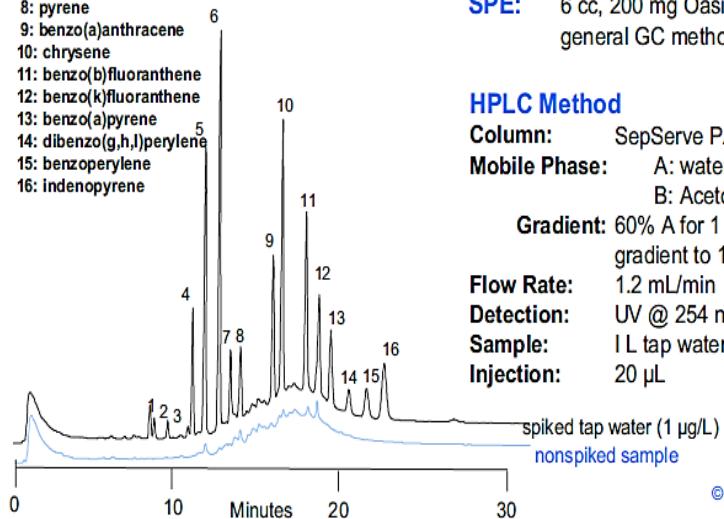


⊕ Par GC/MS il faut une dérivatisation de l'extrait par 100 µL d'alcool et d'anhydride acétique



Extraction des HPA dans l'eau potable

1: naphthalene
 2: acenaphthylene
 3: acenaphthene
 4: fluorene
 5: phenanthrene
 6: anthracene
 7: fluoranthene
 8: pyrene
 9: benzo(a)anthracene
 10: chrysene
 11: benzo(b)fluoranthene
 12: benzo(k)fluoranthene
 13: benzo(a)pyrene
 14: dibenzo(g,h,i)perylene
 15: benzopyrylene
 16: indenopyrene



Sample: 1L tap water spiked with
16 PAH compounds

SPE: 6 cc, 200 mg Oasis® HLB
general GC method, DCM elution

HPLC Method

Column: SepServe PAH, 125 x 4.6 mm

Mobile Phase: A: water
B: Acetonitrile

Gradient: 60% A for 1 min, then linear gradient to 100% B in 15 min

Flow Rate: 1.2 mL/min

Detection: UV @ 254 nm (0.02 AUFS)

Sample: 1L tap water spiked @ 1µg/L

Injection: 20 µL

© 1998 Waters Corp.

Extraction des acides gras

Estérification : 250 mg à 500 mg d'échantillon dans un tube ajouter 5ml de solution aqueuse à pH=2,5 avec l'acide acétique (conc)

Cartouche Silice greffée C18

Conditionnement : 10 ml Méthanol

Ajout échantillon : introduire l'échantillon estérifié

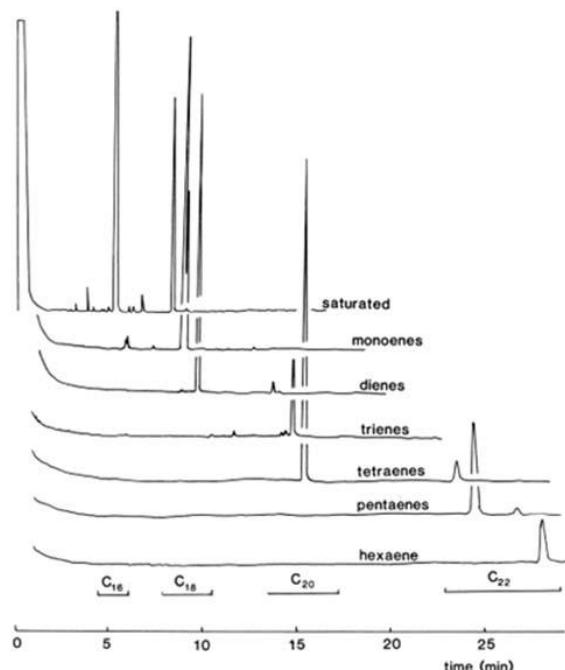
Lavage 2x5 ml de solution aqueuse acidifiée
à pH=2,5 avec HCOOH(c) puis 2x5 ml d'eau

Laisser sécher la cartouche

Élution : 5 ml Méthanol/Chloroforme (1/1)

Éliminer le solvant au rotavapor

Analyse par CPG



Partie IV : Microextraction en Phase Solide (SPME)

VI.1 Définition

La microextraction en phase solide (SPME) constitue une méthode de concentration respectueuse de l'environnement pour les molécules organiques, qu'elles soient polaires, volatiles ou non, présentes à l'état de traces dans des échantillons aqueux ou gazeux. Contrairement aux approches conventionnelles, la SPME n'utilise aucun solvant, préservant ainsi la structure des échantillons [25].

L'extraction se fait par adsorption sur une fibre de silice revêtue d'un polymère, similaire à la chromatographie d'adsorption, atteignant un équilibre entre la matrice et le polymère de la fibre plutôt qu'une extraction totale du composé. En couplant la SPME à des techniques chromatographiques, il devient possible d'exploiter quantitativement le processus [26].

VI.2 Principe de la SPME

Le principe de la SPME repose sur la répartition des composés entre la matrice de l'échantillon et une phase polymérique spécifique sur une fibre de silice. Cela génère un équilibre thermodynamique entre les analytes adsorbés sur la fibre et ceux présents dans l'échantillon, utilisant la capacité d'adsorption d'une fibre polymère pour extraire les analytes de la matrice résiduelle [25, 26].

VI.3 Appareillage

En ce qui concerne l'appareillage, la SPME, développée par Pawliszyn en 1980 à l'Université de Waterloo au Canada et commercialisée par Supelco en 1993, ne nécessite pas d'équipement complexe. L'instrumentation se compose d'une fibre capillaire en silice revêtue d'un film polymère, fixée à un piston en acier inoxydable glissant dans un corps cylindrique. L'ensemble fibre et piston peut se déplacer à l'intérieur d'une aiguille métallique grâce à un poussoir, formant schématiquement un dispositif semblable à un stylo à bille rétractable (Figure IV.1) [27].

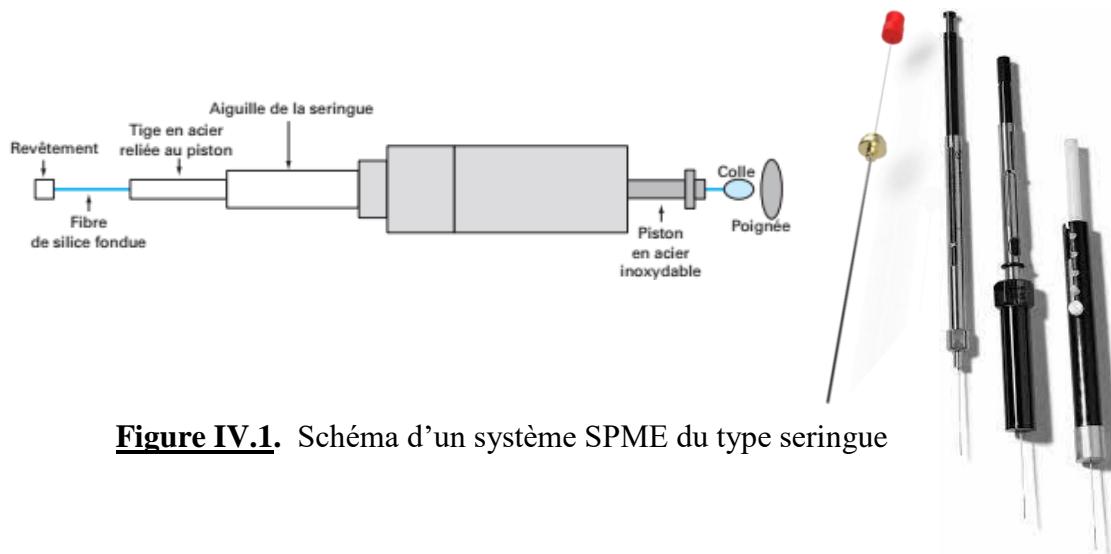


Figure IV.1. Schéma d'un système SPME du type seringue

VI.3.1 Étude du revêtement des fibres SPME

La fibre de silice fondue est revêtue d'une phase polymérique, également appelée revêtement, et la répartition de l'échantillon se fait entre ce revêtement et la matrice (ou son espace de tête). Ce revêtement peut être constitué d'un liquide (polymère), d'une substance solide (adsorbant) ou d'une combinaison des deux. Sous certaines conditions, une corrélation peut être établie entre la quantité de substance adsorbée sur le revêtement de la fibre et sa concentration dans la matrice (Figure IV.2) [29].

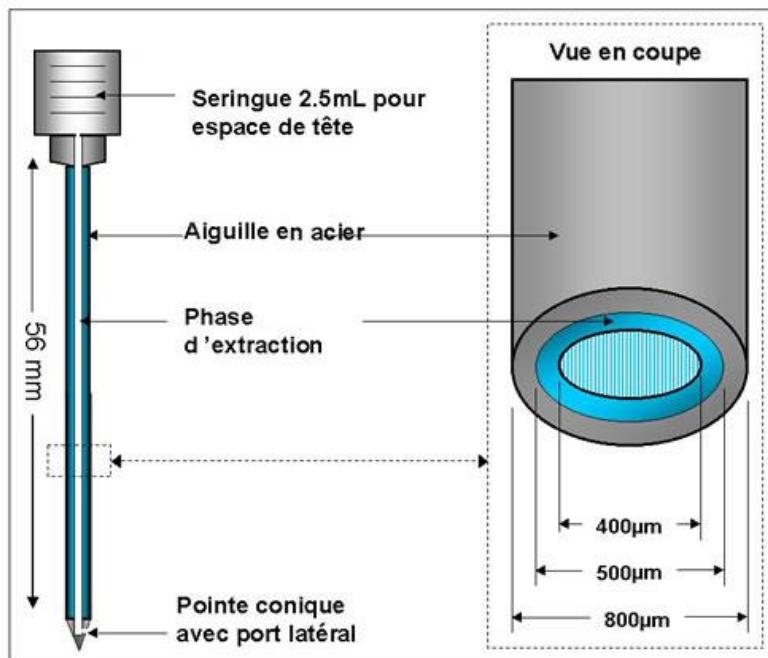


Figure IV.2. Coupe verticale de la fibre SPME.

Trois catégories de revêtements sont distinguées :

- ❖ Les **polymères liquides**, tels que le poly(diméthylsiloxane) (PDMS), un liquide très visqueux, ou le polyacrylate (PA), où l'échantillon se partage entre le polymère et la matrice.

- ⊕ Les **polymères poreux**, comme le divinylbenzène (DVB), associé au PDMS ou au Carbowax®. Pour ce groupe, une isotherme d'adsorption peut être décrite par la loi de Langmuir si les concentrations des composés dans les deux phases restent faibles.
- ⊕ Les **polymères très poreux** du type Carboxen®, caractérisés par une capacité de rétention est très élevée. À la surface de l'adsorbant se forment plusieurs couches de composés, entraînant des isothermes non linéaires, ce qui indique que le rapport des concentrations n'est plus constant [29].

VI.3.1.1 Nature du revêtement

En ce qui concerne la nature du revêtement, de nombreuses fibres sont disponibles sur le marché. La plus courante, revêtue de poly(diméthylsiloxane) (PDMS) (voir Tableau IV.1), est un liquide très visqueux présentant une excellente stabilité thermique jusqu'à 300 °C et une durée de vie prolongée d'environ une centaine d'utilisations [29].

Tableau IV.1. Caractéristiques des revêtements disponibles

Nature du revêtement	Épaisseur (μm)	Polarité	Nature du composé	Température maximale de désorption	Phase	Application analytique
PDMS	30 et 100	Apolaire	Volatil (arômes, parfums, additifs alimentaires)	280 °C	Non-greffée	GC/HPLC
PDMS	7	Apolaire	Semi-volatil à non volatil, substance non polaire M élevée	340 °C	Greffée	GC/HPLC
PDMS-DVB	65	Bipolaire	Polaire volatil	270 °C	Réticulée	GC /HPLC
Polyacrylate (PA)	85	Polaire	Polaire semi-volatil	320 °C	Réticulée	GC/HPLC
Carboxen®-PDMS	75	Bipolaire	Gaz et traces de composés volatils	320 °C	Réticulée	GC
Carbowax®-DVB	70	Polaire	Aromatique	260 °C	Réticulée	GC
DVB-PDMS-Carboxen®	50/30	Bipolaire	Volatil et semi-volatil	270 °C	Hautement réticulée	GC

Cependant, la sensibilité de la fibre de silice fondu est limitée pour les substances polaires et/ou peu volatiles. C'est pourquoi d'autres revêtements ont été développés, tels que les polyacrylates (PA) ou l'association de Carbowax® et de divinylbenzène (DVB). Dans ces combinaisons commerciales, les microsphères poreuses de DVB sont fixées sur le support par le Carbowax®.

Les revêtements comme le PDMS ou le PA extraient les composés par partage entre le polymère et la matrice, tandis que les mélanges de phases impliquent le phénomène d'adsorption. Dans le cas du mélange PDMS-Carboxen[®], l'adsorbant présente des petits pores responsables d'un criblage supplémentaire en fonction de la masse. Le Carboxen[®] est un carbone très poreux avec une surface spécifique de 1200 m²/g, permettant à la fibre de retenir fortement les composés de petite taille et d'atteindre une capacité élevée de traitement des échantillons [29].

VI.4 Les modes de dissolution sur la fibre SPME

En ce qui concerne les modes de dissolution sur la fibre SPME, le choix entre l'extraction directe et celle par l'intermédiaire de l'espace de tête dépend des caractéristiques physico-chimiques des composés à extraire et de la nature de la matrice. L'extraction directe est généralement plus sensible pour les matrices liquides, tandis que l'extraction à partir de l'espace de tête convient bien aux composés volatils extraits de matrices gazeuses, liquides ou solides. Les matrices complexes nécessitent l'utilisation de l'espace de tête ou la protection de la fibre par une membrane semi-perméable [30].

VI.4.1 Mode espace de tête (Head Space)

Dans le mode espace de tête, la fibre dissout les analytes d'intérêt dans la phase gazeuse au-dessus de la matrice. Ce mode est privilégié pour les composés **volatils** ou **semi-volatils**, offrant une protection contre les interférences de molécules de masse moléculaire élevée ou non volatiles, comme les protéines. Il permet également de modifier la matrice (pH) sans endommager la fibre (Figure IV.3) [30, 32].

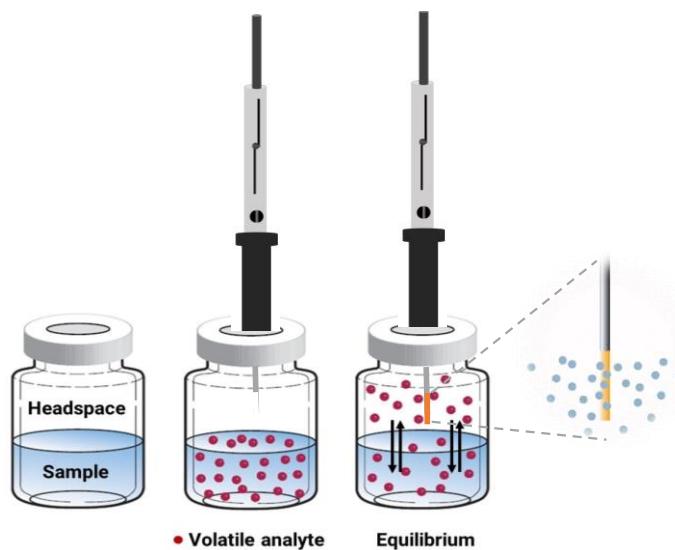


Figure IV.3. Mode espace de tête lors d'une extraction par SPME.

VI.4.2 Mode d'immersion

Dans le mode d'immersion, la fibre est plongée directement dans la matrice à analyser, avec une agitation par ultrasons recommandée avant l'extraction directe (Figure IV.4).

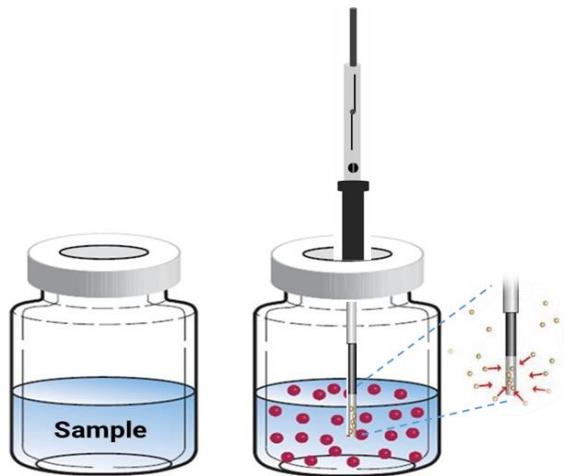


Figure IV.4. Mode d'immersion lors d'une extraction par SPME.

VI.5 Procédure d'extraction par SPME

La procédure d'extraction par SPME se déroule en deux étapes essentielles :

1^{ère} étape

Les solutés se concentrent dans la phase polymérique enrobant la fibre de verre de silice, protégée dans une aiguille creuse amovible. La fibre est ensuite déployée hors de l'aiguille dans le flacon étanche contenant l'échantillon.

2^{ème} étape

La deuxième étape consiste en la vaporisation des solutés dissous dans la phase stationnaire à travers l'injecteur CPG ou par rinçage avec un solvant spécifique en cas de couplage avec un chromatographe en phase liquide [26, 28, 30].

VI.5.1 Vaporisation des analytes cibles, dans le cas d'un couplage SPME/ CPG

En ce qui concerne la vaporisation des analytes cibles, dans le cas d'un couplage SPME/CPG, la désorption des molécules se fait thermiquement dans l'injecteur d'un chromatographe en phase gazeuse. Ce processus a été modélisé, étudiant l'influence de la nature et de l'épaisseur du polymère, de la durée de l'extraction, et des conditions de désorption. La fibre en silice recouverte du film polymère, protégée dans l'aiguille, est introduite dans un injecteur CPG chauffé.

Une fois dans l'injecteur, la fibre est déployée hors de l'aiguille protectrice, provoquant la vaporisation rapide des solutés dissous, qui sont ensuite transférés vers la colonne CPG (Figure IV.5).

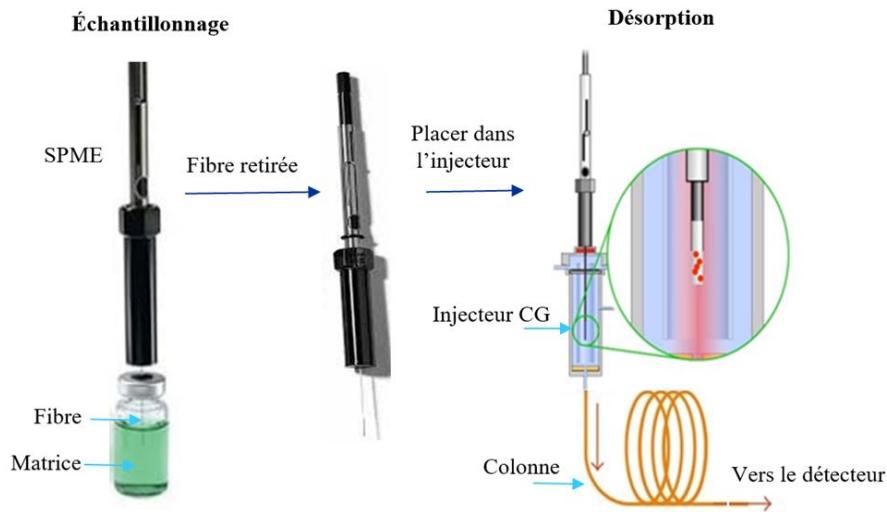


Figure IV.5. Vaporisation des analytes dans l'injecteur du CPG.

VI.5.2 Dissolution des analytes cibles, dans le cas d'un couplage SPME/ HPLC

La dissolution des analytes intervient par entraînement grâce à la phase mobile lorsqu'une analyse par chromatographie en phase liquide est effectuée. Pour extraire les composés d'intérêt de la fibre, un adaptateur est requis (Figure IV.6).

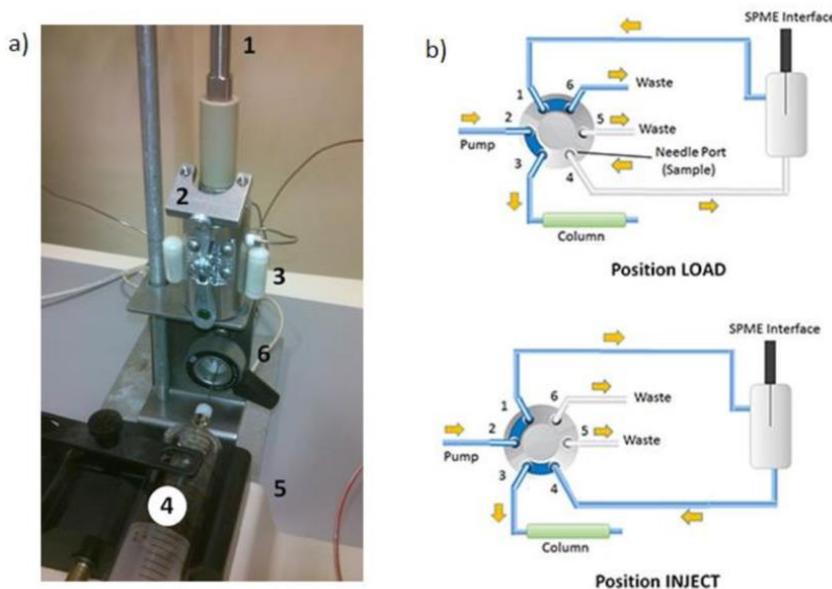


Figure IV.6. Adaptateur pour un couplage SPME/HPLC.

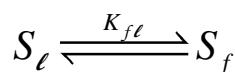
Une interface, composée d'une vanne d'injection à six voies et d'une chambre de dissolution, permet à la phase mobile d'entrer en contact avec la fibre SPME, d'y extraire les analytes dissous, puis de les transférer dans la colonne pour séparation.

VI.6 Aspect thermodynamique (étude de l'équilibre)

L'objectif de cette étude est d'établir une relation mathématique entre la quantité adsorbée sur le polymère et la concentration initiale du composé dans la matrice [29].

VI.6.1 Fibre en immersion dans une matrice homogène liquide

Prenons l'exemple d'une matrice liquide. La condition d'équilibre de la substance S avec les deux phases (égalité des potentiels chimiques) :



Cela implique la vérification de la relation :

$$\mathcal{K}_{f\ell} = \frac{C_f^\infty}{C_\ell^\infty} \quad (1)$$

avec :

$\mathcal{K}_{f\ell}$: coefficient de distribution de la substance S entre la matrice liquide et la fibre polymérique.

C_f^∞ : concentration de la substance S dans la fibre à l'équilibre.

C_ℓ^∞ : concentration de la substance S dans la matrice à l'équilibre.

V_ℓ : volume de la matrice liquide.

V_f : volume du revêtement de la fibre.

L'équation de conservation de la matière s'écrit :

$$C_0 V_\ell = C_f^\infty V_f + C_\ell^\infty V_\ell$$

C_0 : concentration initiale de la substance S.

Nous avons :

$$\mathcal{K}_{f\ell} = \frac{n_f / V_f}{n_\ell / V_\ell} \quad (2)$$

avec : $n_\ell = n_0 - n_f$

n_0 : nombre de moles initial de substance S dans la matrice,

n_f : nombre de moles de substance S adsorbée par le revêtement de la fibre à l'équilibre,

n_ℓ : nombre de moles initial de substance S dans la matrice à l'équilibre.

À partir de la relation (2), il est possible d'extraire n_f :

$$n_f = \frac{\mathcal{K}_{f\ell} V_f n_0}{\mathcal{K}_{f\ell} V_f + V_\ell}$$

Ou encore :

$$n_f = \frac{\mathcal{K}_{f\ell} V_f C_0 V_\ell}{\mathcal{K}_{f\ell} V_f + V_\ell} \quad (3)$$

Si $\mathcal{K}_{f\ell} V_f$ est négligeable devant V_ℓ , l'équation (3) devient :

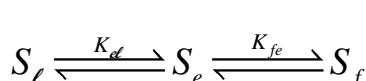
$$n_f = \mathcal{K}_{f\ell} V_f C_0 \quad (4)$$

Cette condition est généralement satisfaite lorsque le volume de la matrice dépasse au moins 2 mL [27].

VI.6.2 Extraction à partir de l'espace de tête

L'utilisation de la technique de l'espace de tête permet de protéger la fibre et son revêtement contre l'interférence de molécules de masse moléculaire élevée ou non volatiles, comme les protéines. L'espace de tête permet également de modifier la matrice (pH) sans endommager la fibre. L'extraction des composés à partir de l'espace de tête introduit un équilibre supplémentaire [29].

Par exemple, avec une matrice liquide :



Avec les relations suivantes :

$$\mathcal{K}_{el} = C_e^\infty / C_\ell^\infty; \quad \mathcal{K}_{fe} = C_f^\infty / C_e^\infty; \quad \mathcal{K}_{f\ell} = \mathcal{K}_{el} \mathcal{K}_{fe} = C_f^\infty / C_\ell^\infty$$

avec

\mathcal{K}_{el} : coefficient de distribution entre la matrice liquide et l'espace de tête,

\mathcal{K}_{fe} : coefficient de distribution entre l'espace de tête et le revêtement de la fibre,

C_e^∞ : concentration de la substance S dans l'espace de tête à l'équilibre.

C_f^∞ : concentration de la substance S dans la fibre à l'équilibre.



C^∞_ℓ : concentration de la substance S dans la matrice à l'équilibre.

On a également :

$$C_0 V_\ell = C_f^\infty V_f + C_\ell^\infty V_\ell + C_e^\infty V_e$$

On suppose les concentrations suffisamment faibles pour confondre activités et concentrations. Selon le même raisonnement que précédemment, on peut exprimer le nombre de moles adsorbées sur la fibre en fonction des constantes d'équilibre [29]:

$$n_f = \frac{C_0 V_f V_\ell K_{f\ell}}{K_{f\ell} V_f + K_{e\ell} V_e + V_\ell}$$

VI.7 Amélioration du rendement d'extraction pour une analyse par SPME

L'efficacité de la technique SPME repose principalement sur la capacité à concentrer les analytes sur la fibre. Chaque phase présente une spécificité pour une classe de composés donnée. La distribution des composés entre la matrice de l'échantillon, l'espace de tête et la fibre dépend de divers paramètres physico-chimiques, parmi lesquels les plus significatifs sont :

VI.7.1 La température

L'augmentation de la température favorise la vaporisation des composés de la matrice vers l'espace de tête. Cependant, cette augmentation induit une diminution de la constante d'équilibre entre l'espace de tête et le polymère, maintenant les composés plus fréquemment dans l'espace de tête.

VI.7.2 Le pH

Le pH doit être ajusté pour obtenir les composés sous leur forme neutre, évitant les valeurs extrêmes (<2 ou >10) susceptibles d'endommager la fibre en silice fondu.

VI.7.3 La force ionique

La présence de sels dans l'échantillon augmente le rendement d'extraction, surtout pour les composés hydrophiles, réduisant leur solubilité dans la phase aqueuse. Une solution saline améliore le rendement jusqu'à un facteur de 5.

VI.7.4 Le temps de contact entre la fibre et la matrice

La sensibilité de la méthode dépend du rendement, influencé par la nature du composé, sa solubilité dans l'eau, et son affinité pour le polymère. Ce temps peut varier d'une minute à quatre heures (Figure IV.7).

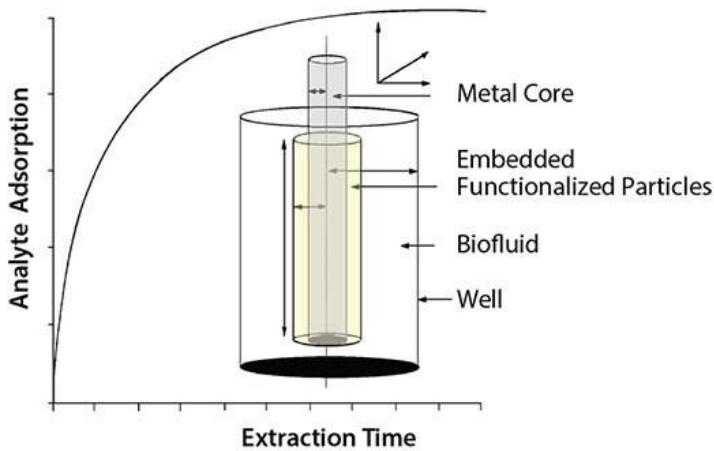


Figure IV.7. Représentation du profil d'extraction en fonction du temps

Le temps d'extraction dépend du niveau d'agitation, du coefficient de distribution du composé entre le revêtement et l'échantillon et de l'épaisseur de la phase polymérique. Le temps d'extraction des composés les moins volatils peut être réduit significativement par agitation de la phase aqueuse, par réduction du volume de l'espace de tête et par augmentation de la température [25, 30, 33].

VI.7.5 L'agitation

Pour améliorer le rendement et réduire le temps d'analyse, l'échantillon doit être agité, favorisant l'équilibre thermodynamique rapidement.

Si l'agitation est parfaite, il est possible d'obtenir l'équilibre après un temps t_e proportionnel au carré de la distance de migration et inversement proportionnel au coefficient de diffusion de l'échantillon dans le polymère :

$$t_e = 0.5(b-a)^2/D_f$$

Avec : D_f : coefficient de diffusion de l'échantillon dans le polymère

a : rayon interne de la fibre de silice

b : rayon total fibre et revêtement

Le temps d'extraction augmente avec l'épaisseur du polymère ($b - a$) et également avec la réticulation de la phase (Figure IV.8) [29].

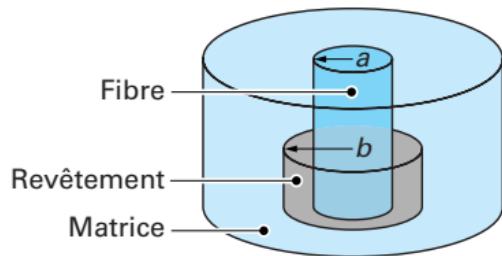


Figure IV.8. Représentation du système SPME lors d'extraction par immersion de la fibre dans une matrice liquide

VI.7.6 La nature de la phase polymérique appliquée sur la fibre

Le choix du polymère dépend de la nature du composé, de sa polarité et de sa volatilité. Il permet donc de sélectionner la nature de l'analyte.

VI.7.7 Le temps de vaporisation des analytes cibles

L'efficacité de la désorption dépend de la volatilité des substances, de l'épaisseur du polymère, de la température de l'injecteur et du temps d'exposition de la fibre et du débit du gaz vecteur.

En CPG, la température optimale de désorption est choisie égale ou supérieure au point d'ébullition du composé le moins volatil tout en respectant l'intégrité de la fibre. En HPLC, pour les analytes fortement absorbés, il faut mettre la fibre en contact avec la phase mobile pendant un temps donné (plusieurs lavages).

VI.8 Les avantages

- ✓ Rapidité.
- ✓ Quantité d'échantillon minimale.
- ✓ Pas de solvant.
- ✓ Simplicité de mise en œuvre.
- ✓ Sélective en fonction de la nature de la fibre (analyte) et de son diamètre (masse molaire).
- ✓ Réutilisation de la fibre plusieurs fois.
- ✓ Analyse qualitative et quantitative [33].

VI.9 Les applications en SPME

- ⊕ Les saveurs, Arômes volatils
- ⊕ Les parfums,
- ⊕ Les médecines légales,

- La toxicologie,
- Les matrices environnementales,
- Les matrices biologiques,
- Les sciences forensiques,
- Les drogues,
- Les explosifs,
- Les pesticides,

VI.9.1 Exemple d'application

➤ Analyse des drogues [34]

Conditions

Echantillon : 0.5 mL urine (250 ng de chaque analyte, 20 μ L 2.5% NaF) dans 1mL préparé dans une vial

Fibre SPME : polydimethylsiloxane, 100 μ m film

Mode d'extraction: immersion, 30 min

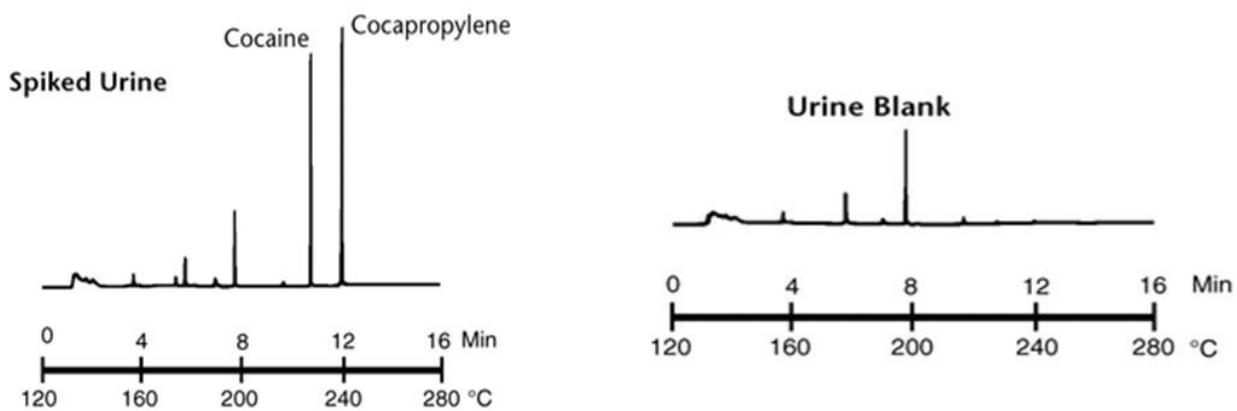
Désorption: 3 min, 240°C

Colonne: poly(diméthylsiloxane), 30m x 0.32 mm ID, 0.25 μ m film (équivalente de SPB-1 phase, programmation de Température : 120°C à 280°C at 10°C/min

Gaz vecteur: hélium, 3mL/min

Détecteur : NPD, 280°C

Injecteur : splitless (fermé pdt 1 min), 240°C



➤ **Amphétamines dans l'urine [35]**

Conditions

Échantillon : 1 ml de l'urine + 0.7g K₂CO₃ dans 20 ml
Équilibré à 80 °C, 30 min

Fibre SPME : polydiméthylsiloxane, film de 100 µm

Mode d'extraction : espace de tête, 3-5 min, 80 °C

Dérivatisation : méthyl bis-trifluoroacétamide (HS, 0,5 min, ambiant)

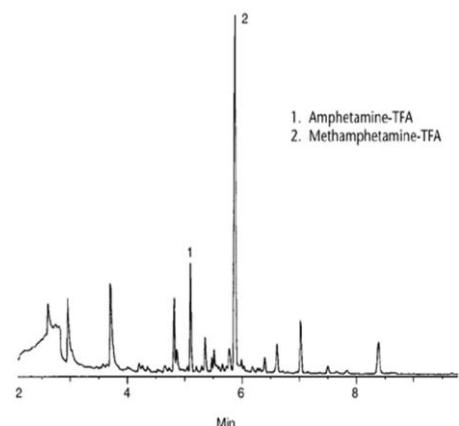
Désorption : 1 min, 270 °C

Colonne : diméthylsiloxane, 12,5 m x 0,2 mm ID, film de 0,033 µm

Four : 60 °C (1 min) à 140 °C (4 min) à 30 °C/min, puis à 276 °C à 20 °C/min, 4 min

Détecteur : MS, full scan

Injecteur : Splitless (fermé pendant 1 min), 270 °C



➤ **Analyse des Pesticides POP's dans les légumes**

Conditions

- Ajouter 15 ml d'eau pure à 0,5g de thé

- Placé le récipient fermé pendant 10 mn dans le micro-onde à 80% de sa puissance

- Revenir à température ambiante

- Transférer dans un vial

- Extraction SPME

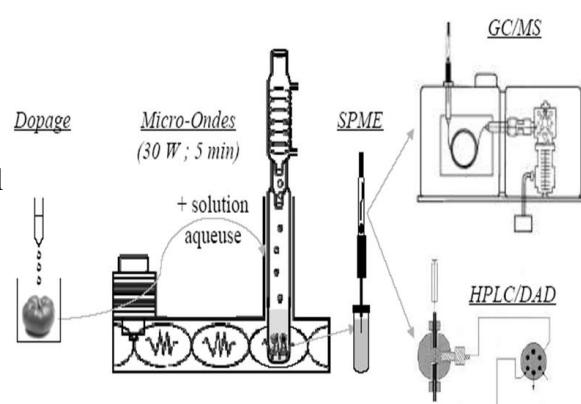
- HS/SPME : 40 mn à 90°C en présence de NaCl

- Immersion/SPME : 40 mn à 60°C

3 fibres testées : PPMS 70 micromètres

PMS 75 micromètres

PDMS 100 micromètres



Conditions

Échantillon : 200 ppt de chaque analyte dans 2 ml de l'eau

Fibre SPME : polydimethylsiloxane, 100 µm film

Extraction : immersion, 15 min (agitation rapide)

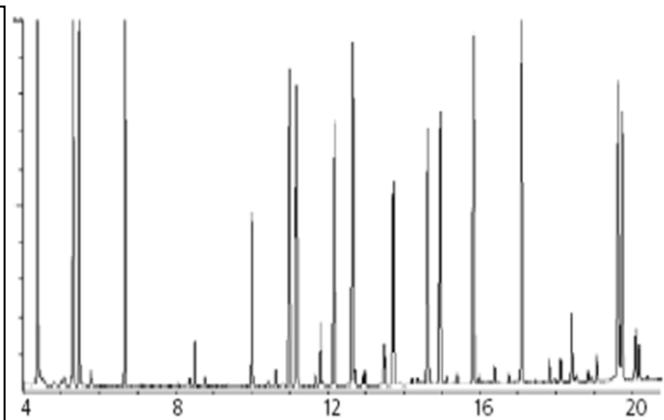
Colonne : SPB-5, 15m x 0.20 mm ID, 0.20µm film

Four : 120°C (1 min) to 180°C at 30°C/min, puis à 290°C pdt 10°C/min

Gaz vecteur : helium, 37cm/sec (fixé à 120°C)

Détecteur : ECD, 300°C

Injecteur : splitless (fermé 3 min), 260°C



TRAVAUX DIRIGÉS

CHAPITRE 1

TD N°1 : EXTRACTION LIQUIDE– LIQUIDE

Exercice 1 : Extraction de l'acide benzoïque

L'acide benzoïque (C_6H_5-COOH) est un conservateur utilisé comme additif dans les médicaments. Il est soluble dans des solvants moins polaires que l'eau, tels que le dichlorométhane. Dans cet exercice, nous cherchons à extraire l'acide benzoïque à partir d'une solution aqueuse saturée dans une ampoule à décanter en présence d'un solvant organique non miscible à l'eau. L'acide est transféré dans ce solvant, puis récupéré après élimination du solvant.

A. Dosage de la solution saturée initiale S_0

Nous dosons un échantillon de volume $V_0 = 20 \text{ mL}$ de la solution S_0 avec une solution d'hydroxyde de sodium de concentration molaire $C_b=2 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$. Un indicateur coloré permet de déterminer l'équivalence. À cet instant, tout l'acide benzoïque présent dans l'échantillon a réagi avec un volume $V_b=22,8 \text{ mL}$ de solution d'hydroxyde de sodium.

L'équation de la réaction de dosage est : $C_6H_5COOH + HO^- \rightleftharpoons C_6H_5COO^- + H_2O$

1)- Calculez la quantité q_0 d'acide benzoïque contenu dans l'échantillon dosé.

B. Extraction simple

Dans une ampoule à décanter, nous introduisons un volume $V_0' = 40,0 \text{ mL}$ de la solution S_0 . Nous ajoutons un volume $V = 10 \text{ mL}$ de dichlorométhane (densité : $d=1,33$). Après agitation et dégazage, nous recueillons un volume de $20,0 \text{ mL}$ de la phase aqueuse que nous dosons avec une solution d'hydroxyde de sodium de concentration molaire $C_b' = 2 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. Le volume de soude versé à l'équivalence est $V_b' = 18,1 \text{ mL}$.

1)- Situez les deux phases dans l'ampoule à décanter.

2)- Calculez la quantité q_{aq} d'acide restant dans la phase aqueuse. En déduire la quantité extraite q_{org} avec le solvant organique.

3)- Dans le cas d'une extraction liquide-liquide, le coefficient de partage K est défini comme le rapport des concentrations molaires d'un même constituant E dans deux phases aqueuse et organique non miscibles.

a)- Déterminez le coefficient de partage K .

b)- Calculez le rendement de l'extraction.

Exercice n° 2 : Dosage d'un médicament par extraction liquide-liquide

Pour quantifier le médicament X dans une solution à 45 mg/L, une méthode d'extraction liquide-liquide avec de l'acétate d'éthyle est utilisée. En extrayant 10 mL de solution avec 2 mL d'acétate d'éthyle et en considérant un coefficient de partition de 50, on calcule la quantité extraite de médicament X et le rendement de l'extraction.

1/ Quels sont les prérequis indispensables pour garantir une extraction efficace du médicament X par cette méthode ?

2/ Calculez la quantité de médicament X extraite ainsi que la quantité demeurant dans la phase aqueuse après l'extraction.

3/ Après cinq extractions successives avec 1 mL d'acétate d'éthyle, il est nécessaire de déterminer le pourcentage de médicament X restant dans la solution aqueuse.

4/ Déterminez le rendement de l'extraction en comparant la quantité de médicament X extraite avec la quantité totale initiale présente dans la solution injectable.

Exercice n° 3

Soit un acide faible AH, que l'on souhaite extraire via une extraction liquide/liquide grâce au chloroforme de formule CHCl_3 .

1/ À quel pH devra-t-on se placer afin d'avoir une extraction optimale ?

2/ Démontrer la formule du coefficient de partage conditionnel ou taux de distribution à partir du pK_a , de la concentration en H_3O^+ et des concentrations d'AH dans les phases aqueuse et organique.

3/ On prépare deux échantillons de 100 mL de solution aqueuse de concentration égale à 4,5 mg/L. En tamponnant à :

- pH=1, la solution étant extraite avec 50 mL de CHCl_3 , la phase aqueuse après extraction contient $5,35 \times 10^{-3}$ mg ;
- pH=4, la solution étant extraite avec 50 mL de CHCl_3 , la phase aqueuse après extraction contient $13,5 \times 10^{-3}$ mg.

- Calculer le coefficient de partage AH/ CHCl_3 et le K_a .

Exercice n° 4

On veut extraire une amine à partir d'une solution aqueuse acide initiale, par un solvant organique non miscible. Sachant que le coefficient de partage de l'amine entre eau et le solvant organique est $K= 25$ et son $pK_a=8$ (eau).

- 1- Dans quelles conditions de pH doit-on se placer et quel rapport de volume doit-on utiliser pour obtenir un rendement de 99% au cours d'une extraction simple.
- 2- Quel serait le rendement si l'on opérait à un pH égal à 5 dans les conditions de volume déterminées en 1.

TD N°2 : EXTRACTION SOLIDE-LIQUIDE

Exercice n° 1

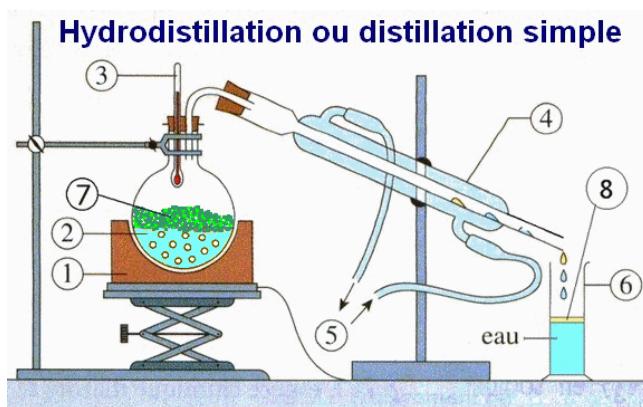
L'aspirine ou acide acétylsalicylique est peu soluble dans l'eau ; à 25 ° C, sa solubilité n'y est que de 3,4 g /L. Elle est en revanche très soluble dans l'éthanol ou dans l'éther éthylique. L'eau et l'éthanol sont miscibles en toutes proportions, alors que l'éther et l'eau sont non miscibles.

1. Une solution d'aspirine de volume $V = 200 \text{ mL}$ contient une masse $m = 0,52 \text{ g}$ d'aspirine. Est-elle saturée ?
2. On souhaite extraire cette aspirine soit avec de l'éthanol soit avec de l'éther éthylique. On dispose du matériel suivant : ampoule à décanter, entonnoir, bêchers, supports divers, noix de fixation, éprouvettes graduées, évaporateur à solvant.
- a). Lequel de ces deux solvants convient-il d'utiliser ? Justifier la réponse.
- b). Proposer un protocole permettant de réaliser cette extraction.
- c). Faire un schéma illustrant l'étape principale de l'extraction en précisant bien la position des diverses phases.

Exercice n° 2

La menthe poivrée a des propriétés anti-inflammatoires et antivirales, dues entre autres au menthol et à l'eucalyptol. On la trouve traditionnellement dans les pastilles contre le mal de gorge. L'huile essentielle est obtenue par hydrodistillation des feuilles de menthe poivrée.

- 1- légendier le montage ci-dessous.



On cherche à déterminer la composition de l'huile essentielle de menthe poivrée.

2. Quel est le rôle de la vapeur d'eau ? Celui du réfrigérant à eau ?
3. Représenter le contenu de l'érlenmeyer après l'hydrodistillation. Justifier.
4. Afin de récupérer l'huile essentielle du distillat, on effectue une extraction par solvant. On introduit dans une ampoule à décanter le distillat, 10,0 mL d'eau salée et 10,0 mL du solvant extracteur. On bouche, on agite, on dégaze et on laisse décanter.

Quel est l'intérêt d'ajouter de l'eau salée ?

5. A l'aide des données du tableau ci-dessous, quel solvant extracteur peut-on choisir ? Justifier.

6. Représenter l'ampoule à décanter après décantation. Légender en justifiant.

Données :

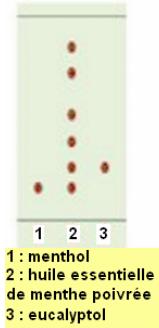
	Eau	Eau salée	Cyclohexane	Essence de menthe	Ether éthylique
Densité	1,00	1,13	0,78	0,89	0,71
Solubilité dans l'eau	X	X	Nulle	Faible	Nulle
Solubilité dans l'eau salée	X	X	Nulle	Très faible	Nulle
Solubilité dans l'éther éthylique	Nulle	Nulle	X	Elevée	X
Solubilité dans le cyclohexane	Nulle	Nulle	X	Très élevée	X

II- Analyse chromatographique

1)- Quel est le rôle de l'éluant ?

2)- Que représentent les traits situés en haut et en bas du chromatogramme ?

3)- Interpréter le chromatogramme obtenu.



Exercice n° 3 :

Le sucre vanillé est composé essentiellement de vanilline, d'acide vanillique et d'acide hydroxybenzoïque. On cherche à extraire la vanilline du sucre vanillé à l'aide d'un solvant approprié.

On dissout le contenu du sachet de sucre vanillé dans 100,0 mL d'eau distillée. On homogénéise le mélange. On introduit le mélange dans une ampoule à décanter puis on ajoute 20,0 mL du solvant choisi. Données :

	Dichlorométhane	Eau	Ethanol
Densité	1,33	1,00	0,80
Solubilité de la vanilline dans le solvant	Très bonne	Très faible	Très faible
Miscibilité avec l'eau	Nulle		Très bonne

1. A l'aide du tableau des données, indiquer le solvant le plus approprié pour effectuer l'extraction de la vanilline. Justifier.

2. Quelles sont les différentes étapes d'une extraction par solvant ?

3. Représenter l'ampoule à décanter après l'étape de décantation, légéner en justifiant.

Exercice n° 4 :

Les alcaloïdes sont des substances organiques, le plus souvent d'origine végétale, azotées, basiques, donnant des réactions de précipitations avec certains réactifs appelés réactifs généraux des alcaloïdes.

A- Dans cette expérience, on procède à une extraction de 100g des graines de la plante finement broyées. La poudre obtenue est dégraissée par 250 ml d'éther de pétrole par macération et sous agitation à température ambiante pendant 3 à 4 heures. Après filtration, le marc (graines moulues débarrassées de la matière grasse) est alcalinisé par une solution 40 ml d'ammoniaque (0.5N) pendant au moins 8 heures à température ambiante permettant ainsi aux alcaloïdes de passer de la forme sel à la forme organique.

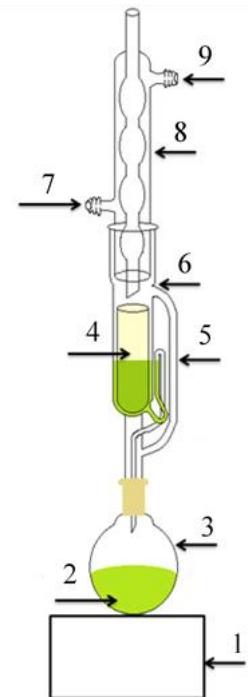
- 1 – De quel type d'extraction s'agit-il ? (dans la partie A)
- 2- Quel est le solvant d'extraction utilisé dans cette technique ?

B- La poudre des graines alcalisée est placée dans le Soxhlet fixée sur un ballon contenant 500 ml de dichlorométhane et est surmonté d'un réfrigérant. Le solvant est vaporisé puis condensé tout en restant en contact avec le matériel végétal. La solution collectée dans le ballon s'enrichit de plus en plus en soluté. Au moins 5 cycles sont nécessaires pour un épuisement total des graines.

- 1 – De quel type d'extraction s'agit-il ? (dans la partie B)
- 2- Quels sont les critères de choix de solvant d'extraction ?
- 3- Légender le schéma ci-contre en indiquant le rôle de l'élément 8.

C- A l'issue de cette opération, l'extrait brut est lavé trois fois successives par une solution de 150 ml d'acide sulfurique (0.5N) pour chaque volume, les trois fractions sont reprises dans une ampoule à décantation, alcalinisées jusqu'à pH 9 par ajout d'ammoniaque (0.5N). Nous épuisons ensuite trois fois la solution par 150 ml d'éther d'éthylique, en agitant doucement l'ampoule à décantation. Nous récupérons les trois fractions organiques dans un Erlenmeyer, qui seront déshydratées par filtration sur papier filtre contenant du sulfate de sodium anhydre.

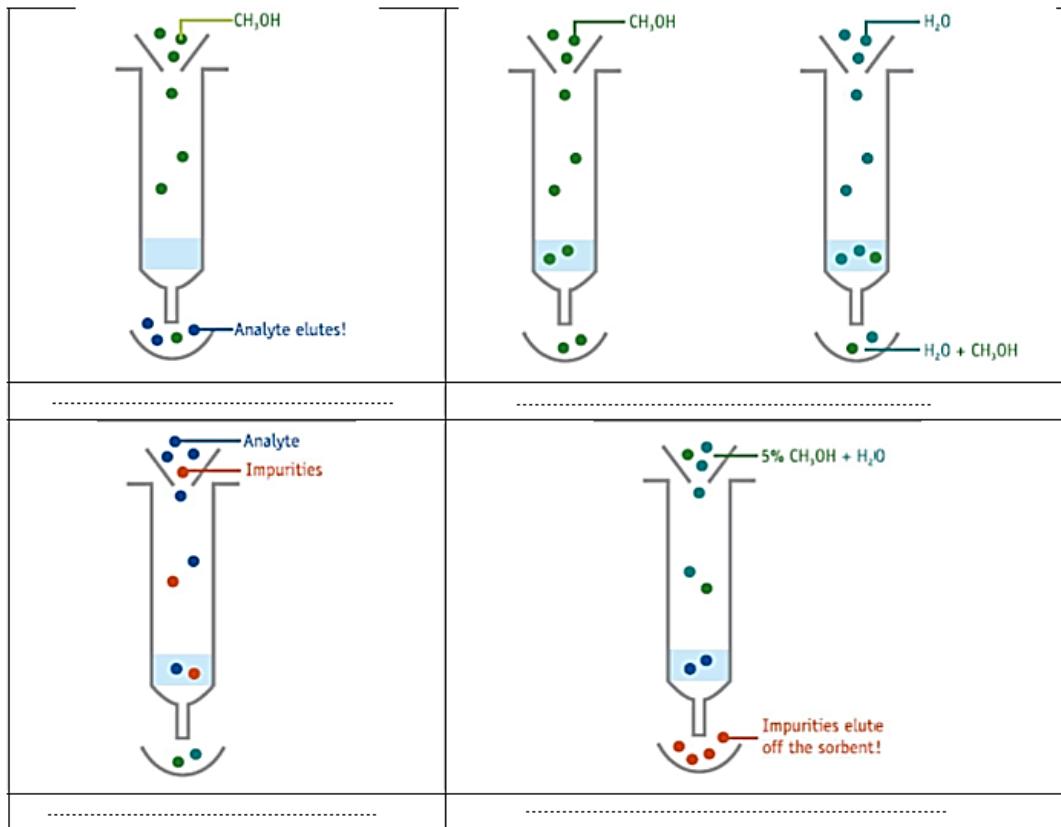
- 1 – De quel type d'extraction s'agit-il ? (dans la partie C)
- 2 – Quel est l'intérêt de l'ajout de sulfate de sodium anhydre ?
- 3 – Proposer une méthode convenable pour identifier les alcaloïdes dans l'extrait brut.
- 4 – Calculer le rendement de l'extraction sachant que la masse de la masse obtenue après le séchage est 0.45 g.



TD N°3 : Extraction En Phase Solide (SPE)

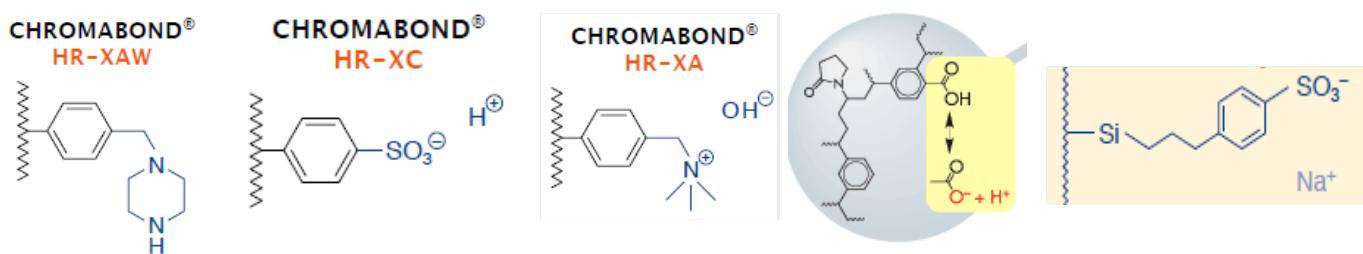
Exercice n° 1

- 1- Donner le principe de l'extraction en phase solide
- 2- Placer les étapes de la SPE en ordre chronologique et expliquer leur rôle dans la méthode.



Exercice n° 2

I- Les groupements fonctionnels suivants se trouvent dans les résines échangeuses d'ions commerciales



- a. Classer ces résines selon le type d'échange ionique
- b. Quel ion est échangé lors d'un échange ionique dans chaque cas ?
- c. Quelles résines pourraient être utilisées pour séparer R-NH₃⁺ et R-COO⁻ ?

II- On veut séparer 3 acides-aminés : l'acide L-glutamique, la L-leucine et la L-lysine par SPE sur une résine polystyrénique substituée par des groupements sulfonate (-SO₃⁻). Les pH isoélectriques de l'acide glutamique, de la leucine et de la lysine sont respectivement 3,22 ; 5,98 ;

9,74, à 25 °C. On dépose ces 3 acides aminés sur la cartouche, à pH 2, puis on élue en amenant progressivement le pH à 7.

1 – Quel est le phénomène mis en jeu au cours de la séparation ? Justifier.

2- Quels acides aminés sont élusés et dans quel ordre ? (On considérera que les interactions acide aminé-résine sont uniquement d'ordre électrostatiques).

Exercice n° 3

Vanderford et al. [Analytical Chemistry (2003) ont publié une méthode pour l'analyse de plusieurs perturbateurs endocriniens, pharmaceutiques et produits de soin personnel dans l'eau de surface. Voici un extrait de leur méthode d'extraction :

Extraction sur phase solide

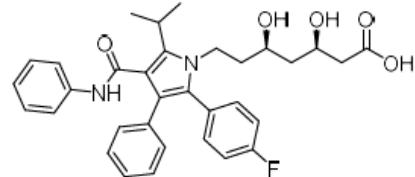
Les analytes ont été extraits par groupes de six échantillons en utilisant les cartouches de 500 mg de type HLB de Waters. Toutes les extractions sont effectuées sur un système SPE automatisée AutoTrace. Les cartouches SPE ont été pré-conditionnées séquentiellement avec 5 mL de MTBE, 5 mL de méthanol et 5 mL de l'eau. Des échantillons 1000 mL ont été dopés avec 20 µL d'une solution de 2.5 mg/L d'étalon de contrôle (caféine, atrazine, estradiol). L'échantillon a ensuite été introduit dans les cartouches à un débit de 15 mL/min. Ensuite, les cartouches ont été rincées avec 5 mL d'eau, puis séchées avec un courant d'azote pendant 60 min. Après, les cartouches ont été élues avec 5 mL d'un mélange méthanol/MTBE 10/90 (v/v) puis 5 mL de méthanol dans des tubes de centrifugation de 15 mL. L'extrait a été concentré avec un léger courant d'azote à un volume de 750 µL. Puis 20 µL d'une solution de 2.5 mg/L contenant les étalons internes (diazépam-d₅ et la testostérone-d₃) ont été ajoutés, et l'extrait a été porté à un volume final de 1 mL en utilisant du méthanol.

- 1- Que signifie l'abréviation HLB?
- 2- Comment la cartouche a-t-elle été préparée ?
- 3- Comment la cartouche a-t-elle été rincée ?
- 4- Comment les analytes ont-ils été élusés ?
- 5- D'après les notes de cours, de quel type de sorbant s'agit-il ?
- 6- Dans les notes de cours, nous avons vu comment l'antidépresseur fluoxétine (pKa de son acide conjugué est 8,7) peut être extrait des eaux environnementales avec une cartouche SCX de type acide sulfonique.
 - a) Expliquer la rétention de cette molécule en milieu acide (pH ≈ 3) avec la cartouche SCX.
 - b) Pourquoi peut-on faire un rinçage avec 4 mL de MeOH sans causer une élution des analytes?
 - c) Expliquer l'élution de cette molécule avec une solution basique (5% NH₃(aq)/MeOH) de pH ≈ 11.

Exercice n° 4

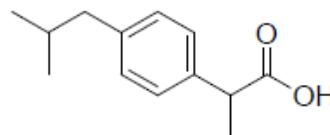
1- La compagnie Pfizer vous engage pour doser un de leurs produits, Lipitor (Atorvastatin), dans les eaux du fleuve St-Laurent. Proposez une méthode d'extraction SPE de cette molécule en vous basant sur les notes des cours.

Données : pKa: 4,6. Solubilité : méthanol, chloroforme, diméthylsulfoxyde , acétonitrile l'éthanol.

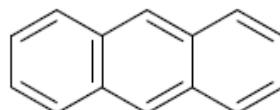


2- A l'aide du diagramme de choix de phase des notes de cours, choisir les modes de SPE qui pourraient être utilisés lors de l'extraction des composés suivants et expliquer votre choix.

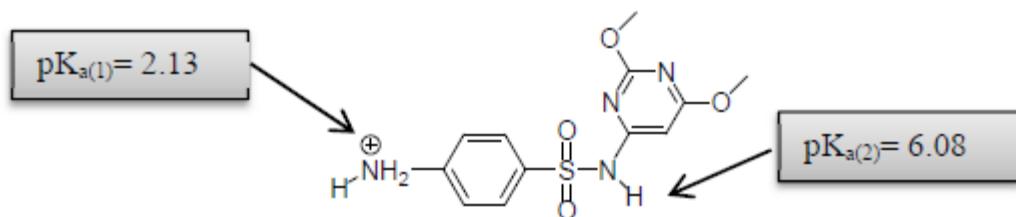
a. Ibuprofène (pKa=4.91) dans l'urine.



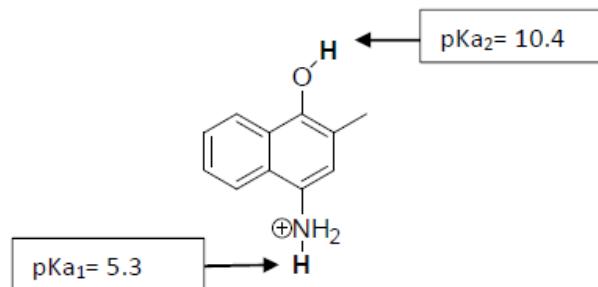
b. Anthracène dans un mélange hexane : dichlorométhane 1:1.



c. Sulfadiméthoxine (pK1=2.13 et pKa2=6.08) dans le plasma sanguin.



3- Le 4-Amino-2-méthyle-1-naphthol aussi connu comme vitamine K₅ est utilisé comme agent de préservation dans les aliments. Ce composé possède deux pKa :



Structure du 4-Amino-2-méthyle-1-naphthol

Parmi les modes d'extraction sur phase solide suivants : échange anionique, échange cationique, phase inverse et phase normale ; lesquels peuvent être utilisés pour extraire ce composé d'un jus de fruits ? Utiliser le diagramme de l'annexe pour justifier votre réponse.

TD N°4 : Microextraction en Phase Solide (SPME)

Exercice 1

La théorie de la microextraction en phase solide (SPME) a été largement développée par Pawliszyn et ses collaborateurs. Cette technique s'apparente à la chromatographie d'adsorption. La fibre de silice fondu est enrobée d'une phase adsorbante, appelée aussi revêtement, et l'échantillon se distribue entre celui-ci et la matrice (en mode d'immersion ou en espace de tête). L'objectif de cette étude est de trouver une relation mathématique entre la quantité adsorbée sur le polymère et la concentration initiale du composé dans la matrice.

- 1- Démontrer que le nombre de moles de substance S adsorbées par le revêtement de la fibre à l'équilibre en mode d'immersion est donné par la relation suivant :

$$n_f = \frac{K_{f\ell} V_f C_0 V_\ell}{K_{f\ell} V_f + V_\ell}$$

- 2- L'espace de tête permet de protéger la fibre et son revêtement de l'interférence de molécules de masse moléculaire élevée. Démontrer l'expression mathématique de suivante :

$$n_f = \frac{C_0 V_f V_\ell K_{f\ell}}{K_{f\ell} V_f + K_{e\ell} V_e + V_\ell}$$

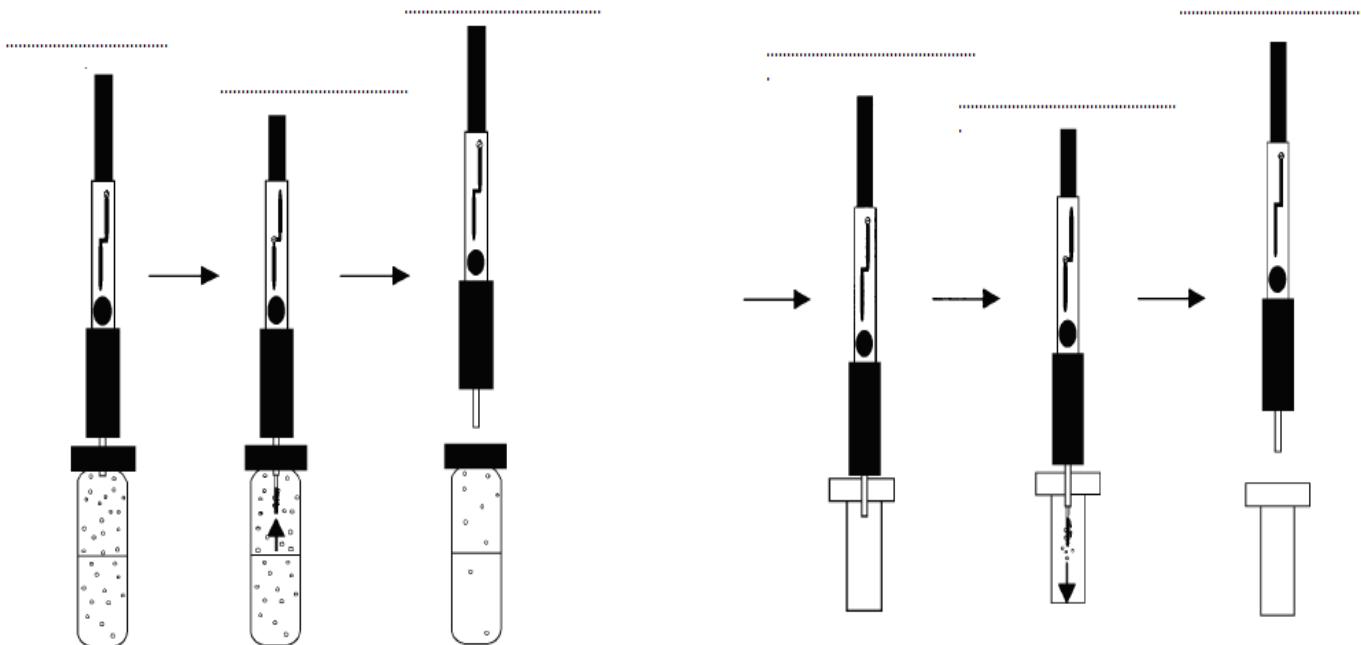
- 3- Compléter le schéma suivant en indiquant le mode et les étapes de la technique SPME.

Solid Phase Microextraction

Mode :

Etape 1:

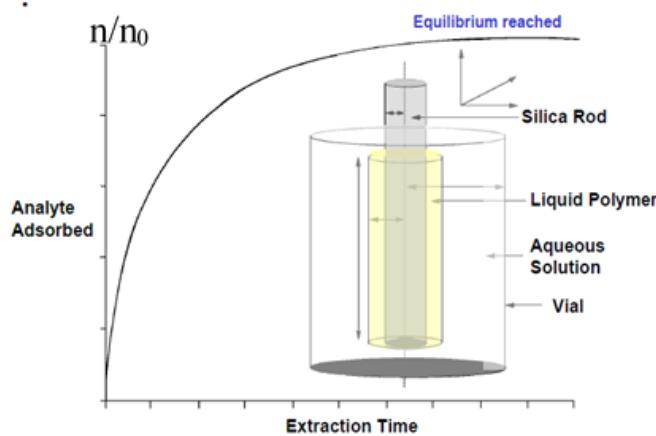
Etape 2:



Exercice 2

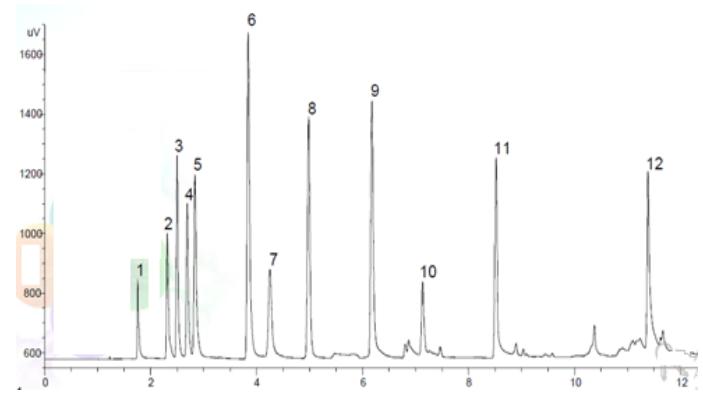
La SPME est une méthode d'extraction sans solvant qui respecte l'environnement et la structure des échantillons. Elle est automatisable, n'implique pas l'achat d'appareillage complexe, améliore les limites de détection et, suivant les applications, la fibre peut être réutilisée une centaine de fois. Elle est soit **introduite directement** dans l'échantillon s'il s'agit de liquide ou de gaz, soit **exposée à l'espace de tête** pour les échantillons liquides plus complexes.

- Expliquer le principe de la microextraction en se basant sur la courbe ci-après.
- Quels sont les principaux paramètres à optimiser pour toute analyse par SPME ?
- Quel est le mode d'extraction adéquat pour extraire les composés volatils ou semi-volatils.

**Exercice 3**

Nous voulons extraire des COVs dans l'eau de rivière près d'une zone industrielle en utilisant une technique de préconcentration adéquate.

Sample	Polar solvents in water with 25%NaCl
Fiber:	60µm PEG
Extraction:	10min, Direct Immersion with agitation (Varian 8200)
Desorption:	5min at 240°C
Injector:	Splitless/split, closed initial 0.75min than opened 50:1 with 0.75mm ID liner
Column:	SPB-1 Sulfur, 30m x 0.32mm, 4.0µm
Column oven:	45°C(1.5min) to 80°C at 8°C/min to 230°C at 20°C/min (10min)
Carrier gas:	He @t 13psi const. pressure, 40cm/sec at 40°C
Detector:	FID at 300°C



Méthanol ; Ethanol ; Acétonitrile ; Acétone ; Isopropanol ; *n*-Propanol ; MTBE. ; Acétate d'éthyle ; *n*-Butanol ; 1,4-Dioxane ; Acide Butyrique ; Phénol

- Quelle est cette technique ?
- Que signifie l'abréviation PEG et de quelle nature ?
- Quel est l'intérêt de rajouter NaCl dans la matrice liquide ?
- Attribuer chaque pic sur le chromatogramme aux solvants cités en haut.

Exercice 4

Le résvératrol, une phytoalexine naturelle produite par les raisins et d'autres plantes pour renforcer leur résistance aux infections fongiques, présente des avantages potentiels pour la santé humaine, notamment la réduction du risque de certains cancers, de maladies cardiaques et d'autres troubles liés au vieillissement. Le vin rouge, issu de la fermentation du jus avec les peaux de raisin, contient une concentration plus élevée de résvératrol que le vin blanc.

Cette étude démontre l'extraction et l'analyse du résvératrol à partir de vin rouge en utilisant la SPME et la CPG-SM. La dérivation du résvératrol est nécessaire avant l'analyse en raison de la présence de trois groupes hydroxyles. Cette dérivation a été réalisée directement sur la fibre SPME en exposant celle-ci aux vapeurs d'un agent de silylation. Les conditions d'extraction et de dérivation sont résumées dans le tableau 1, avec des ajustements apportés aux durées pour minimiser les interférences de l'échantillon de vin. Après extraction, la fibre SPME a été insérée dans un flacon contenant du réactif Sylon-BFT pour la dérivation. La fibre a été désorbée à 280 °C pendant 2 minutes directement dans l'injection du GC-MS.

La dérivation a permis de silyler les trois groupes hydroxyles présents dans le résvératrol, générant un dérivé avec un poids moléculaire de 444. L'analyse ultérieure par GC-MS a montré une prédominance de l'ion moléculaire utilisé pour la quantification. Des solutions étalons dans une plage de concentration de 10 à 300 µg/L ont été préparées pour l'étalonnage en utilisant du trans-resveratrol dissous dans une solution d'éthanol à 12% dans de l'eau. Le vin rouge (Merlot de Californie), dilué à 1:3 dans de l'éthanol à 12% dans l'eau, a été analysé à la fois "tel quel" et additionné d'un niveau connu de trans-résveratrol.

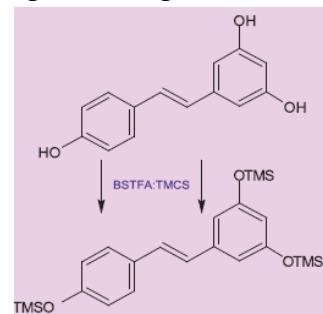


Table 1. SPME – On-Fiber Derivatization Conditions
sample/matrix: 3 mL of red wine (California merlot)
diluted 3:1 in 12% ethanol:water
SPME fiber: 85 µm polyacrylate
extraction: immersion at room temperature, 15 min.,
with stirring at 400 rpm
derivation: 20 min. in 4 mL vial containing
5 µL of Sylon-BFT
desorption: 280 °C, 2 minutes

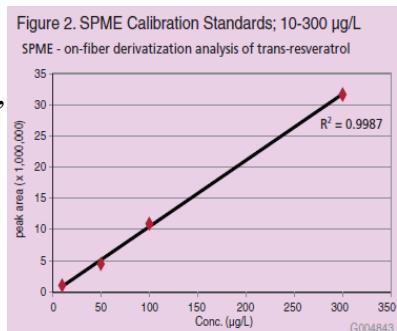
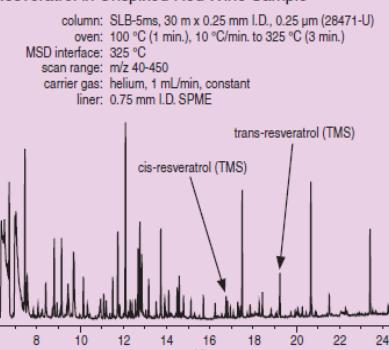


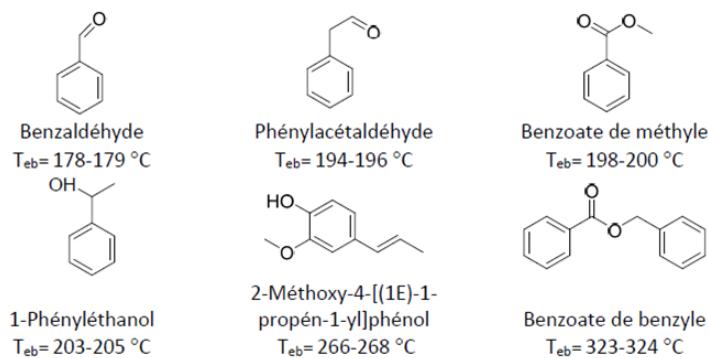
Figure 3. SPME On-Fiber Derivatization Analysis of Resveratrol in Unspiked Red Wine Sample



1. Quel procédé est utilisé pour extraire la résvératrol ?
2. Quel type de fibre est utilisé lors de l'étape d'extraction ?
3. Quel est le but de la courbe d'étalonnage dans cette expérience ?
4. Comment est quantifié le résvératrol dans le vin rouge ?
5. Pourquoi la dérivation est-elle effectuée avant l'étape de la SPME ?
6. Que peut-on déduire de la méthode d'extraction choisie à partir du chromatogramme de la figure 3 ?

Exercice 5

Les parfums intègrent des fragrances florales naturelles, dont la compréhension approfondie des composants est essentielle pour la fabrication de parfums synthétiques. L'analyse *in vivo* des fragrances émises par les fleurs revêt une importance particulière, car certaines plantes régulent le moment d'émission pour attirer des polliniseurs potentiels tout en préservant leur énergie. Une étude de 2003 menée par Verdonk et al. a examiné les composés volatils émis par les fleurs de pétunias (*Petunia hybrida*). Pour extraire ces fragrances, les fleurs ont été cultivées dans des serres avec un contrôle rigoureux de l'humidité, de la lumière et de la température. La microextraction sur phase solide (SPME), utilisant une fibre de silice fondue recouverte de polydiméthylsiloxane (PDMS) d'une épaisseur de 100 µm, a été employée pour extraire les substances volatiles de l'espace entourant *P. hybrida*. Les extractions par SPME ont été effectuées après une exposition variable à la lumière, suivies du retrait des fibres après 30 minutes.



Cette étude a révélé que les fleurs matures de *P. hybrida* émettent principalement des composés benzénoides. Les auteurs ont également observé un rythme d'émission de fragrances par *P. hybrida* sur une période de 24 heures, avec un pic atteint après le coucher du soleil. Ils ont conclu que les substances volatiles émises par *P. hybrida* ne sont pas stockées pendant la journée, mais sont plutôt produites de nouveau pendant les périodes d'émission.

- 1)- Expliquez brièvement le principe de fonctionnement de la SPME.
- 2)- Pourquoi l'entonnoir et le papier d'aluminium sont essentiels pour réaliser la SPME des composés volatils émis par les pétunias ? Expliquez.
- 3)- Quel est l'effet de la polarité du sorbant sur l'extraction ? Expliquez.
- 4)- Les auteurs ont utilisé des dispositifs de SPME ayant des fibres avec un enrobage de 100 µm d'épaisseur.
 - Quel serait l'effet l'utilisation des fibres ayant des enrobages d'épaisseur inférieure sur le temps de l'extraction et la sensibilité de l'analyse ? Expliquer

Chapitre 2

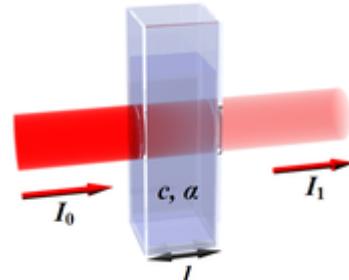
Méthodes d'Analyses Quantitatives

Partie I : Dosage Spectrophotométrique

I.1 Rappel sur la spectrométrie UV-visible

La spectrophotométrie, une méthode analytique quantitative, repose sur la mesure de l'absorbance d'une substance chimique en solution, directement liée à sa concentration selon la loi de Beer-Lambert. Cette relation linéaire entre l'absorption, la concentration et la longueur du trajet optique est fondamentale. Ainsi, l'utilisation d'un spectrophotomètre étalonné sur la longueur d'onde spécifique est cruciale. Lorsque la lumière monochromatique d'intensité I_0 traverse la solution dans une cuve, l'appareil mesure l'intensité I de la lumière transmise, et la valeur affichée correspond à l'absorbance à la longueur d'onde spécifique examinée [36].

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = \varepsilon \cdot c \cdot l$$



où : A : est l'absorbance de la solution, qui est sans unité.

ε : est le coefficient d'absorption molaire (ou coefficient d'extinction molaire) de la substance à une longueur d'onde spécifique, exprimé en $l.mol^{-1}.cm^{-1}$.

c : est la concentration de la substance en mol/l .

l : est la longueur du trajet optique à travers la solution, généralement exprimée en centimètres.

I.2 Principe du dosage spectrophotométrique

Le principe du dosage implique la mesure de l'absorbance de solutions étalons de concentrations connues à une longueur d'onde spécifique. Ces mesures permettent la création d'une courbe d'étalonnage, établissant une relation linéaire entre l'absorbance et la concentration. La pente de cette courbe représente le coefficient d'absorption molaire (ε).

I.3 Appareillage

Le spectrophotomètre UV-visible, outil essentiel, comprend une source lumineuse, un monochromateur, un compartiment d'échantillon avec une cuvette spéciale, un détecteur, un amplificateur et un convertisseur analogique-numérique (Figure I.1) [2].

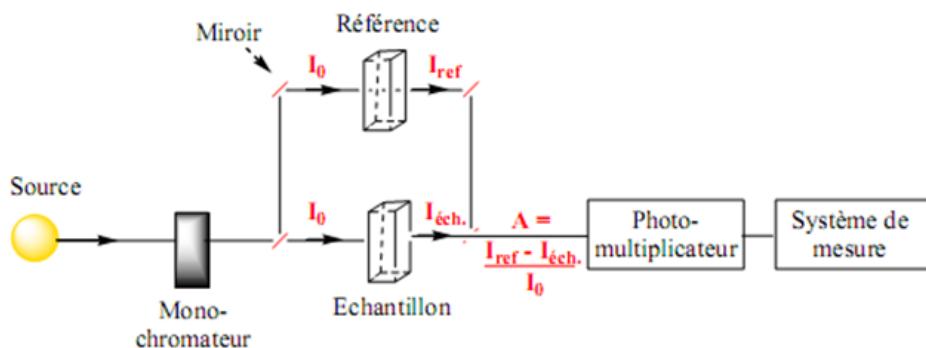


Figure I.1. Spectrophotomètre UV-visible.

- ❖ **Source de lumière :** Le spectrophotomètre UV-visible est équipé d'une source de lumière, généralement une lampe au deutérium pour la région UV et une lampe à cathode creuse ou une lampe à filament pour la région visible. Ces lampes émettent une lumière de différentes longueurs d'onde.
- ❖ **Monochromateur :** Le monochromateur est un dispositif optique qui permet de sélectionner une longueur d'onde spécifique de la lumière émise par la source. Il divise la lumière en différentes longueurs d'onde, permettant ainsi de choisir la longueur d'onde appropriée pour la mesure.
- ❖ **Échantillon :** Le compartiment d'échantillon est l'endroit où la solution contenant la substance à analyser est placée. Un compartiment de référence peut également être présent pour mesurer la référence ou la Baseline.
- ❖ **Cuvette :** L'échantillon est généralement placé dans une cuvette en quartz ou en verre spécialement conçue pour minimiser l'absorption de la lumière dans la région UV-visible.
- ❖ **Détecteur :** Le détecteur mesure l'intensité de la lumière transmise à travers l'échantillon à la longueur d'onde sélectionnée. Les photodiodes ou les photomultiplicateurs sont couramment utilisés comme détecteurs dans les spectrophotomètres UV-visible.
- ❖ **Amplificateur :** L'amplificateur augmente le signal détecté, tandis que le convertisseur analogique-numérique convertit le signal analogique en un signal numérique compréhensible par l'ordinateur ou l'afficheur du spectrophotomètre.

Ces différents compartiments travaillent ensemble pour permettre des mesures précises de l'absorbance ou de la transmission de la lumière par un échantillon à différentes longueurs d'onde, facilitant ainsi l'analyse quantitative et qualitative des substances [2].

I.4 Comment une molécule absorbe-t-elle dans le domaine UV-visible

La spectrophotométrie est utilisée pour déterminer la concentration d'une substance par absorption de la lumière dans le domaine UV-visible. Cette absorption peut être directe, impliquant une interaction directe avec la lumière, ou indirecte, basée sur une réaction chimique générant un produit coloré. Le choix dépend des propriétés spécifiques de la substance à doser. Les groupements chromophores, présents dans les composés organiques, sont responsables des absorptions de lumière caractéristiques. Ces chromophores, situés aux sites d'origine des transitions électroniques, sont essentiels pour la spectroscopie UV-Visible. Les molécules contenant ces chromophores, appelées chromogènes, présentent un squelette moléculaire portant un ou plusieurs de ces groupements absorbants. Lorsque les chromophores sont isolés, les effets individuels s'additionnent de manière prévisible dans les spectres d'absorption, sauf en cas d'accumulation de plusieurs chromophores à proximité les uns des autres [37].

I.5 Dosage par Spectrophotométrie

La spectrophotométrie est une méthode analytique couramment utilisée pour déterminer la concentration d'une substance dans une solution. Cette méthode peut être réalisée de deux manières principales : le dosage direct et le dosage indirect.

I.5.1 Dosage direct

Dans le dosage direct, la substance à analyser absorbe la lumière à une longueur d'onde spécifique. Préalablement dissoute dans un solvant approprié, la substance à doser est soumise à la loi de Beer-Lambert, établissant ainsi une relation linéaire entre l'absorbance et la concentration. En mesurant l'absorbance d'échantillons de concentrations connues, une courbe d'étalonnage est élaborée. Cette courbe permet ultérieurement de déterminer la concentration d'échantillons inconnus en les comparant aux absorbances des étalons. Ce type de dosage se distingue par sa précision et sa spécificité vis-à-vis de la substance d'intérêt, requérant toutefois que cette dernière absorbe directement la lumière [38].

I.5.2 Dosage indirect

Dans le dosage indirect, la concentration de la substance d'intérêt est évaluée en surveillant une réaction qui génère un produit coloré ou modifie les propriétés optiques de la solution. Cette méthode est souvent privilégiée lorsque la substance ne présente pas une absorption directe significative dans la bande détectée par le spectrophotomètre, ou lorsque le composé à doser est présent dans une matrice contenant des constituants absorbants dans le même domaine spectral. Le choix de la réaction chimique est orienté vers la formation d'un composé coloré, dont l'absorbance est ensuite mesurée [38].

La concentration est alors déduite en se basant sur la loi de Beer-Lambert, qui établit une corrélation entre l'absorbance et la concentration du produit résultant de la réaction. Cette approche est adaptée aux substances qui ne manifestent pas une absorption directe dans la gamme électromagnétique détectée. La précision de la méthode dépend de la nature de la réaction chimique et peut être influencée par la présence d'autres composés.

En récapitulation, le dosage direct par spectrophotométrie repose sur l'absorption directe de la substance analysée, tandis que le dosage indirect fait appel à une réaction chimique pour générer un produit détectable. Le choix entre ces deux approches dépend des caractéristiques spécifiques de la substance à doser ainsi que des exigences propres à l'analyse (Figure I.2).



Figure I.2. Schéma explicatif pour un dosage indirect

En pratique, si la substance à doser présente un pic d'absorption caractéristique dans le spectre visible (indiquant une couleur) ou dans l'UV, on opte pour un dosage direct. En revanche, si la substance ne présente pas de pic d'absorption distinctif, le recours à une réaction chimique générant une couleur devient nécessaire, justifiant ainsi le choix du dosage indirect.

I.6 Construction de la courbe d'étalonnage

La construction de la courbe d'étalonnage nécessite la mesure de l'absorbance de solutions étalons de concentrations connues, suivie du tracé d'une courbe linéaire représentant la relation entre l'absorbance et la concentration. Les étapes comprennent la préparation des solutions, le réglage du spectrophotomètre, la mesure de l'absorbance, la construction graphique, la régression linéaire, et la vérification de la linéarité.

- Préparation des solutions étalons : Préparez une série de solutions étalons de concentrations connues de la substance que vous souhaitez doser. Assurez-vous que les solutions couvrent une gamme de concentrations incluant la concentration attendue de l'échantillon inconnu.
 - Réglage du spectrophotomètre : Ajustez le spectrophotomètre à la longueur d'onde spécifique (λ_{max}) à laquelle la substance que vous mesurez吸erce la lumière de manière significative.
 - Mesure de l'absorbance : Mesurez l'absorbance de chaque solution étalon à la longueur d'onde choisie en utilisant le spectrophotomètre. Notez les valeurs d'absorbance.

- Construction de la courbe d'étalonnage : Tracer le graphique : Placez les valeurs de concentration sur l'axe des x et les valeurs d'absorbance sur l'axe des y.
- Choix du type de courbe : En général, une relation linéaire est recherchée. La loi de Beer-Lambert s'exprime comme une équation linéaire.
- Régression linéaire : Utilisez une méthode de régression linéaire pour ajuster les points expérimentaux et obtenir l'équation de régression linéaire.
- Vérification de la zone de linéarité : Assurez-vous que la courbe est linéaire sur l'intervalle de concentrations étudié. Si la relation n'est pas linéaire, cela peut indiquer des limitations ou des non-linéarités dans la méthode.
- Dosage des échantillons inconnus : Une fois que la courbe d'étalonnage est établie, mesurez l'absorbance d'un échantillon de concentration inconnue à la même longueur d'onde. Utilisez l'équation de la droite de régression pour calculer la concentration de l'échantillon inconnu (Figure I.3).

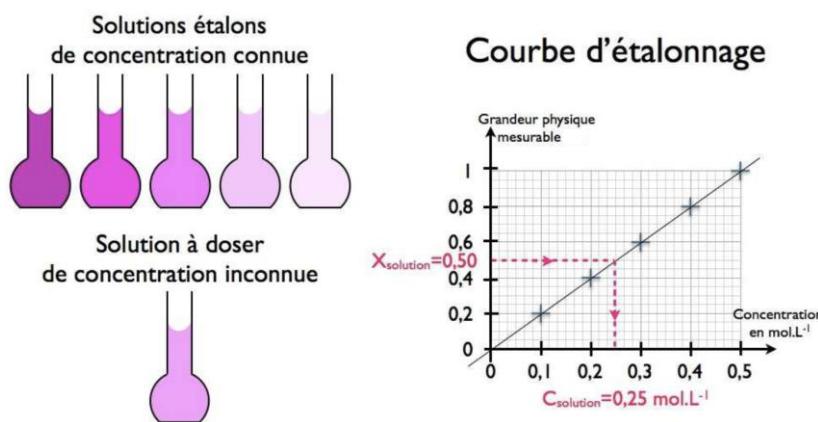


Figure I.3. Construction de la courbe d'étalonnage

La courbe d'étalonnage ainsi construite facilite la conversion des mesures d'absorbance en concentrations pour les échantillons inconnus, fournissant ainsi une méthode quantitative pour le dosage de la substance d'intérêt.

I.7 Exemples d'application

I.7.1 Dosage du Paracétamol

Le dosage spectrophotométrique du paracétamol est une méthode courante utilisée pour quantifier la concentration de cette substance dans un échantillon. Le paracétamol peut être dosé par spectrophotométrie UV-visible en exploitant sa capacité à absorber la lumière à une longueur d'onde spécifique. Ce dosage peut être effectué soit par une méthode directe, soit par une méthode indirecte.

❖ *Dosage direct*

Dans le dosage spectrophotométrique direct du paracétamol, la substance elle-même est la cible de l'analyse. Le paracétamol a une absorbance spécifique à une longueur d'onde particulière dans le spectre électromagnétique (λ_{max}). La méthode consiste à mesurer l'absorbance de l'échantillon à cette longueur d'onde caractéristique. La concentration inconnue de la substance à doser peut ensuite être déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage (Figure I.4).

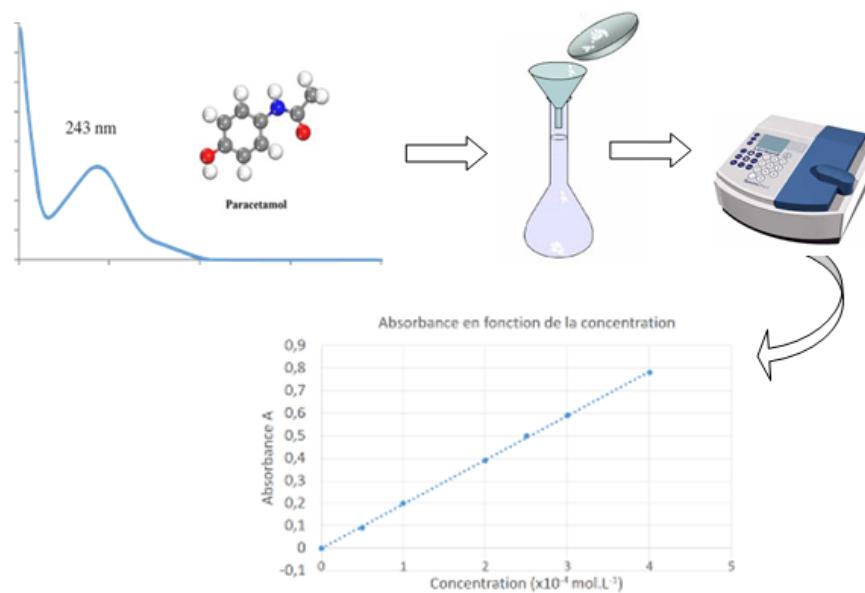
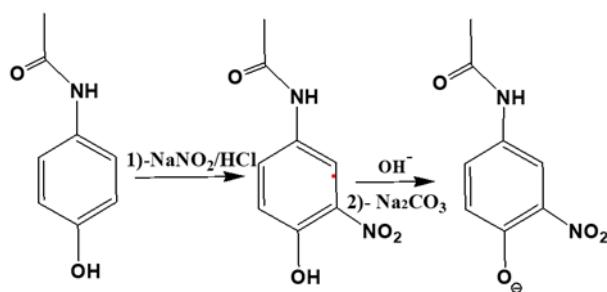


Figure I.4. Schéma explicatif pour un dosage direct

❖ *Dosage Indirect*

Dans le dosage spectrophotométrique indirect du paracétamol, une réaction chimique est utilisée pour convertir le paracétamol en un produit qui peut être mesuré par spectrophotométrie visible. Le principe de ce dosage repose sur la nitration en milieu acide du paracétamol par les ions nitrite [39]. Le passage en milieu basique permet ensuite d'obtenir un phénate coloré selon la réaction suivante (Figure I.5) :



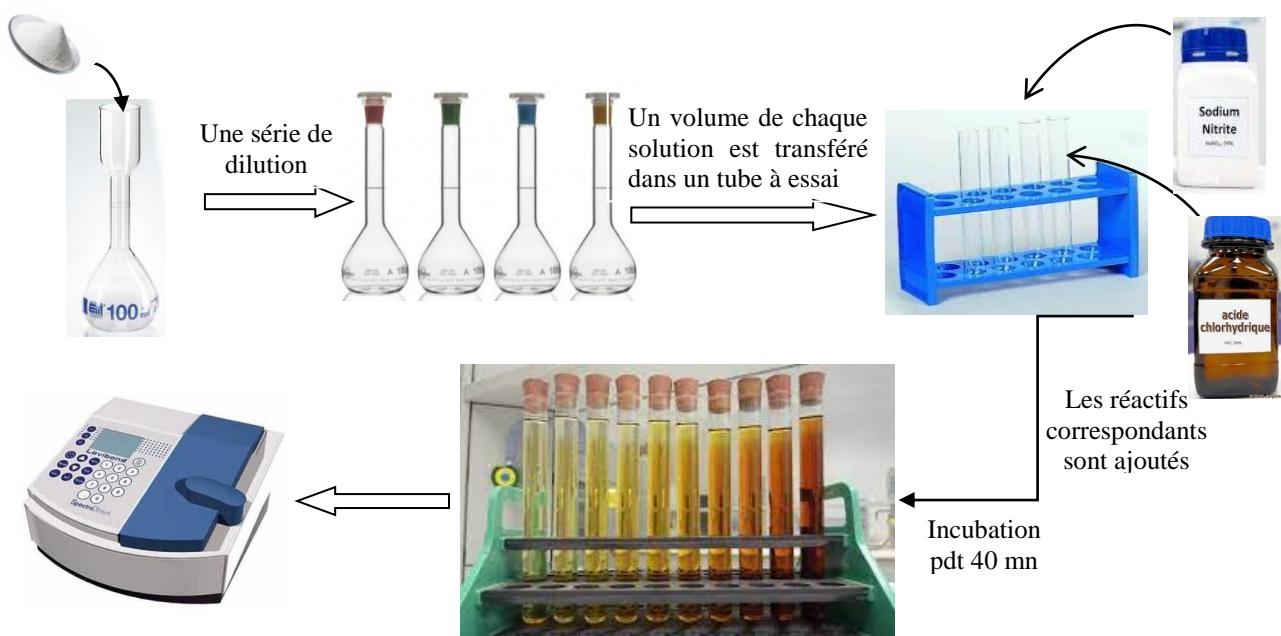
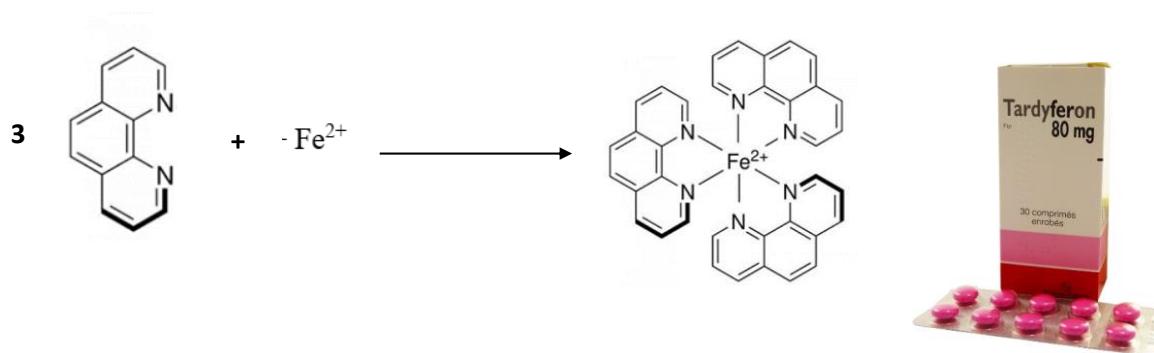


Figure I.5. Schéma explicatif pour le dosage indirect du Paracétamol

I.7.2 Dosage indirect du fer dans un médicament par spectrophotométrie

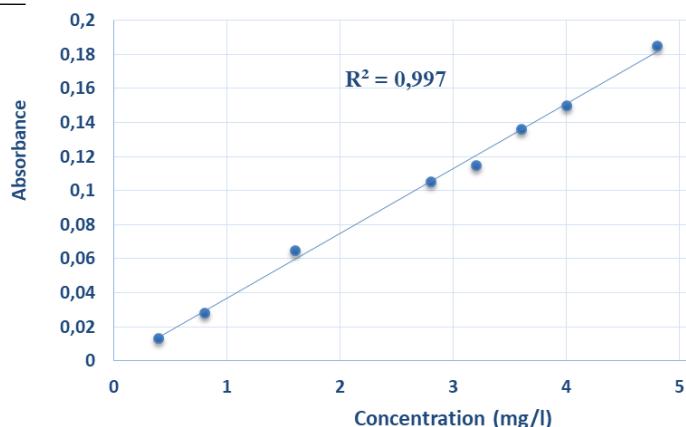
Le principe du dosage indirect du fer dans un médicament par spectrophotométrie repose sur la réaction entre les ions fer (II) (Fe^{2+}) présents dans la solution et l'o-phénanthroline, formant ainsi un complexe coloré rouge-orangé. La concentration massique en ions Fe^{2+} peut être déterminée en mesurant l'absorbance de ce complexe à une longueur d'onde spécifique à l'aide d'un spectrophotomètre.



Dans cette méthode, le médicament contenant du fer est dissous dans un solvant approprié pour former une solution homogène. Ensuite, un excès d'o-phénanthroline est ajouté à cette solution, entraînant la réaction des ions Fe^{2+} avec l'o-phénanthroline pour former un complexe coloré $[\text{Fe(o-phen)}_3]^{2+}$. Cette solution est ensuite placée dans un spectrophotomètre, qui mesure l'absorbance de la solution à une longueur d'onde spécifique correspondant à la couleur du complexe formé. À partir de cette absorbance, on peut construire une courbe d'étalement en utilisant des solutions de concentrations connues en ions Fe^{2+} .

En mesurant l'absorbance de l'échantillon inconnu et en se référant à la courbe d'étalonnage, on peut alors déterminer sa concentration en ions fer(II). Cette méthode, courante et précise, est utilisée en chimie analytique pour quantifier la concentration d'ions fer(II) dans un échantillon.

1. Préparation de la gamme étalon



2. Préparation de la solution S' à partir d'un comprimé de Tardifron 80mg.

Pour préparer la solution S' à partir d'un comprimé de Tardiféron 80 mg, procédez comme suit : commencez par laver rapidement le comprimé à l'eau distillée afin d'éliminer tout colorant. Ensuite, écrasez le comprimé dans un mortier. Introduisez la totalité du comprimé écrasé dans une fiole jaugée de 100 mL. Ajoutez ensuite 1 mL d'hydroquinone et quelques gouttes d'acide chlorhydrique à 0,1 mol. L⁻¹, puis complétez avec de l'eau distillée. Agitez vigoureusement la solution pendant au moins 20 minutes. Prélevez ensuite 5 mL du contenu de cette fiole jaugée et transférez ce volume dans une nouvelle fiole jaugée de 100 mL. Complétez avec de l'eau distillée. La solution ainsi obtenue, que nous notons S₀, est incolore (Figure I.6).

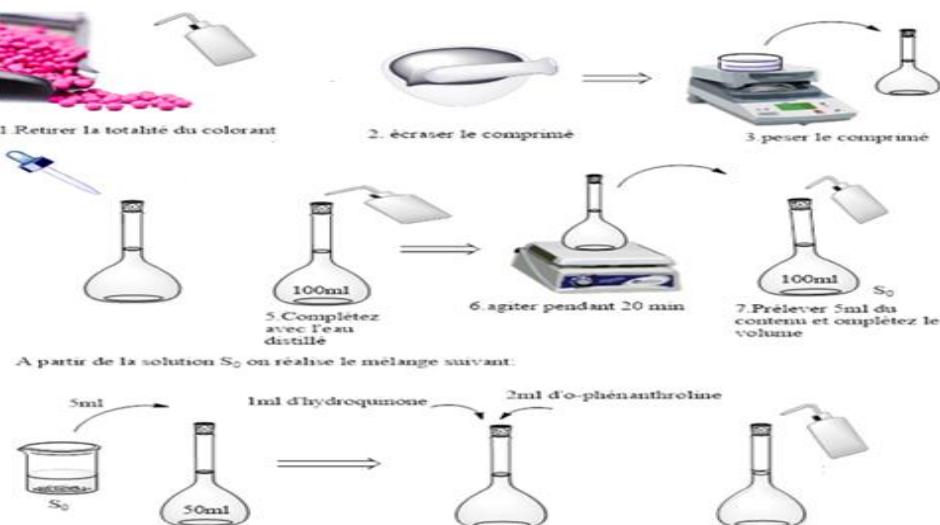


Figure I.6. Schéma explicatif pour le protocole de préparation

I.2 Rappel sur la spectroscopie infrarouge et son rôle dans l'analyse des médicaments

La spectroscopie infrarouge, notamment la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR), est une technique analytique incontournable pour obtenir des informations détaillées sur les groupements fonctionnels présents dans les molécules organiques. Elle permet de caractériser et d'identifier ces groupements en analysant les vibrations moléculaires spécifiques. Ces vibrations sont principalement observées dans la région de l'infrarouge moyen, qui s'étend de 4000 à 400 cm^{-1} (Figure I.7). Grâce à la FT-IR, il est possible de détecter les liaisons chimiques et de déterminer la structure moléculaire, ce qui est essentiel dans divers domaines tels que la chimie organique, la biochimie, les sciences des matériaux et la science des médicaments.

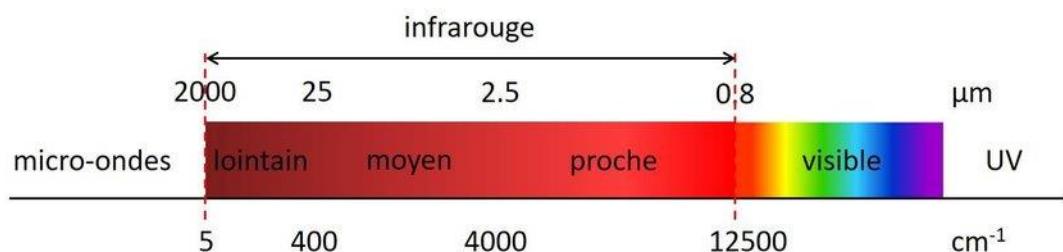


Figure I.7. Gamme des fréquences infrarouge dans le spectre électromagnétique.

I.2.1 Principe de base

Lorsque la lumière infrarouge traverse un échantillon, certaines longueurs d'onde sont absorbées par les liaisons chimiques, entraînant des vibrations moléculaires. Le spectre IR qui en résulte représente l'intensité de l'absorption en fonction de la longueur d'onde (ou du nombre d'ondes), avec des pics caractéristiques correspondant aux différentes vibrations des liaisons chimiques présentes dans la molécule. Ces "empreintes digitales" moléculaires permettent d'identifier les composants spécifiques dans un échantillon (Figure I.8).

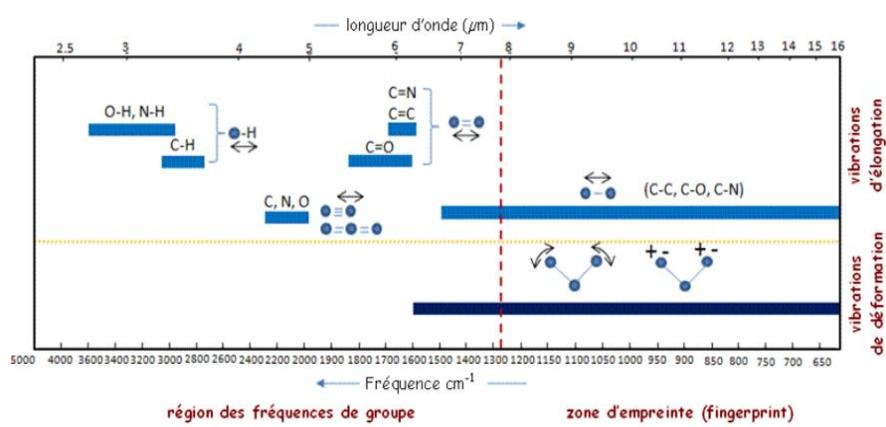


Figure I.8. Zones des fréquences des groupes et des empreintes dans le spectre IR.

I.2.2 Applications de la FT-IR dans l'analyse quantitative

➤ Identification et contrôle de qualité

Dans l'industrie pharmaceutique, la FT-IR est largement utilisée pour le contrôle de la qualité des matières premières, des intermédiaires et des produits finis. Elle permet de vérifier l'identité et la pureté des produits pharmaceutiques, en identifiant les substances présentes dans un médicament par comparaison du spectre obtenu avec des spectres de référence, chaque composé chimique ayant un spectre IR unique. De plus, elle permet de vérifier la pureté des médicaments en détectant la présence d'impuretés, assurant ainsi l'efficacité et la sécurité du produit.

➤ Études de Stabilité

Elle aide à surveiller la stabilité des médicaments en identifiant les modifications chimiques qui peuvent se produire au fil du temps ou sous l'influence de facteurs environnementaux tels que la lumière, la chaleur et l'humidité.

➤ Dosage Quantitatif

Initialement utilisée principalement pour ses avantages qualitatifs, la spectroscopie IR a été réintroduite comme un outil pour les déterminations quantitatives. En mesurant l'absorbance des bandes caractéristiques spécifiques d'un composé, on peut quantifier la concentration des principes actifs dans les formulations médicamenteuses.

➤ Polymorphisme

Le polymorphisme, la présence de différentes formes cristallines d'un composé, peut affecter significativement la biodisponibilité et la stabilité des médicaments. La FT-IR aide à identifier et à quantifier les différentes formes polymorphes d'un médicament, ce qui est crucial pour le développement et l'assurance qualité des médicaments.

I.2.3 Utilisation des bandes caractéristiques pour les analyses quantitatives

a)- Identification et sélection des bandes caractéristiques

Chaque groupe fonctionnel dans une molécule absorbe la lumière infrarouge à des fréquences spécifiques, produisant des bandes caractéristiques dans le spectre IR. Par exemple, les liaisons C=O (carbonyle) montrent des pics autour de 1700 cm^{-1} , et les liaisons O-H (hydroxyle) autour de $3200\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$.

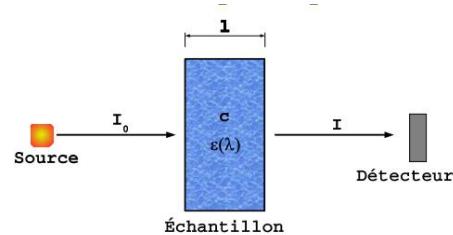
Pour une analyse quantitative, il est crucial de choisir des bandes d'absorption qui sont spécifiques à l'analyte d'intérêt et qui ne sont pas interférées par d'autres composants de la matrice. Ces bandes doivent être bien résolues et distinctes dans le spectre.

b)- Application de la Loi de Beer-Lambert

Une fois les bandes caractéristiques identifiées, la loi de Beer-Lambert peut être appliquée pour relier l'absorbance mesurée à la concentration de l'analyte. La loi de Beer-Lambert est exprimée par : $A=\varepsilon \cdot C \cdot l$ où A : est l'absorbance, ε : est le coefficient d'absorption molaire de la bande caractéristique, C : est la concentration de l'analyte, et l : est la longueur du trajet optique de la cellule.

$$T = \frac{I}{I_0}$$

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = -\log(T)$$



c)- Courbes de Calibration

Pour établir une relation quantitative, des solutions étalons de concentrations connues de l'analyte sont préparées. L'absorbance à la longueur d'onde de la bande caractéristique est mesurée pour chaque solution étalon. En traçant un graphe de l'absorbance en fonction de la concentration, une courbe de calibration est obtenue. La pente de cette courbe correspond au produit $\varepsilon \cdot l$.

d)- Détermination de la concentration

Pour un échantillon inconnu, on mesure l'absorbance à la même longueur d'onde caractéristique. En utilisant la courbe de calibration, on peut alors déterminer la concentration de l'analyte dans l'échantillon.

I.2.4 Développement de techniques et validation de méthodes

L'avancement des technologies, telles que la spectroscopie FT-IR, a amélioré la sensibilité et la précision des mesures, permettant une analyse quantitative plus fiable. Les appareils modernes sont capables de détecter de très faibles variations d'absorbance, ce qui est crucial pour des mesures quantitatives précises.

□ Préparation des Échantillons

Une préparation appropriée des échantillons est cruciale en analyse FT-IR pour garantir des résultats précis et reproductibles. L'échantillon doit être préparé de manière à permettre à la lumière infrarouge de passer à travers et d'interagir efficacement avec l'échantillon.

- **Échantillons solides** : Pour les échantillons solides, des techniques telles que le pelletage au KBr, la réflexion totale atténuée (ATR) et la réflexion diffuse sont utilisées. L'échantillon est souvent broyé avec du bromure de potassium (KBr) et pressé en un pellet.
- **Échantillons liquides** : Les échantillons liquides peuvent être placés dans une cellule liquide avec des fenêtres transparentes en matériaux comme le fluorure de calcium ou le chlorure de sodium. L'ATR peut également être utilisée pour les liquides.

□ Développement de Méthodes

a)- Modèles de calibration

Le développement d'un modèle de calibration implique la mesure des spectres FT-IR d'étalons avec des concentrations connues de l'analyte. Ces spectres sont utilisés pour construire un modèle qui corrèle les données spectrales avec la concentration, souvent en utilisant des méthodes statistiques multivariées comme la régression des moindres carrés partiels (PLS).

b)- Sélection de la région spectrale

La sélection de la région spectrale appropriée qui correspond aux modes vibrationnels de l'analyte est cruciale. Cela permet de minimiser les interférences d'autres composants dans l'échantillon.

□ Validation de Méthodes

- Exactitude et Précision

La validation implique de démontrer que la méthode fournit des résultats exacts et précis. Cela se fait généralement en comparant les résultats FT-IR avec ceux obtenus à partir d'une méthode de référence.

- Linéarité et intervalle

La méthode doit montrer une réponse linéaire sur l'intervalle de concentration d'intérêt. Cela est évalué en traçant la réponse par rapport à la concentration et en calculant le coefficient de corrélation.

- Sensibilité et Limites de Détection

La sensibilité de la méthode et les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) doivent être établies. Cela implique de déterminer la plus faible concentration de l'analyte qui peut être détectée et quantifiée de manière fiable.

- Spécificité et Robustesse

La méthode doit être spécifique à l'analyte et ne pas être affectée par d'autres composants dans l'échantillon. Les tests de robustesse garantissent que la méthode reste fiable dans des conditions variables.

I.2.5 Avantages de la spectroscopie IR pour les déterminations quantitatives

- Non-destructivité : Les échantillons peuvent être analysés sans destruction, permettant des analyses répétées et la préservation des échantillons précieux.
- Rapidité : Les mesures peuvent être réalisées rapidement, ce qui est essentiel pour les contrôles de qualité en temps réel dans les industries pharmaceutiques.
- Polyvalence : Capacité à analyser une large gamme d'échantillons (solides, liquides, gazeux) sans nécessiter de préparation complexe.
- Sensibilité : Les techniques modernes permettent la détection et la quantification de faibles concentrations de composés.

I.2.6 Défis et Limitations

❖ Complexité des Échantillons

Des échantillons complexes avec plusieurs composants peuvent entraîner des spectres chevauchants, rendant difficile la déconvolution et la quantification des composants individuels.

❖ Effets de Matrice

La présence de divers excipients et autres substances dans les formulations pharmaceutiques peut affecter les spectres d'absorption, entraînant des inexactitudes dans la quantification.

❖ Sensibilité

La FT-IR est généralement moins sensible que d'autres techniques analytiques comme la HPLC ou la spectrométrie de masse. Cela peut limiter son application dans la détection de faibles concentrations d'analytes.

❖ Interférence de l'eau

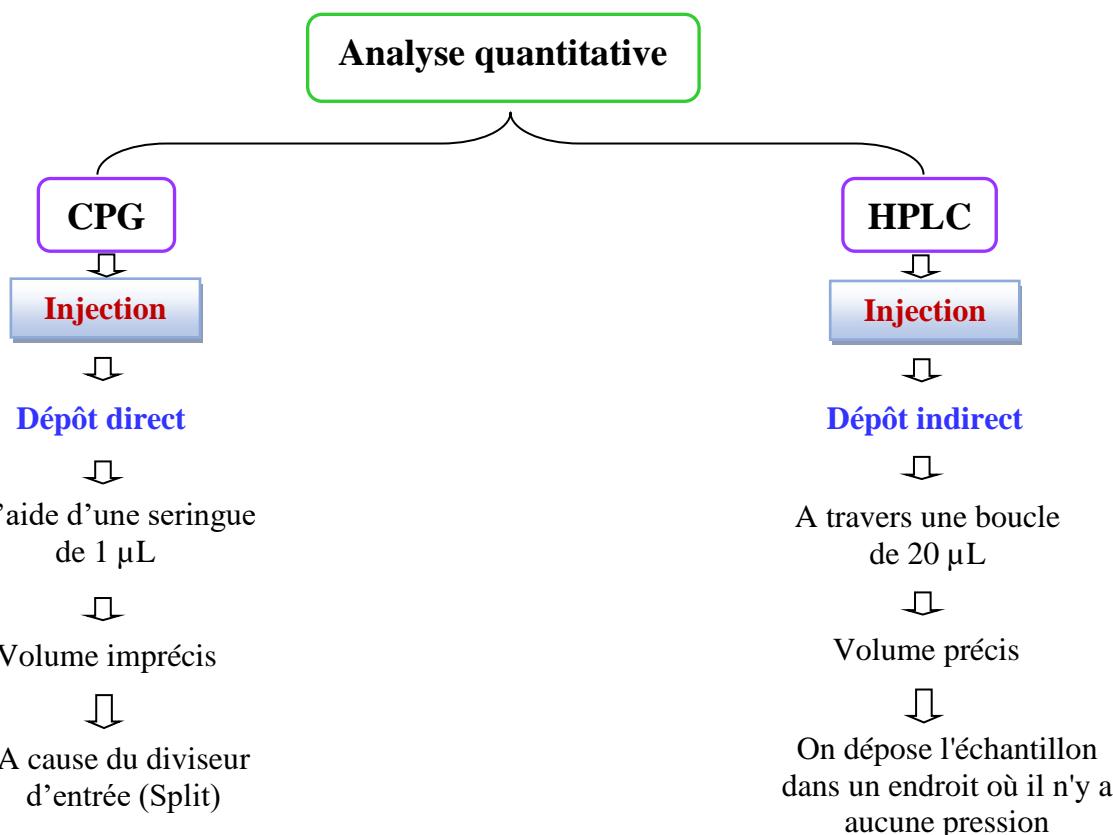
L'eau présente des bandes d'absorption fortes dans la région infrarouge, ce qui peut interférer avec l'analyse.

Bien que la spectroscopie IR ait été initialement utilisée pour ses avantages qualitatifs, les développements technologiques et méthodologiques l'ont transformée en un outil puissant pour les déterminations quantitatives. En combinant la loi de Beer-Lambert avec des techniques avancées de mesure et de traitement des données, la spectroscopie IR permet de quantifier précisément les composants dans des échantillons complexes, notamment dans le domaine pharmaceutique [41-43].

Partie II : Dosage Chromatographique

II.1 Rappel

L'analyse quantitative par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et chromatographie en phase gazeuse (CPG) sont des techniques essentielles dans le domaine pharmaceutique pour contrôler les principes actifs dans les médicaments. Ces méthodes analytiques sophistiquées permettent de quantifier avec précision les principes actifs et les impuretés présents dans les formulations médicamenteuses. L'HPLC est plus adaptée à l'analyse des composés non volatils et polaires, tandis que la CPG se concentre sur l'analyse des composés volatils [40]. Dans cette étude, nous explorerons les méthodes de dosage par ces deux techniques, leurs avantages et leurs limitations, ainsi que leurs applications spécifiques dans le contrôle de qualité des médicaments. Comprendre ces techniques est crucial pour garantir l'efficacité, la sécurité et la conformité réglementaire des produits pharmaceutiques, contribuant ainsi à la santé publique.



En général, l'utilisation de l'analyse quantitative est plus répandue en HPLC qu'en CPG.

La chromatographie liquide à haute performance est couramment utilisée pour doser les principes actifs des médicaments. Cependant, il est important de noter que la chromatographie en phase gazeuse reste très utile pour certaines applications spécifiques, notamment pour l'analyse de composés volatils et thermiquement stables,

II.2 Méthodes d'étalonnage pour la quantification des substances pharmaceutiques

Les méthodes de quantification des médicaments reposent généralement sur le principe de comparaison à un étalon. Ainsi, l'opération d'étalonnage vise à établir la relation mathématique, souvent linéaire, entre la réponse du détecteur et la quantité de l'analyte. Cette étape revêt une importance capitale dans le processus de quantification, car un étalonnage incorrect entraîne inévitablement des résultats erronés. Par conséquent, il est impératif de maîtriser parfaitement la réalisation de cette étape cruciale de l'analyse.

II.2.1 Principe de l'étalonnage

L'étalonnage implique la préparation d'une gamme d'étalonnage à partir d'une substance pure ou d'une solution étalon commerciale afin de couvrir l'intervalle de travail nécessaire. Les dilutions sont effectuées soit par volumétrie, nécessitant un matériel de précision et une vérification régulière, soit par gravimétrie, nécessitant un contrôle périodique de la balance pour assurer la justesse des pesées. Il est recommandé de réaliser plusieurs dilutions plutôt que de partir d'une seule solution mère diluée successivement, car cela réduit le risque de propagation d'erreurs de dilution pouvant entraîner des erreurs systématiques sur toute la gamme (Figure II.1) [2, 40].

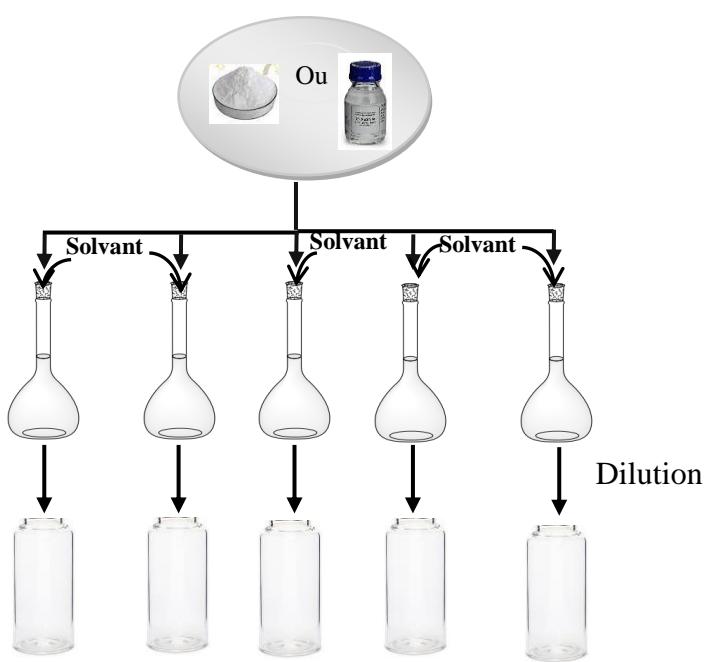


Figure II.1. Réalisation de la gamme d'étalonnage.

Il existe quatre méthodes chromatographiques de dosage des médicaments :

- Etalonnage externe
- Etalonnage interne
- Courbe d'étalonnage
- Normalisation des aires

Ces différentes méthodes offrent des approches flexibles pour quantifier les composés pharmaceutiques dans les matrices résiduelles, chacune présentant ses avantages et ses limitations en fonction des exigences analytiques spécifiques.

II.2.1 Etalonnage externe (pour les dosages en routine)

L'étalonnage externe est uniquement utilisé en HPLC pour doser une substance pharmaceutique dans une formulation galénique. Il implique l'utilisation d'une seule solution de référence de concentration (masse) connue pour déterminer la teneur des substances pharmaceutiques présentes dans les échantillons analysés.

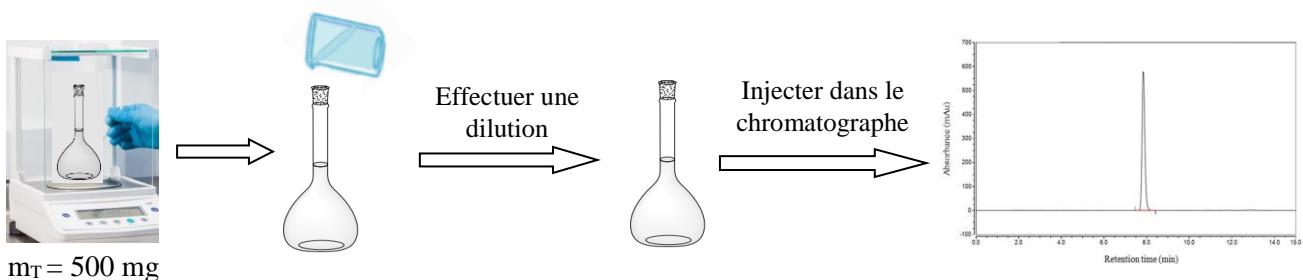
Dans quel cas utilise-t-on la méthode de l'étalonnage externe en HPLC ?

Dans le cadre de la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), la méthode de l'étalonnage externe est employée lorsque la concentration ou la quantité du composé à analyser est préalablement connue ou déclarée. Cette approche nécessite la préparation de deux solutions distinctes : une solution étalon contenant une masse connue du composé à analyser, ainsi qu'une solution d'essai élaborée à partir de l'échantillon de la forme galénique à étudier.

Exemple 1 : Paracétamol dosé à 500 mg (comprimé)

❖ Solution étalon ou témoin (S_T) :

La solution étalon (S_T) est obtenue en dissolvant une prise d'essai de 500 mg de paracétamol pur dans un diluant approprié.

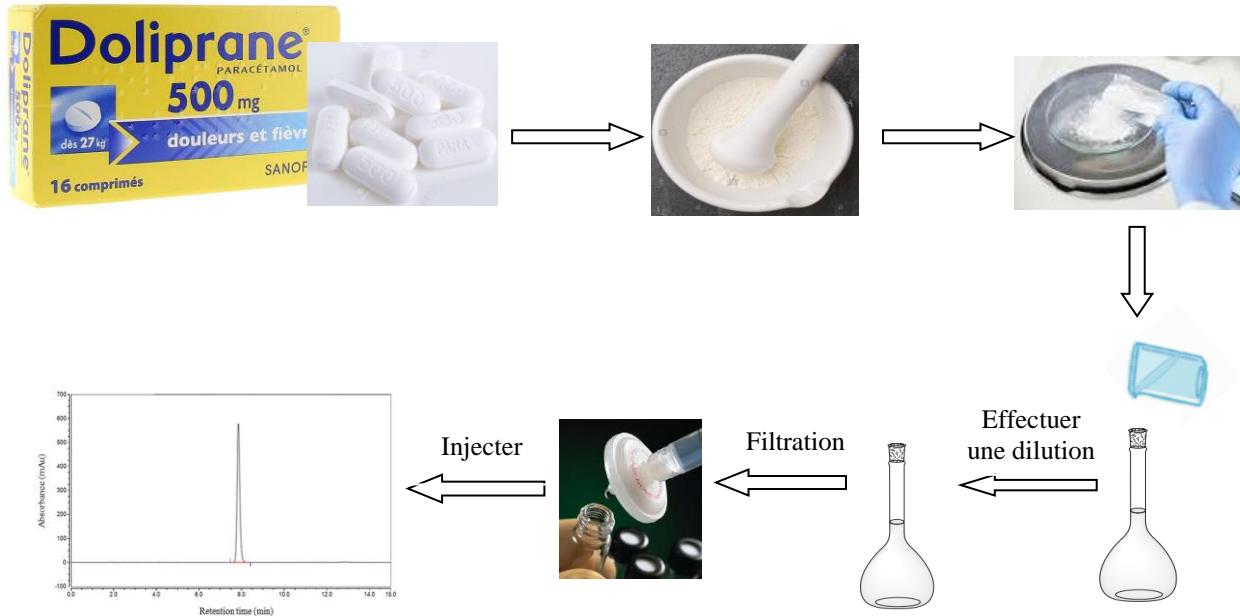


$$m_T(x) = k_x * S_T(x) \quad (1)$$

k_x : étant le coefficient de réponse de la substance x.

❖ Solution essai (S_E)

La méthode d'essai implique de prendre une masse de 20 comprimés, de les broyer en poudre, puis de prélever une portion équivalente à un seul comprimé de cette poudre. Cette portion est ensuite dissoute dans une fiole jaugée contenant un diluant adapté, filtrée, puis injectée dans le chromatographe.



$$m_E(x) = k_x * S_E(x) \quad (2)$$

En déviant la relation (2) par rapport à (1), on obtient :

$$m_E(x) = m_T(x) \frac{S_E(x)}{S_T(x)}$$

L'étalonnage externe en CPG peut être compromis par plusieurs sources d'erreur, notamment une erreur de 10% de l'injecteur, mais reste praticable avec précaution en prenant en compte ces variations.

II.2.2 Etalonnage interne (pour les dosages en routine)

La méthode d'étalonnage interne est couramment utilisée en CPG et parfois en HPLC. Elle est employée lorsque la concentration ou la quantité du composé à analyser n'est pas préalablement déclarée.

Dans cette approche, un standard interne, également appelé "étalon interne", est ajouté à l'échantillon en une quantité fixe et connue, et est également intégré à la solution étalon. La réponse du standard interne est mesurée simultanément avec celle du composé à analyser. En normalisant la réponse du composé à analyser par rapport à celle du standard interne, les variations liées à la préparation de l'échantillon et aux conditions de mesure sont corrigées.

❖ **Critères de choix de l'étalon interne**

Les critères de choix de l'étalon interne en chromatographie dépendent de plusieurs facteurs, notamment :

- L'étalon interne doit être chimiquement similaire à l'analyte d'intérêt pour refléter au mieux les conditions de la séparation chromatographique.
- L'étalon interne doit être stable dans toutes les conditions expérimentales, y compris les conditions de stockage, les solvants et les conditions de fonctionnement de l'instrument.
- L'étalon interne ne doit pas interférer avec l'analyte cible ou d'autres composés dans l'échantillon, afin de ne pas fausser les résultats de l'analyse.
- L'étalon interne doit être chimiquement inerte vis-à-vis des constituants de la matrice afin de ne pas réagir avec eux.
- L'étalon interne doit être détectable à des niveaux suffisamment bas pour permettre une quantification précise de l'analyte, tout en évitant une surcharge du détecteur.

L'étalon interne doit être compatible avec le système chromatographique utilisé, y compris la colonne, les solvants et le détecteur, pour garantir une séparation et une détection efficaces. En tenant compte de ces critères, l'étalon interne est sélectionné pour optimiser la précision et l'exactitude des mesures chromatographiques.

Dans quel cas utilise-t-on la méthode de l'étalonnage interne en HPLC ?

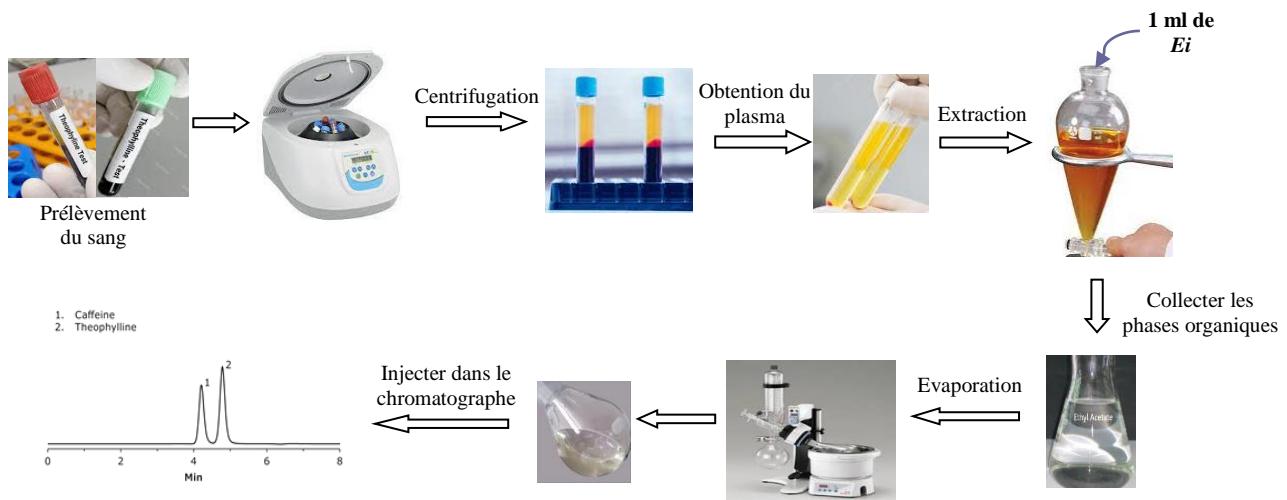
L'étalonnage interne est parfois utilisé en HPLC lorsqu'une opération préliminaire est effectuée (extraction, centrifugation, purification, réaction de dérivation, etc.) afin de compenser les variations introduites par ces étapes et d'améliorer la précision des résultats chromatographiques.

Exemple 2 : Dosage d'un médicament dans le plasma

Prenons l'exemple de la théophylline, un médicament antiasthmatique utilisé pour un suivi thérapeutique précis en raison de la faible marge entre sa concentration thérapeutique et sa concentration toxique. En cas d'urgence, la théophylline est souvent administrée en raison de cette étroite marge thérapeutique.

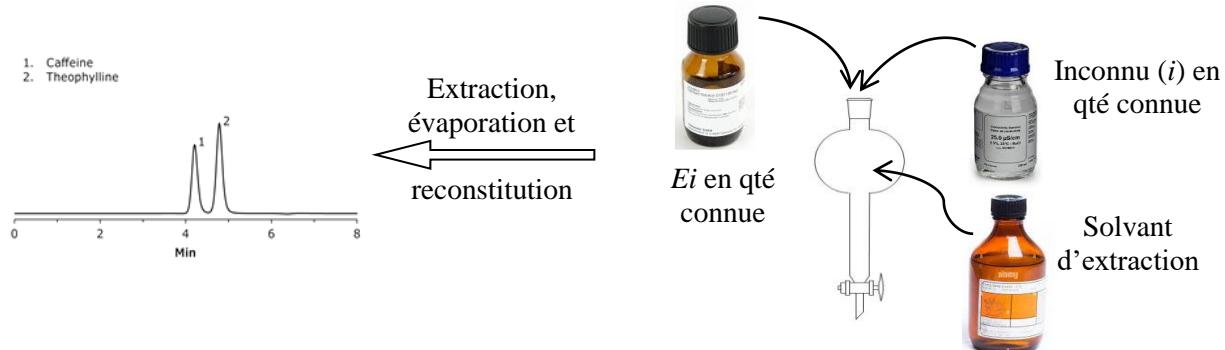
❖ Solution essai (S_E)

Le plasma est séparé du sang humain par centrifugation. La théophylline est extraite du plasma en utilisant de l'acétate d'éthyle comme solvant. Avant l'extraction, de la caféine est ajoutée comme étalon interne. Après agitation, la phase organique contenant la théophylline est séparée à l'aide d'une ampoule à décanter. Cette phase est évaporée pour concentrer la théophylline, puis quantifiée par chromatographie en utilisant la méthode d'étalonnage interne.



❖ Solution témoin (S_T)

On ajoute une quantité connue de l'échantillon inconnu (x) ainsi qu'une quantité connue de l'étalon interne, puis on procède à l'extraction de la même manière que pour la solution témoin.



Lorsque l'on divise les deux rapports (1, 2) par rapport à (3, 4), on obtient :

$$m_E(x) = m_E(EI) \frac{m_T(x)}{m_T(EI)} \frac{S_E(x)}{S_E(EI)} \frac{S_T(EI)}{S_T(x)}$$

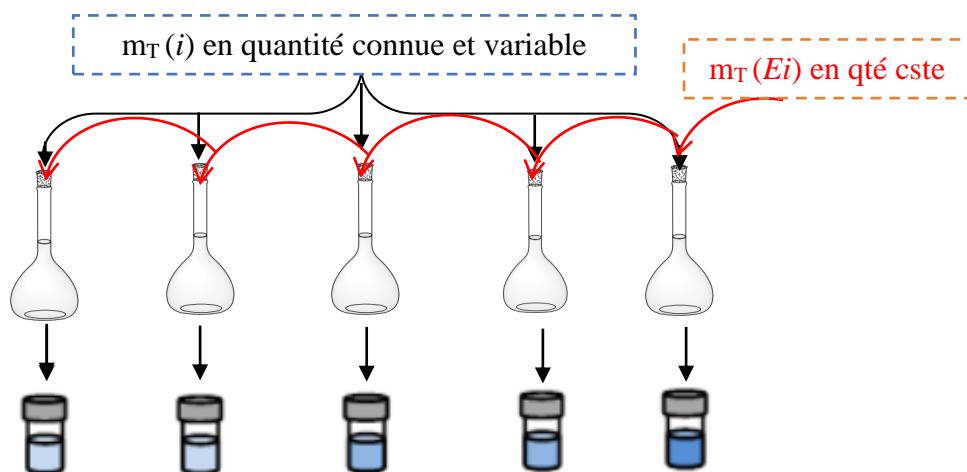
Cette méthode de l'étalonnage interne nous a permis de corriger l'erreur.

II.2.3 Courbe d'étalonnage

La méthode de la courbe d'étalonnage est largement privilégiée en CPG par rapport à l'HPLC. Elle repose sur l'utilisation de solutions étalons de concentrations connues de l'analyte, contenant une quantité connue et constante d'un étalon interne. En soumettant ces solutions à l'analyse chromatographique, une courbe d'étalonnage est établie reliant la concentration de l'analyte à sa réponse chromatographique. Lors de l'analyse des échantillons, leur concentration en analyte est déterminée en comparant leur réponse chromatographique à cette courbe, garantissant ainsi une quantification précise tout en corrigeant les variations liées aux conditions d'analyse.

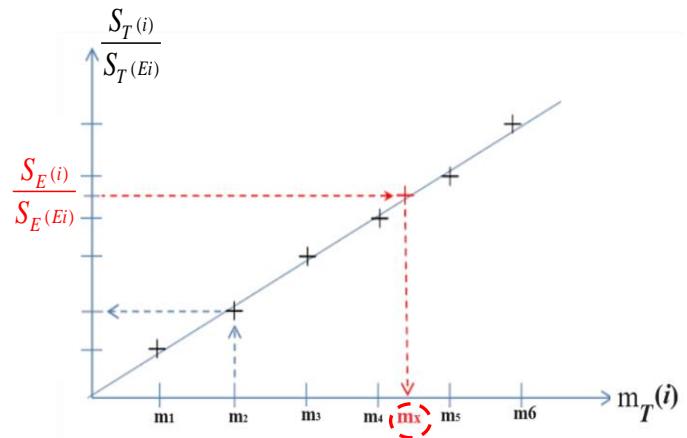
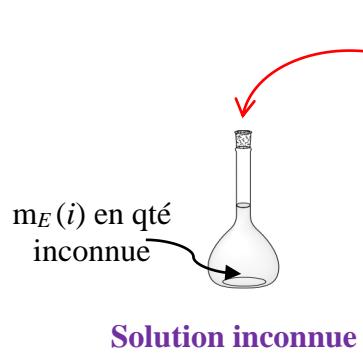
❖ Solutions témoins (S_T)

Je construis une gamme d'étalons dans laquelle la quantité de m_i est variable et connue, tandis que la quantité de m_{EI} est constante et également connue.



❖ Solution essai (S_E)

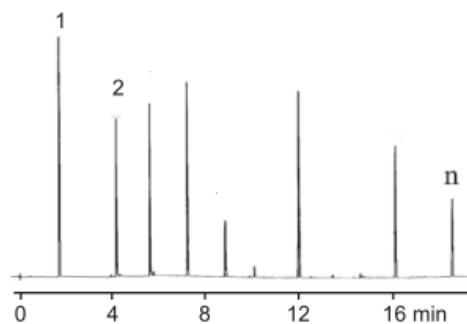
La solution essai est ensuite analysée dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la gamme d'étalonnage.



II.2.4 Normalisation des aires

La normalisation des aires est une technique couramment utilisée en CPG pour corriger les variations de réponse du détecteur et des conditions de séparation entre les échantillons. Elle consiste à comparer les aires des pics chromatographiques avec celles d'une substance de référence de concentration connue, puis à calculer un facteur de normalisation pour ajuster les valeurs de concentration. Cette méthode garantit la précision des résultats de dosage en chromatographie et est particulièrement utile pour analyser des échantillons contenant plusieurs composés, tels que les huiles essentielles, les arômes et les coupes pétrolières.

$$m_i = \frac{S_i}{\sum_{i=1}^n S_i}$$



TRAVAUX DIRIGÉS

CHAPITRE 2

TD N°5 : Analyse Quantitatives Instrumentales

Chromatographiques et Spectroscopiques

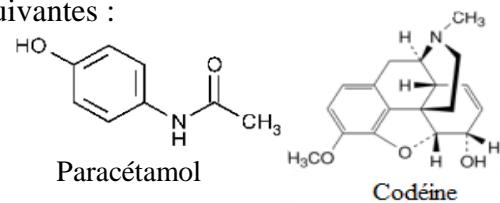
Exercice n°1

Le CODOLIPRANE est un médicament antalgique ; association de deux principes actifs : le Paracétamol dosé à 400 mg et de la Codéine dosée à 20 mg. Le dosage se fera par comparaison à un témoin de composition connue en respectant les conditions suivantes :

Colonne: Discovery C18 (25 cm; 4,6 mm) 5 μ m.

Phase mobile : KH₂PO₄ pH 2,35/MeOH/N(Et)₃ (92/8/0,2 ; v/v/)

Détection : UV à 214 nm. Volume injecté : 20 μ L



1)- De quel type de chromatographie s'agit-il ?

2)- Quelle est la molécule la plus retenue

par la phase stationnaire ? Expliquer.

3)- Quel est l'ordre de sortie de ces produits en HPLC d'adsorption et en HPLC de partage

4)- Comment appelle-t-on la méthode du dosage utilisée ? Et dans quel cas utilise-t-on cette méthode ?

6)- Calculer la masse du Paracétamol et de la Codéine dans le comprimé ?

Prise d'essai : m_T (Pa) = 403 mg ; m_T (Cod) = 21 mg

Exercice n°2

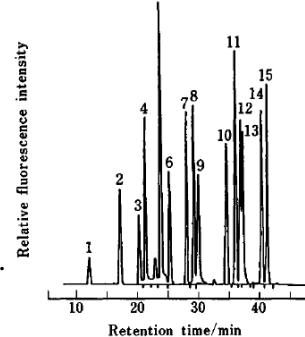
L'ortho-phthalaldéhyde (OPA) est destiné à la détection hautement sensible des amines primaires, y compris les acides aminés, les peptides, les protéines et les polyamines, dans les effluents chromatographiques avant et après la colonne. Nous avons l'intention de doser les acides aminés présents dans les kystes hydatiques. Une solution d'OPA (1 mg/mL) dans un tampon borate 0,4 M (pH 9,2) a été préparée, et elle s'est révélée stable pendant au moins dix jours lorsqu'elle a été conservée dans l'obscurité à température ambiante.

Pour l'analyse, 4 μ L de l'échantillon ont été ajoutés à 2 mL de la solution d'OPA.

Les compositions des phases mobiles étaient les suivantes :

-Solution A, tampon acétate (0,05 M, pH 6,0): MeOH: THF = 79: 20: 1.

-Solution B, tampon acétate (0,05 M, pH 6,0): MeOH = 20: 80.



Détection : la longueur d'onde d'excitation de fluorescence à 340 nm et la longueur d'onde d'émission à 455 nm.

- 1- Quel est le but de la réaction de dérivatisation ?
- 2- Ecrire la réaction de dérivatisation qui a lieu avec les acides aminés.
- 3- Quel est la méthode de dosage utilisée dans ce cas ?
- 4- Proposer une technique de purification adéquate avant l'analyse par HPLC.

Exercice n°3

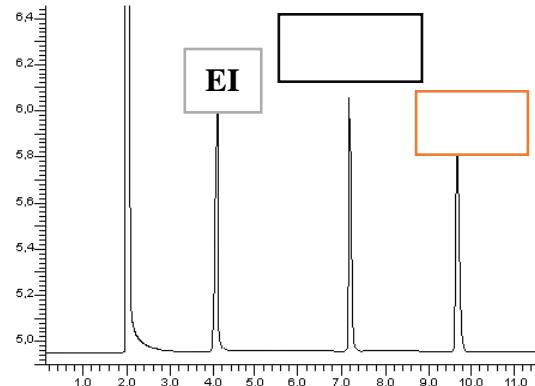
Synthol Gel est un gel antalgique qui contient un salicylé et des substances qui ont un effet révulsif. Il contient quatre principes actifs :

Levomenthol.....	0,520 g
Vératrole	0,250 g
Résorcinol	0,030 g
Acide salicylique	0,100 g

Pour 100 g de gel.

Le contrôle de qualité des deux principes actifs (Lévomenthol, Vératrole) est effectué par la CPG.

- 1)- Quelle est la méthode du dosage utilisée ?
- 2)- Indiquer sur le chromatogramme le pic de chaque PA ?
- 3)- Calculer la teneur du gel synthol en levomenthol et en Veratrole, puis comparer les valeurs obtenues avec celles mentionnées sur la boite.



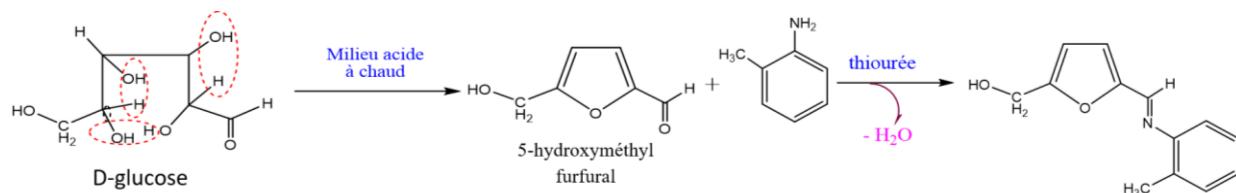
	S1	S2	S3	m_{Levom} (mg)	m_{vera} (mg)
Témoin	7223	11528	5574		
Lot 012	7278	11327	5525		

Prise d'essai : $m_{menth}=525 \text{ mg}$;
 $m_{vera}= 245 \text{ mg}$

NB : la masse de EI est la même pour les deux solutions

Exercice n°4

La glycémie exprime la teneur de glucose dans le sang. En milieu acétique concentré et à chaud, le glucose est déshydraté en 5-hydroxyméthyl furfural. Le produit formé se condense en présence de la thiourée sur une amine aromatique (l'o-Toluidine) pour donner un composé vert caractéristique des aldohexoses qui peut être dosé par mesure de son absorbance à 630 nm.



- 1)- De quel type de dosage s'agit-il ?
- 2)- Dans quel domaine appartient cette longueur d'onde ?
- 3)- Quel est le critère de choix de cette longueur d'onde ?

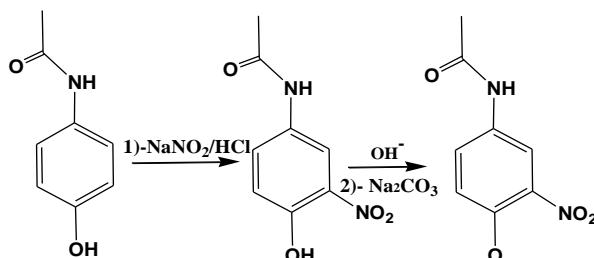
On prépare une série de solutions étalon de concentrations connues, on ajoute les réactifs et on mesure l'absorbance de chaque solution à une longueur d'onde $\lambda = 630 \text{ nm}$.

Masse de glucose (mg)	25	37,5	50	62,5	75	Concentration sérum Cs
Volume l'eau distillée (ml)	50	50	50	50	50	
Concentration (g/l)						
Absorbance	0,58	0,87	1,16	1,45	1,73	0,98

- 4)- Calculer la concentration des solutions étalons ?
- 5)- Tracer la courbe d'étalonnage $A = f(C)$ et en déduire la valeur de la concentration C_s .

Exercice n°5

Le Paracétamol est la substance la plus active de nombreux antalgiques. Dans le but de contrôler une forme galénique nommée Perfalgan (solution pour infusion de 100 ml ; **Paracétamol dosé à 10 mg/ml**) ; une méthode spectrophotométrique a été mise en œuvre. Le principe de ce dosage repose sur la nitration en milieu acide du Paracétamol par les ions nitrite. Le passage en milieu basique permet ensuite d'obtenir un **phénate coloré** selon la réaction suivante :



On prépare une série de solutions étalon de concentrations connues selon le tableau ci-dessus

Solution Etalon (%)	50	75	100	125	150	10 ml de la solution infusion est introduit dans une fiole de 100ml puis on effectue une dilution de 10 fois
Masse du Paracétamol (mg)	50	75	100	125	150	
Volume l'eau distillée (ml)	100	100	100	100	100	
Facteur de dilution pour S _F	10	10	10	10	10	
Concentration (mg /L)						
Absorbance	0,251	0,512	0,763	1,05	1,25	0,742

Après prélèvement de 5 ml de chaque solution, les réactifs sont ajoutés, puis l'ensemble est chauffé dans un bain-marie pendant 1 heure jusqu'à l'apparition de la coloration orangée. L'absorbance de chaque solution est ensuite mesurée à une longueur d'onde de 430 nm.

- 1)- De quel type de dosage s'agit-il ?
- 2)- Dans quel domaine appartient cette longueur d'onde ?
- 3)- Quel est le critère de choix de cette longueur d'onde ?
- 4)- Calculer la concentration des solutions étalons ?
- 5)- A quoi sert la courbe d'étalonnage ?
- 6)- Tracer la courbe d'étalonnage $A = f(C)$
- 7)- Vérifier la conformité de la forme galénique étudiée ?

Conclusion générale

En conclusion, ce cours sur les méthodes de prétraitement des médicaments dans les matrices biologiques et environnementales, ainsi que sur les techniques de dosage spectrophotométrique et chromatographique par HPLC et CPG, offre une exploration approfondie des outils analytiques indispensables dans le domaine pharmaceutique.

Nous avons examiné l'évolution des méthodes de prétraitement, passant de l'extraction sur phase solide (SPE) à la micro-extraction en phase solide (SPME), mettant en évidence la polyvalence de cette dernière, tout en soulignant son utilité persistante lorsqu'elle est couplée avec la CPG et la HPLC pour l'analyse des composés à l'état de trace. Parallèlement, la spectrophotométrie a été mise en avant pour sa sensibilité, sa rapidité et sa simplicité, des caractéristiques cruciales dans l'analyse quantitative des médicaments.

Il est important de noter que dans ce polycopié, nous nous sommes concentrés exclusivement sur les méthodes de dosage, en omettant les détails des méthodes spectroscopiques et chromatographiques, ces dernières étant enseignées dans des modules de spécialité distincts. Nous avons ainsi privilégié une approche axée sur les techniques de dosage, en mettant en lumière leur importance dans l'analyse quantitative des médicaments.

Nous avons également souligné l'importance du prétraitement des échantillons, une étape essentielle pour concentrer les substances à des niveaux détectables et pour séparer les composés de matrices complexes. En offrant une vue d'ensemble des techniques de dosage quantitatives les plus utilisées à l'échelle industrielle, ce cours vise à équiper les étudiants de troisième année et de Master en chimie pharmaceutique et chimie analytique d'une compréhension approfondie des méthodes d'analyse des produits d'intérêts.

Ainsi, ce polycopié représente un outil pédagogique précieux, destiné à former des professionnels compétents capables de relever les défis analytiques rencontrés dans l'industrie pharmaceutique et environnementale en constante évolution. En mettant l'accent sur l'importance cruciale de ces techniques dans ces domaines, ce cours vise à fournir aux étudiants les compétences nécessaires pour aborder les complexités de l'analyse des produits pharmaceutiques avec assurance et expertise.

Références bibliographiques

- [1]. Hargis, L. G. (1988). *Analytical chemistry: principles and techniques*.
- [2]. Rouessac, F., Rouessac, A., and Daniel Cruch. (2004). *Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes*. 6^e édition Dunod.
- [3]. Dean, J. R. (2010). *Extraction techniques in analytical sciences*. John Wiley & Sons.
- [4]. Law, J. D., and Todd, T. A. (2008). *Liquid-liquid extraction equipment* (No. INL/CON-08-15151). Idaho National Lab. (INL), Idaho Falls, ID (United States).
- [5]. Clayden, J., Greeves, N., and Warren, S. (2012). *Organic chemistry*. Oxford University Press, USA.
- [6]. Abe, E., Delyle, S. G., and Alvarez, J. C. (2010). Extraction liquide-liquide : théorie, applications, difficultés. In *Annales de Toxicologie Analytique* (Vol. 22, No. 2, pp. 51-59). EDP Sciences.
- [7]. Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2019). *Textbook" Principles of Instrumental Analysis"*. Cengage Learning; 6 edition.
- [8]. Ahuja, S. (2003). Chromatography and separation science (Vol. 4). Academic Press.
- [9]. Christian, G. D., Dasgupta, P. K., and Schug, K. A. (2013). *Analytical chemistry*. John Wiley & Sons.
- [10]. Atkins, P. W., Ratcliffe, G., de Paula, J., & Wormald, M. (2023). *Physical chemistry for the life sciences*. Oxford University Press.
- [11]. LEYBROS, J., and Frémeaux, P. (1990). Extraction solide-liquide : Techniques et appareillage. *Techniques de l'Ingénieur, Traité de Génie des Procédés J*, 2, 782.
- [12]. Seader, J. D., Henley, E. J., and Roper, D. K. (2006). Separation process principles.
- [13]. Romdhane, M., & Gourdon, C. (2002). Investigation in solid–liquid extraction: influence of ultrasound. *Chemical engineering journal*, 87(1), 11-19.
- [14]. López-Bascón, M. A., and De Castro, M. L. (2020). Soxhlet extraction. In *Liquid-phase extraction* (pp. 327-354). Elsevier.
- [15]. Aziz, Z. A., Ahmad, A., Setapar, S. H. M., Karakucuk, A., Azim, M. M., Lokhat, D., and Ashraf, G. M. (2018). Essential oils: extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential-a review. *Current drug metabolism*, 19(13), 1100-1110.
- [16]. Clevenger, J.F. (1928). Apparatus for the determination of volatile oil. *The Journal of the American Pharmaceutical Association* (1912), 17(4), 345-349.

- [17]. Cardoso-Ugarte, G.A., Juárez-Becerra, G.P., SosaMorales, M.E., López-Malo, A. (2013). *Microwave-assisted extraction of essential oils from herbs*. *Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy*, 47(1), 63-72.
- [18]. Chapuis F, Pichon V, Hennion MC. Méthode de préconcentration par extraction en phase solide : principe et application aux industries environnementales et pétrolières. *Oil Gas Sci Technol*. 2005; 60: 899–912.
- [19]. Humbert, L. (2010). Extraction en phase solide (SPE) : théorie et applications. In *Annales de Toxicologie Analytique* (Vol. 22, No. 2, pp. 61-68). EDP Sciences.
- [20]. Simpson, N. J. (2000). *Solid-phase extraction: principles, techniques, and applications*. CRC press.
- [21]. Pichon, V. (2006). *Extraction sur phase solide pour l'analyse de composés organiques*. Ed. Techniques Ingénieur.
- [22]. Bratkowska, D., Marcé, R. M., Cormack, P. A. G., Sherrington, D. C., Borrull, F., and Fontanals, N. (2010). Synthesis and application of hypercrosslinked polymers with weak cation-exchange character for the selective extraction of basic pharmaceuticals from complex environmental water samples. *Journal of Chromatography A*, 1217(10), 1575-1582.
- [23]. Arsenault, J. C. (2012). *Beginner's Guide to SPE: Solid-Phase Extraction*. Waters Corporation.
- [24]. Telepchak, M. J. (2004). *Forensic and clinical applications of solid phase extraction*. Springer Science & Business Media.
- [25]. Pawliszyn, J. (1997). Solid phase microextraction: theory and practice. John Wiley & Sons.
- [26]. Lord, H., and Pawliszyn, J. (2000). Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A*, 885(1-2), 153-193.
- [27]. Vaubourdolle, M. (2007). *Toxicologie, sciences mathématiques, physiques et chimiques*. Wolters Kluwer France.
- [28]. Pawliszyn, J. (2012). Theory of solid-phase microextraction. In *Handbook of solid phase microextraction* (pp. 13-59). Elsevier.
- [29]. BURGOT, G., and PELLERIN, F. (2003). Microextraction en phase solide (SPME). *Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation*, 2(P1430), p1430-1.
- [30]. Arthur, C.L., and Pawliszyn, J. (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 62(19), 2145-2148.

- [31]. Baltussen, E., Sandra, P., and David, F. (1999). Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles. *Journal of Microcolumn Separations*, 11(10), 737-747.
- [32]. Kokosa, J.M. (2004). Solid-phase microextraction in analysis of food aroma: theory and practice. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(7-8), 565-573.
- [33]. Vidal, L., and Canals, A. (2012). Recent advances in solid-phase microextraction for food and fragrance analysis—a review. *Analytica Chimica Acta*, 757, 1-15
- [34]. Nishikawa, M., Seno, H., Ishii, A., Suzuki, O., Kumazawa, T., Watanabe, K., & Hattori, H. (1997). Simple Analysis of Diphenylmethane Antihistaminics and Their Analogues in Bodily Fluids by Headspace Solid-Phase Microextraction—Capillary Gas Chromatography. *Journal of chromatographic science*, 35(6), 275-279.
- [35]. Kumazawa, T. (2016). Assays for Methamphetamine and Amphetamine in Blood. In *Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse* (pp. 360-374). Academic Press.
- [36]. Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017). *Principles of instrumental analysis*. Cengage learning.
- [37]. Biémont, E. (2008). *Spectroscopie moléculaire: Structures moléculaires et analyse spectrale*. De Boeck Supérieur.
- [38]. Yves H. Geerts. (2014). *Chimie analytique : Méthodes et techniques avancées*. De Boeck Supérieur.
- [39]. Bayle, J. P. (2008). *400 manipulations commentées de chimie organique* vol. 2. Ellipses, Paris.
- [40]. Grob, R. L., Barry, E. F. (Eds.). (2004). *Modern practice of gas chromatography*. John Wiley & Sons.
- [41]. Stark, E., Luchter, K., Margoshes, M. (1986). Near-infrared analysis (NIRA): A technology for quantitative and qualitative analysis. *Applied Spectroscopy Reviews*, 22(4), 335-399.
- [42]. Huang, Y., Gou, M. J., Jiang, K., Wang, L., Yin, G., Wang, J., Wang, T. (2019). Recent quantitative research of near infrared spectroscopy in traditional Chinese medicine analysis. *Applied Spectroscopy Reviews*, 54(8), 653-672.
- [43]. Chen, H., Ferrari, C., Angiuli, M., Yao, J., Raspi, C., Bramanti, E. (2010). Qualitative and quantitative analysis of wood samples by Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Carbohydrate polymers*, 82(3), 772-778.