

INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

LYON

CHIMIE ANALYTIQUE

3^{ième} ANNEE

**METHODES SEPARATIVES
ET
SPECTROSCOPIE MOLECULAIRE**

TRAVAUX PRATIQUES

D. DERUAZ

1993-1994

INTRODUCTION

Les travaux pratiques se déroulent sur trois demi-journées consécutives pour chaque groupe et comportent deux grandes parties : *l'analyse structurale , les méthodes séparatives et la spectrométrie UV.*

Lors de la première séance vous devez :

- vérifier que vous possédez toute la vaisselle dont vous aurez besoin pendant les trois jours
 - vérifiez que cette vaisselle est propre. La propreté de votre vaisselle vous incombe pendant toute la durée des TP
 - retirer votre échantillon inconnu de xanthine et votre suppositoire.
 - vérifiez que vous possédez suffisamment de solvants pour effectuer vos dilutions
- Durant toutes les séances les étudiants sont responsables de la vaisselle, du matériel et de la propreté des paillasses.

Les comptes rendus doivent être précis et concis et faire apparaître toutes les données permettant de juger de la qualité du travail effectué. Il sera tenu compte dans la note :

- de la présentation,
- de la propreté du lieu et de la vaisselle chaque soir à la fin de la séance.

Les comptes-rendus doivent être rapportés au plus tard à 17 heures le lundi qui suit la séance de travaux pratiques. *Tout retard sera impitoyablement sanctionné.*

Pour un soucis de clarté le compte rendu doit suivre l'ordre ci-dessous :

Dossier IR/EAO, dossier Analyse Elémentaire/IR/RMN, Extraction, Chromatographie planaire, Spectrométrie UV, CLHP

ATTENTION : Le matériel de TP est très cher. Exemple : un jeux de cuves pour spectrométrie UV en quartz 1500 F

Première partie

ANALYSE STRUCTURALE

Chaque étudiant doit interpréter les dossiers suivants

1 - Etude d'un spectre Infrarouge sur ordinateur en utilisant les données qui lui sont fournies:

a - par le programme d'*Enseignement Assisté par Ordinateur pour l'apprentissage de infrarouge*.

b - par le fascicule d'enseignements dirigés.

2 - Elucidation d'une structure à l'aide des données spectrales fournies par l'IR, la RMN et l'analyse élémentaire.

Chaque étudiant doit retirer ses dossiers au début de la séance du premier jour et les rendre à la fin du troisième jour avant de quitter la salle. Les comptes rendus doivent suivre l'ordre proposé dans le fascicule

Pour certains dossiers il est difficile de différencier entre deux ou trois structures. Dans ce cas il est fortement recommandé de citer toutes les structures possibles.

Pour faciliter l'interprétation de ces spectres il est conseillé de suivre la procédure utilisée en Enseignements Dirigés.

Chaque dossier doit obligatoirement comporter le numéro du spectre étudié.

ANALYSE STRUCTURALE

I - SPECTROSCOPIE INFRA-ROUGE SUR ORDINATEUR

Pour se déplacer utiliser les flèches.

1 EDITION

"Gestion des spectres"

"Charger un spectre" Donner le nom du spectre à étudier

Echappement

2 CONSULTATION

A une région. Donner les différentes indications lues pour les quatre régions

B une fréquence. Donner les indications lues pour une fréquence de votre spectre qui vous semble la plus caractéristique

C un groupe. Choisir les groupes utiles pour votre identification. Citez les. Conclusions.

D des groupes. Choisir les groupes utilisés précédemment.

E échappement.

3 COMPOSITION

Choisir "formule brute". Noter la composition élémentaire. Echappement.

4 ANALYSE

Choisir "composition utilisée". Noter toutes les informations données.

5 Donnez la ou les formules développées qui vous semble correspondre au spectre que vous venez d'étudier.

Pour vous aider vous pouvez choisir l'option "conseil" et suivre les instructions données.

6 Revenir à COMPOSITION

Choisir maintenant "aucune information". Confirmer par F10.

Reprendre les question 4 et 5.

Conclusion.

7 Choisir SUPPORT

Solvants

Tracer les spectres des différents solvants. Donner le nom du ou des solvants que vous devriez utiliser pour obtenir le spectre IR de la molécule étudiée.

II - INTERPRÉTATIONS DE DONNÉES SPECTRALES

I - BUT DE LA MANIPULATION :

Recherche de la structure d'un composé à l'aide de spectres infra-rouge, U.V., RMN.

Chaque spectre doit être étudié avec le maximum de précision. Tous les indices qui correspondent à une structure précise doivent être mentionnés sur le compte-rendu de T.P.

La notation tient compte de la précision apportée à la recherche de ces indices, de la présentation et de la réponse finale.

II - DOCUMENTS :

- 1 spectre infra-rouge
- 1 spectre de résonance magnétique nucléaire
- 1 spectre UV si le composé absorbe dans cette région
- Composition élémentaire

Deuxième partie

METHODES SEPARATIVES ET SPECTROMETRIE UV

Cette partie propose l'analyse qualitative et quantitative de xanthines.

Elle comporte

- 1 - L'extraction de caféine dans un mélange complexe (coca-cola, café....)
- 2 - L'analyse par chromatographie planaire de cette caféine extraite et des solutions de xanthines étalons
- 3 - Le dosage quantitatif par spectrométrie UV des solutions de xanthines identifiées par la chromatographie planaire
- 4 - L'extraction de la caféine de votre suppositoire réalisé en TP de Pharmacie Galénique
- 5 - L'étude de la séparation d'un mélange de ces mêmes xanthines par CLHP (chromatographie liquide haute performance). Utilisation de la méthode l'étalonnage interne pour l'analyse quantitative de la caféine contenu dans le mélange complexe et dans le suppositoire

Pour cette étude les étudiants travaillent par deux mais chaque étudiant doit rendre son propre compte-rendu.

Les rapports d'analyses doivent obligatoirement comporter le numéro d'identification de l'échantillon analysé.

Tous les résultats expérimentaux doivent être joint aux dossiers.

IR = EAO 19
192
Xanth 97

EXTRACTION DE LA CAFEINE

BUT DE LA MANIPULATION

Extraire la caféine d'un milieu complexe (coca-cola ou café) et d'un suppositoire.

TRAVAIL A REALISER

A - Pour le milieu complexe:

Dans une ampoule à décanter introduire :

2 ml de l'échantillon à analyser.

+ 1 g de sulfate d'ammonium

+ 10 ml de chloroforme

agiter doucement 5 mn sans rien perdre du mélange de phases.

Laisser décanter puis récupérer la phase chloroformique dans un tube de 20 ml.

Remarque importante: Vous devez récupérer la totalité de la phase qui contient la caféine.

Prendre un aliquote de 5 ml mesuré exactement pour la CLHP et l'évaporer doucement à sec (au bain marie sans perdre de phase). Puis reprendre par 2 ml de mélange méthanol-eau (50-50) pour l'analyse CLHP.

Evaporer à sec au bain marie le reste de l'extrait (environ 5 ml) et reprendre ce résidu par un volume de 30 μ l de CHCL₃ pour l'analyse par chromatographie planaire en prenant soin de bien rincer les parois du tube.

B - Pour le suppositoire:

Vous devez réaliser une double extraction.

Extraction 1:

Mettre dans un bécher de 100 ml le suppositoire et 10 ml d'eau (attention à la propreté de la verrerie et de l'eau). Mettre au bain -marie pour faire fondre le suppositoire, Attendre que toute la caféine soit tombée au fond du bécher. Laisser refroidir, enlever la coupelle de cire formée, verser les 10 ml d'eau dans un ballon de 100 ml et rincer le bécher avec 5 ml d'eau que vous verser aussi dans le ballon.

Extraction 2:

Recommencer toutes ces opérations.

Compléter le ballon jusqu'au trait de jauge par un mélange 50/50 méthanol-eau
Diluer au 1/50 avec le même mélange méthanol-eau.

RAPPORT D'ANALYSE

A - De quel matériel vous êtes vous servis (verrerie, solvants, etc.....). Décrivez les.

B - Décrivez les différentes opérations nécessaires pour ces extractions (échantillon, quantités, temps d'agitation exact.... Notez tous les arguments pouvant avoir une signification vis à vis de la validité des résultats

Peut-on améliorer les rendements d'extraction? Comment? Expliquez.

CHROMATOGRAPHIE PLANAIRE

BUT DE LA MANIPULATION

Séparer et identifier une xanthine inconnue à l'aide de solutions étalons.

TRAVAIL A REALISER

1 - Mettre dans la cuve de chromatographie 50 ml du mélange de solvants qui constituent la phase mobile (ammoniaque concentrée 10 vol., acétone 30 vol., chloroforme 30 vol., butanol 40 vol.)

Laisser l'atmosphère de la cuve se stabiliser pendant une heure avant de l'utiliser. Le couvercle doit être bien ajusté en permanence sur la cuve. (La cuve ne doit en aucun cas rester ouverte plus de quelques secondes).

2 - Préparer 10 ml de solutions étalons à 1 mg/ml (pesé exactement) de 1,3,7-tri méthyl xanthine (caféine), de 3,7-diméthyl xanthine (théophylline) et de 1,3-diméthyl xanthine (théobromine) dans un mélange butanol / chloroforme (40 / 60)

3 - Déposer à 1 cm. et demi du bas de la plaque de gel de silice 60 F 254 R sur une ligne en ayant soin de faire une tache la plus petite possible (déposer, laisser sécher, puis redéposer.....etc)

- 5 µl de chacune des trois solutions témoins

- 5 µl de la solution de xanthine inconnue qui se trouve dans 1 ml (environ) de butanol/chloroforme.

- l'extrait de coca-cola ou de café.

4 - Mettre à l'étuve à 60°C pendant 45 mn pour activer la plaque.

5 - Mettre la plaque chromatographique verticalement dans la cuve de développement.

Laisser développer sur 15 cm environ.

Important : ne pas laisser le front de solvant dépasser le bord supérieur de la plaque.

6 - Retirer la plaque. Laisser sécher sous la hotte et mesurer sous la lampe UV 254 nm les distances de rétention de chacun des composés élués et du front de solvant. Calculer les Rf (facteur de retard) par rapport à ce front de solvant. Identifier les composés inconnus à l'aide des Rf (pour l'extrait et la xanthine proposée)

RAPPORT D'ANALYSE

Le compte rendu doit comporter :

A - Le matériel utilisé (verreries, solvants,....)

B -

- 1 - les pesées exactes pour les trois étalons → 100 mg
- 2 - les distances mesurées sur la plaque chromatographique pour les cinq dépôts.
- 3 - les calculs et les indices de rétentions
- 4 - le nom de la xanthine contenue dans la solution inconnue.
- 5 - les caractéristiques de la plaque chromatographique qui a été utilisée.
- 6 - la référence du système chromatographique et les conditions opératoires.

CAFFAG
monome H

x = caféine

100 - e. callo

50 mg / 100 µl TB

SPECTROMETRIE ULTRAVIOLETTE

BUT DE LA MANIPULATION

Quantifier la xanthine identifiée par chromatographie planaire

TRAVAIL A REALISER

1 - Préparer à partir d'une solution mère aqueuse de la xanthine identifiée par chromatographie planaire trois dilutions à 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ et 20 $\mu\text{g/ml}$ (titre exact) et tracer la droite de calibration du spectromètre UV.

Répéter cette opération à partir de trois solutions mères différentes pour obtenir une moyenne statistique de la droite de calibration et tester votre précision pour effectuer des dilutions.

" Le verdict sera rendu par le spectromètre UV".

Pour diluer vous devez tenir compte:

- a - de la vaisselle dont vous disposez
- b - du fait qu'il est impératif dans une entreprise de tenir compte des coûts de production et donc d'utiliser la quantité minimum de solvant possible.

2 - Vérifier le zéro de l'appareil avec du solvant (eau) dans les deux cuves si l'appareil est double faisceau.

ATTENTION : Les cuves en quartz valent très chères.

3 - Mettre votre échantillon dans la cuve réservée à cet effet, l'autre contenant toujours le solvant (eau).

4 - tracer le spectre de cette solution sur un spectromètre, et noter la longueur d'onde d'absorbance maximum.

5 - mesurer à cette longueur d'onde sur l'un des spectromètres disponibles les absorbances des solutions préparées (9 mesures) et du blanc.

6 - mesurer, toujours à cette longueur d'onde, l'absorbance de votre solution inconnue diluée.

Remarques importantes

Les mesures d'absorbances doivent se situer dans la plage où la loi de Beer-Lambert est valide (cf. ED)

Si l'absorbance de votre solution inconnue n'est pas dans la gamme d'étalonnage, il faut alors faire une dilution de cette solution. En aucun cas une mesure quantitative ne peut se faire en dehors de la droite de calibration réalisée sur l'appareil.

RAPPORT D'ANALYSE

Le compte-rendu doit comporter

A - le matériel utilisé (verrerie, appareillage..etc)

B -

1 - le tracé du spectre UV

2 - la valeur de la longueur d'onde d'absorbance maximum

3 - la méthode de dilution que vous avez utilisée

4 - les valeurs d'absorbance du blanc et des mesures successives des concentrations

5 - les calculs de la droite de régression obtenue pour les quatre valeurs avec son coefficient de régression. Pensez vous que la réponse est linéaire?

6 - l'équation de cette droite

7 - le tracé de cette droite de régression

8 - à quoi correspond la pente de cette droite? Pourquoi? Passe t elle par zéro? Sinon quelle est votre explication?

9 - Les calculs d'erreurs.

100 mg → 100 - l.
mis dil. $\frac{1}{50} \rightarrow 20 \mu\text{g}/\text{ml}$
 $\frac{1}{2} \rightarrow 10$
 $\frac{1}{6} \rightarrow 5$

$\frac{1}{1000}, \frac{1}{200}, \frac{1}{400}$

CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

BUT DE LA MANIPULATION

Calculer l'efficacité de la colonne.

Identifier par les temps de rétentions les composés élués et calculer leur concentration en utilisant la méthode de l'étalon interne

TRAVAIL A REALISER

I - Etude du dossier

Sur chaque chromatogramme de solution témoin mesurer les distances de rétention.

Sur chaque chromatogramme de solution inconnue identifier les pics élués (quantité injectée

20 μl de chaque solution à 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) → 2,5 μg

Pour chaque pic mesurer sa surface

Pour chaque pic calculer l'efficacité de la colonne

Dans les trois solutions témoins calculer le coefficient de réponse de l'appareil pour la caféine par rapport à la théophylline. Calculer la réponse moyenne.

En prenant la théophylline comme étalon interne (concentration indiquée sur les dossiers) calculer la concentration de la caféine dans les trois solutions inconnues. Calculer la réponse moyenne en mg/ml.

II - Travail sur l'appareillage CLHP.

I - Calibrage

Préparez 20 ml de trois solutions de caféine (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, à 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) dans le mélange méthanol/eau (50/50) que vous utiliserez pour le calibrage de l'appareil CLHP.

II - Analyses

Injecter le mélange de trois Xanthines (concentration 50 µg/ml). Identifier grâce aux temps de rétention lus dans le dossier fourni les trois composés élués.

Injecter les trois solutions de référence de caféine (25 µg / ml, 50 µg / ml, 100 µg / ml) puis votre extrait de mélange complexe (coca-cola ou café) et celui de votre suppositoire.

Remarque: pour le café diluer au 1/10 votre solution.

Les surfaces des composés à quantifier doivent toujours être comprises entre les concentrations extrêmes de la courbe de calibration.

Pour injecter remplir la boucle de 20 µl à l'aide d'une seringue en évitant la formation de bulles d'air (utiliser 75 µl pour être sûr de bien remplir la boucle).

Sur le tracé chromatographique obtenu, on observe un pic de Tr identique à celui du pic obtenu pour le tracé des solutions de référence de la caféine.

RAPPORT D'ANALYSE

A - Matériel utilisé (verrerie, dénomination de l'appareil utilisé, sensibilité utilisée, préparations des échantillons, quantités injectées etc...)

B - Pour le dossier

Le compte rendu doit comporter outre son numéro d'identification toutes les données nécessaires:

- 1 - aux calculs des temps de rétention
- 2 - aux calculs des surfaces
- 3 - aux calculs des coefficients de réponse K (Caf / Théoph).
- 4 - aux calculs des concentrations de la caféine par la méthode de l'étalon interne.
- 5 - aux calculs d'erreurs.

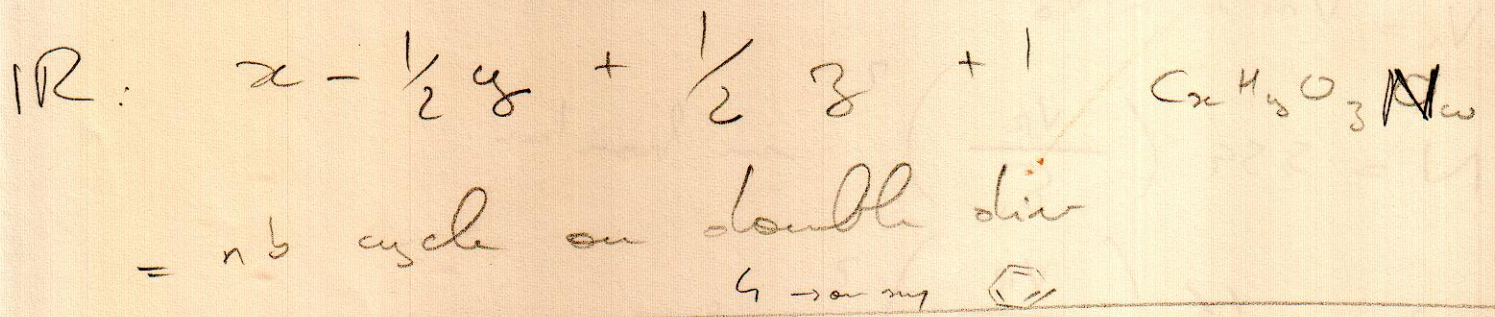
C - Pour le tracé chromatographique

Le compte rendu doit comporter toutes les données nécessaires :

- 1 - aux calculs des temps de rétention
- 2 - aux calculs des surfaces
- 3 - au tracé de la droite de régression
- 4 - aux calculs de la concentrations pour vos caféines extraites
- 5 - aux calculs d'erreurs. Calculer l'intervalle de confiance à 95% pour la réponse (voir ED).

A = unités arbitraires.

Spectro physique. (Data jet integration)



- A \Rightarrow 3200 \leftarrow -OH NH
- B : 3100 = 3000 = CH
- C : 3000 \leftarrow 2700 - CH
- D \circ : 1800 \leftarrow 1600 : C=O
- E 1600 \leftarrow 1400 : -C=C-
- F : 1200 \leftarrow 1000 : C-O C-N

$$5 - \frac{1}{2} \cdot 8 + \frac{1}{2} \cdot 2$$

$$= 5 - 4 + 1 + 1$$

$$= 1 + 1 + 1$$

$$= 3$$

E
 X
 S
 R \rightarrow $n \rightarrow \pi^*$
 $\pi \rightarrow \pi^*$ conjugate
 benzoin

$$R_f = \frac{1}{1 + K'}$$

$$K' = \frac{R_f V_s}{V_m}$$

$$t = \frac{x_i - \bar{x}}{s}$$

$$x_i = \bar{x} \pm t \cdot s$$

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

erreur absolue : $x - p$
 relative : $\frac{x-p}{x}$

$$V_n = V_m + K V_0$$

$$N = 5,59 \left(\frac{V_R}{\delta} \right)^2 \quad \text{mi hantun.}$$

$$N = 16 \left(\frac{V_R}{\omega} \right)^2 \rightarrow \text{base}$$

$$N = \frac{V_n^n}{\delta} \quad \text{cont type}$$

$$\text{HEPT} = \frac{Q}{N}$$

selectivity $\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$

$$K' = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{K V_n}{V_m} = \frac{V_n - V_m}{V_m}$$

resolution $R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{\omega_2 + \omega_1}$

$m_c = (K_c) A_c$ \rightarrow coef de réponse.
 $m_i = (K_i) A_i$ $\frac{\text{coef.}}{\text{théor}} = \frac{K_{\text{col}}}{K_{\text{theo}}}$

$$m_i = m_c \frac{K_i A_i}{K_c A_c}$$

$$m_i = \text{dic.} m_c \cdot \frac{A_i}{A_c}$$

I analyse structure

a) IR in ordi

b) donnée IR RMN UV + HPLC

II extract

a) café

b) mffo

III CCM
témoin + X > Z

IV UV

a) g étalon. (cf 1mg / -l
TP 1-g / -l
TB 0,5-g / -l.

b) inconnu

V HPLC

a) Etalons | méthage
caféine

b) échant. café + mffo (libre)

extrac^o coffee.

A. matos

ampoule à décanter.

pyette & traits: = 10 - l

5 - l

~~balance~~ balance, tubes à essai.

$\varnothing \rightarrow 3,5$
 $\leftarrow 9,9$
 $14,5$

~~1,6~~
~~9,2~~
 $1,5$
 $9,2$

2,95	t_{r1}	2,83	ω_1	0,46
2,51	t_{r2}	4,14	ω_2	0,63
3,02	t_{r1}	2,83	ω_1	0,43
2,56	t_{r2}	4,13	ω_2	0,64
3,12	t_{r1}	2,83	ω_1	0,43
2,62	t_{r2}	4,15	ω_2	0,63 0,65

$8,8$
 14

3,45	2,95	t_{rI}	2,83	ω_{I}	0,43
2,98	2,51	t_{rII}	4,14	ω_{II}	0,64

1,5

$$\frac{\pi_i = \alpha_i A_i}{\pi_e = \alpha_e A_e}$$

$2 \rightarrow 5,5$

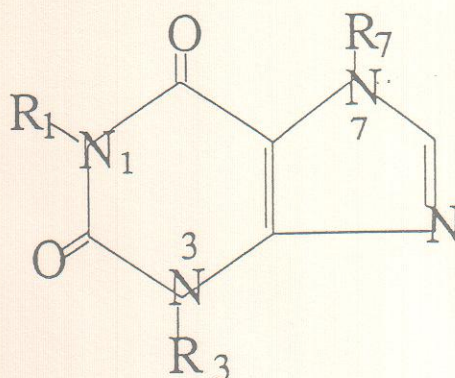
$1 \rightarrow 2,75$

$$\frac{\alpha_i}{\alpha_e} = \frac{\pi_i}{\pi_e} \frac{A_e}{A_i}$$



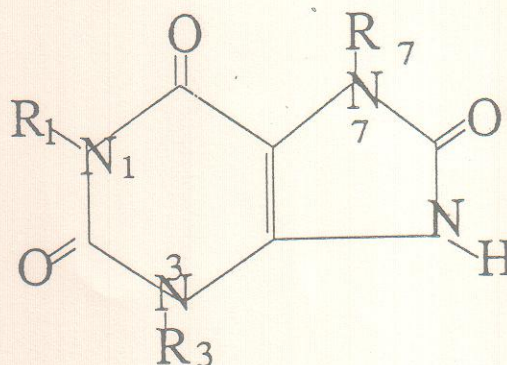
Tableau I: STRUCTURE CHIMIQUE DES METHYLYXANTHINES
ET DES ACIDES METHYLURIQUES.

STRUCTURE DES
METHYLYXANTHINES



		R1	R3	R7
CAF:	1,3,7-triméthylxanthine	CH3	CH3	CH3
1,3-MX:	1,3-diméthylxanthine	CH3	CH3	H
1,7-MX:	1,7-diméthylxanthine	CH3	H	CH3
3,7-MX:	3,7-diméthylxanthine	H	CH3	CH3
1-MX:	1-méthylxanthine	CH3	H	H
3-MX:	3-méthylxanthine	H	CH3	H
7-MX:	7-méthylxanthine	H	H	CH3

STRUCTURE DES ACIDES
METHYLURIQUES



		R1	R3	R7
TMU:	Acide 1,3,7-triméthylurique	CH3	CH3	CH3
1,3-MU:	Acide 1,3-diméthylurique	CH3	CH3	H
1,7-MU:	Acide 1,7-diméthylurique	CH3	H	CH3
3,7-MU:	Acide 3,7-diméthylurique	H	CH3	CH3
1-MU:	Acide 1-méthylurique	CH3	H	H
3-MU:	Acide 3-méthylurique	H	CH3	H
7-MU:	Acide 7-méthylurique	H	H	CH3

Tableau II QUELQUES CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES DES METHYLXANTHINE ET DES ACIDES METHYLURICIQUES

(ep) : épaulement.

	Formule brute	Poids moléculaire	Aspect de la poudre	Point de fusion °C	Solubilité	Maxima d'absorption en UV nm (1)	nm (2)	nm(3)
1,3,7-MX (CAF)	C8 H10 N4 O2	194.20	Blanche	234.9-235.8	1g/10ml CHCl ₃	273	-	205
1,3-MX	C7 H8 N4 O2	180.17	Blanche	271.9-272.3	1g/100ml C ₂ H ₅ OH à chaud	272	-	205
1,7-MX	C7 H8 N4 O2	180.17	Blanche	294	-	270	-	203
3,7-MX	C7 H8 N4 O2	180.17	Blanche	296	1g/100ml NaOH 6N à chaud	274	-	206
1-MX	C6 H6 N4 O2	166.14	légèrement jaune	-	1g/20ml NaOH 1N	270	-	204
3-MX	C6 H6 N4 O2	166.14	jaune clair	300	1g/50ml HCl à chaud	269	-	205
7-MX	C6 H6 N4 O2	166.14	légèrement beige	-	1g/20ml NH ₃ 10% à chaud	270	-	208
Xanthine	C6 H6 N4 O2	166.14	légèrement beige	-	-	267	-	200
1,3,9-MX	C7 H8 N4 O2	180.17	presque incolore	-	-	268	237	202
1,9-MX	C7 H8 N4 O2	180.17	presque incolore	-	-	270	249	203
3,9-MX	C7 H8 N4 O2	180.17	Cristalline, jaunâtre	300	-	268	236	201(ep)
1,3,7-MU (TMU)	C8 H10 N4 O3	210.19	En aiguilles fines, blanche	300	1g/10ml NaOH 1N	298	-	217(ep)
1,3-MU	C7 H8 N4 O3	196.17	Blanche	-	0.1g dans NH ₃ 1N	296	247(ep)	208
1,7-MU	C7 H8 N4 O3	196.17	Cristalline, blanchâtre	300	-	296	242	207
3,7-MU	C7 H8 N4 O3	196.17	En granules, blanche	300	1% dans NaOH 6N à chaud	298	247(ep)	217
1-MU	C6 H6 N4 O3	182.14	Légèrement beige	-	1g/10ml NaOH 1N à chaud	292	236	205
3-MU	C6 H6 N4 O3	182.14	Légèrement beige	-	1g/20ml NaOH 5N à chaud	295	245(ep)	211
7-MU	C6 H6 N4 O3	182.14	Légèrement beige	-	-	295	238	204
1,9-MU	C7 H8 N4 O3	196.17	Blanche	-	-	294	239	207
3,9-MU	C7 H8 N4 O3	196.17	Blanche	-	-	294	233	-
7,9-MU	C7 H8 N4 O3	196.17	Blanche	300	-	298	243	211

formule brute : $C_2 H_4 O_2$

analyse : * ac carboxylique

1710 cm^{-1} forte et large

3100 omg fat et tres large

1250 ————— omg

920 ————— omg large

* alkyli

2860 fat et fine

2870 —————

1430 omg —————

↳ acide acétique.

solvant : interférence à \ominus avec le spectre.

~~CS₂~~ → CCl_4

CCl_4

de MARE.

de la sol ptima
par control.

→ dilu^o de cal^o cu 1/10 : prim 1ml, aganta^o a 3-l
de solvent.

→ un HPLC : prim copl
identific^o des pic^o gr^oca e un sol^o etalon
de 50 mg/l.
de 50 mg/l.
de 50 mg/l.

- etalonage : gr^oca un sol de cal^o cu
= 100, 50, 25 mg/l.
- etalonage cal^o de mg/l.

c- rezultate

prim	t _r	aire (uniti arbitrare)	conc mg/l
TB	1,56	534083	50
TP	2,13	616365	
cal	2,55	675586	100
etalon	2,54	13002505	50
	2,55	733389	25
	2,52	306715	
cal 1/100	2,55	779107	2,1 (1/100)
sup ^o 1/50	2,55	1035335	2,2 (1/50)

D - traci de la date de regresia.

E - calcul

$$A_{max} = a \cdot [C] + b$$

$$a = 13006$$

$$b = 22159$$

HPLC.

A. matériel

- balance Mettler H80
- ballons $100 \pm 0,1$ ml.
- pipette graduée $10 \pm 0,075$
- pipette double trait $5 \pm 0,023$ - l
- appareil d'HPLC spectrophysique (Isocrone LC 10mg + Data jet integrator)
- caféine cristalline
- ~~substance~~ ~~de~~ ~~café~~ ~~préparée~~ ~~précédemment~~.
- mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{acn}$ (25/75).

B. mode opératoire

- préparation de la solution étalon
- peser 100 mg de caféine, dissoudre dans 100 l de solvant de mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{acn}$. ($\rightarrow 1000 \text{ pg}/\text{l}$).
- cette solution est diluée au $1/10^e$ (prise : 10 - l par pipette graduée, ~~complète~~ \rightarrow 100 - l de solvant) ($\rightarrow 100 \text{ pg}/\text{l}$).

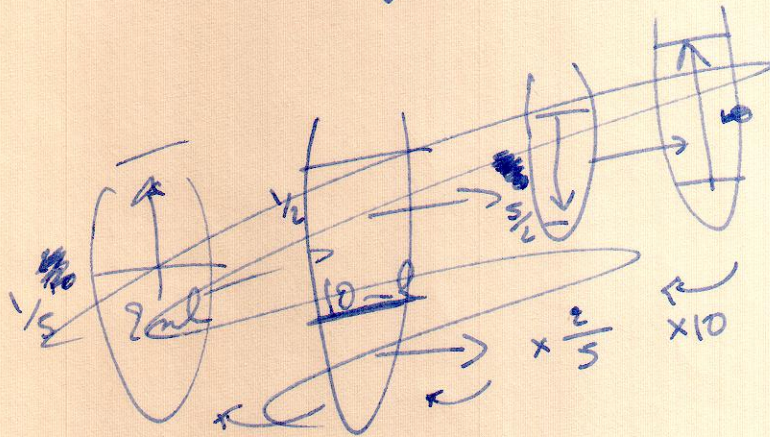
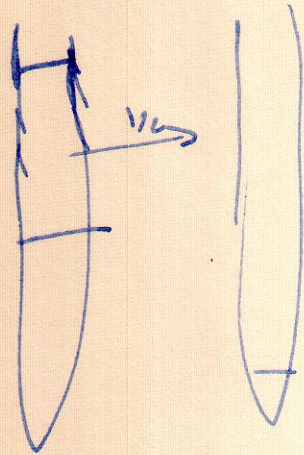
~~100 pg/l~~ (au $1/10^e$)
une autre dilution est effectuée sur la sol à $1000 \text{ pg}/\text{l}$ (prise : 5 - l, complétée à 100 - l de solvant) ($\rightarrow 50 \text{ pg}/\text{l}$).

la dilution est effectuée sur la sol à $1000 \text{ pg}/\text{l}$ est redilué à partir de celle à $50 \text{ pg}/\text{l}$ (prise 10 - l + 10 - l de solvant)

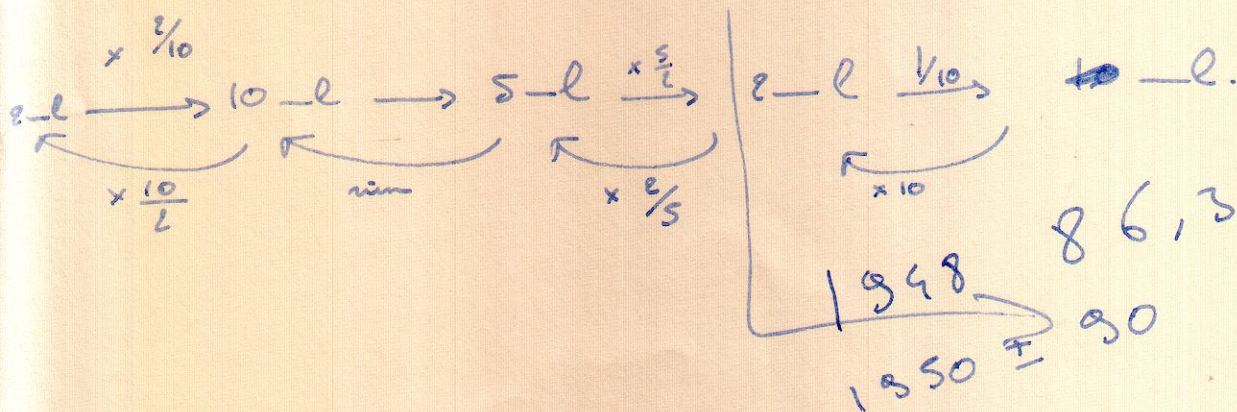
$$[c] = \frac{A - b}{a}$$

gam b capc (1/100): [c] = 58, ~~20~~ 20 pg/l.

mpp (1/500): [c] = 77,9986 pg/l.

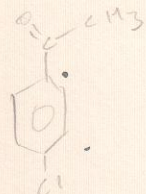


$$\frac{2 \times 10}{5} = 4$$

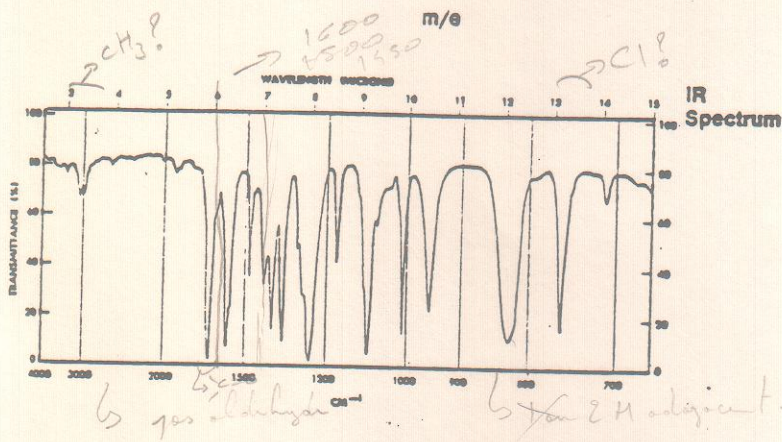
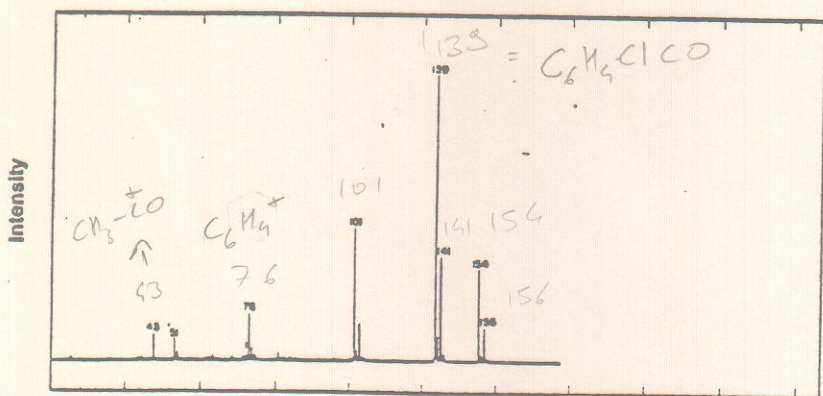


192

Compound (b.p. 273°, m.p. 18°) can be prepared by a Friedel-Crafts acylation of a substituted benzene with acetyl chloride. Notice that in the mass spectrum two abundant isotopes are present in the molecular ion. What common element is composed of two isotopes in a natural abundance ratio of about 3:1? UV-2.7 mg./100 ml.; IR-liquid film.

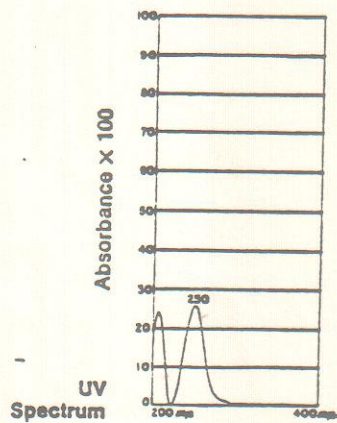
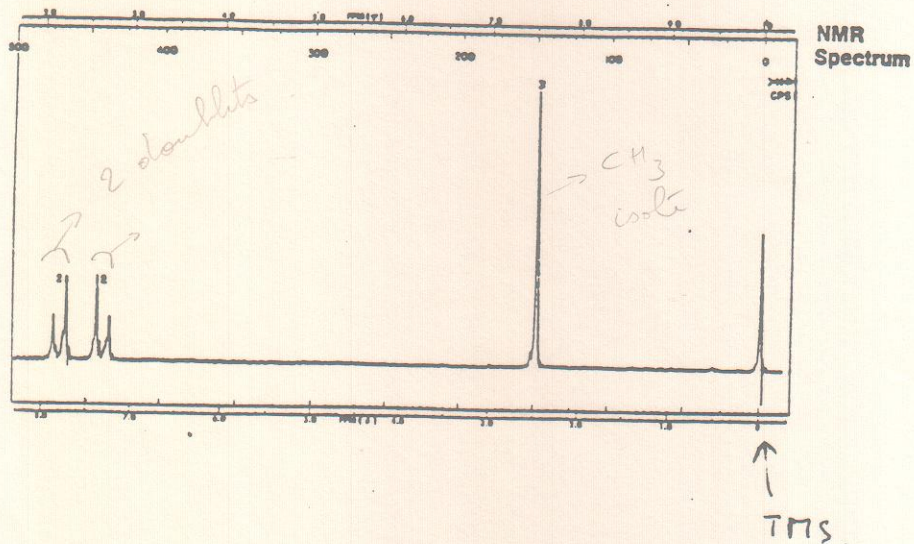


Mass Spectrum



Notes on spectra:

P 100
P+1 8.64
P+2 —



ANAELEM.XLS

ANALYSE ELEMENTAIRE			
Echantillon	192		
Poids Moléculaire	154,5	g	
Poids de l'échantillon pour le dosage de C et H	0,55	g	
Masse de CO2	1,253	g	
Masse de H2O	0,224	g	
% d'azote	0,00		
% de chlore	22,98		
% de brome	0,00		

REGLES D'ECRITURE POUR RENDRE UN RESULTAT NUMERIQUE

FICHE TECHNIQUE

- 1 - UN RÉSULTAT NE DOIT S'EXPRIMER QU'AVEC DES CHIFFRES SIGNIFICATIFS
- 2 - LES CHIFFRES SIGNIFICATIFS SONT LES CHIFFRES AFFECTES PAR L'INCERTITUDE ABSOLUE ET TOUS LES CHIFFRES PLACÉS À LEUR GAUCHE.
LA PLACE DE LA VIRGULE N'INTERVIENT PAS DANS CETTE DÉTERMINATION
- 3 - ON DOIT ARRONDIR LE DERNIER CHIFFRE SIGNIFICATIF (CF. RÈGLE D'ARRONDI)
- 4 - POUR TROUVER LE NOMBRE CORRECT DE CHIFFRES SIGNIFICATIFS, IL CONVIENT TOUJOURS D'ÉVALUER L'INCERTITUDE (CF. FICHE ÉVALUATION DE L'INCERTITUDE)
- 5 - PLACE DE LA VIRGULE : TOUT RÉSULTAT SCIENTIFIQUE DOIT ÊTRE ÉCRIT EN NOTATION SCIENTIFIQUE À VIRGULE FLOTTANTE (PUISSANCE DE 10) EN OBSERVANT LES CONVENTIONS SUIVANTES :
 - A) ON ÉCRIT 1 SEUL CHIFFRE SIGNIFICATIF DEVANT LA VIRGULE
 - B) TOUTEFOIS LORSQUE LA PUISSANCE DE 10 EST -2, -1, +1, +2, ON TOLÈRE L'ÉCRITURE À VIRGULE FIXE (SANS PUISSANCE DE 10) À CONDITION QU'ON NE FASSE PAS AINSI APPARAÎTRE DE ZÉROS COMME CHIFFRES SIGNIFICATIFS ALORS QU'ILS NE LE SONT PAS.

REGLES D'ARRONDI

FICHE TECHNIQUE

- 1 - POUR ARRONDIR UN NOMBRE AU CHIFFRE DE RANG N , ON SUPPRIME LES CHIFFRES DE RANG $N + 1$
- 2 - LE CHIFFRE DE RANG N RESTE INCHANGÉ SI LE CHIFFRE DE RANG $N + 1$ EST TEL QUE SA VALEUR V SOIT COMPRIS ENTRE 0 ET 4 : $0 \leq V \leq 4$
- 3 - LE CHIFFRE DE RANG N EST AUGMENTÉ D'UNE UNITÉ SI LE CHIFFRE DE RANG $N + 1$ EST TEL QUE SA VALEUR V SOIT COMPRISE ENTRE 5 ET 9 :
 $5 \leq V \leq 9$

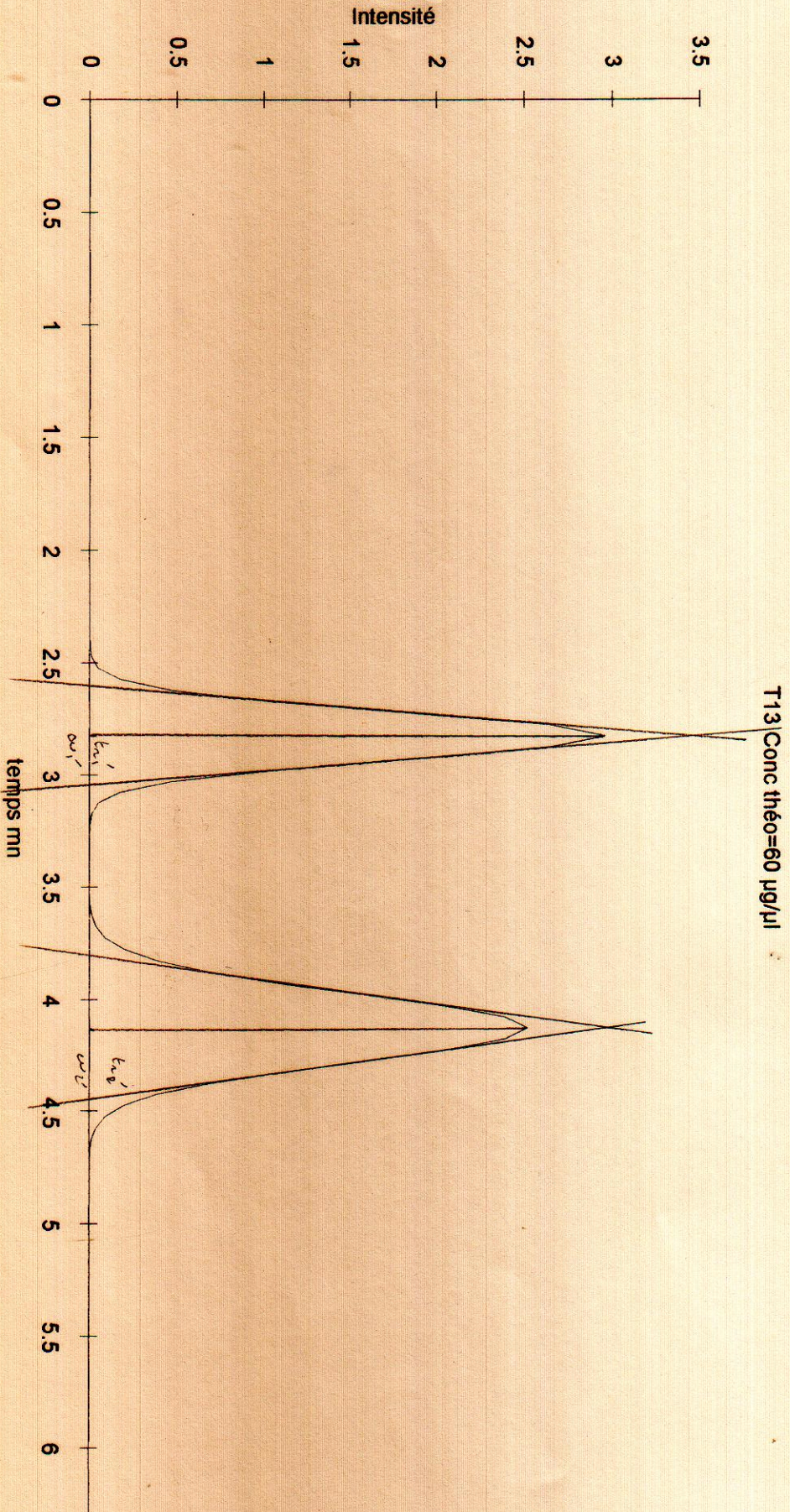
REGLES D'EVALUATION DE L'INCERTITUDE D'UN RESULTAT

FICHE TECHNIQUE

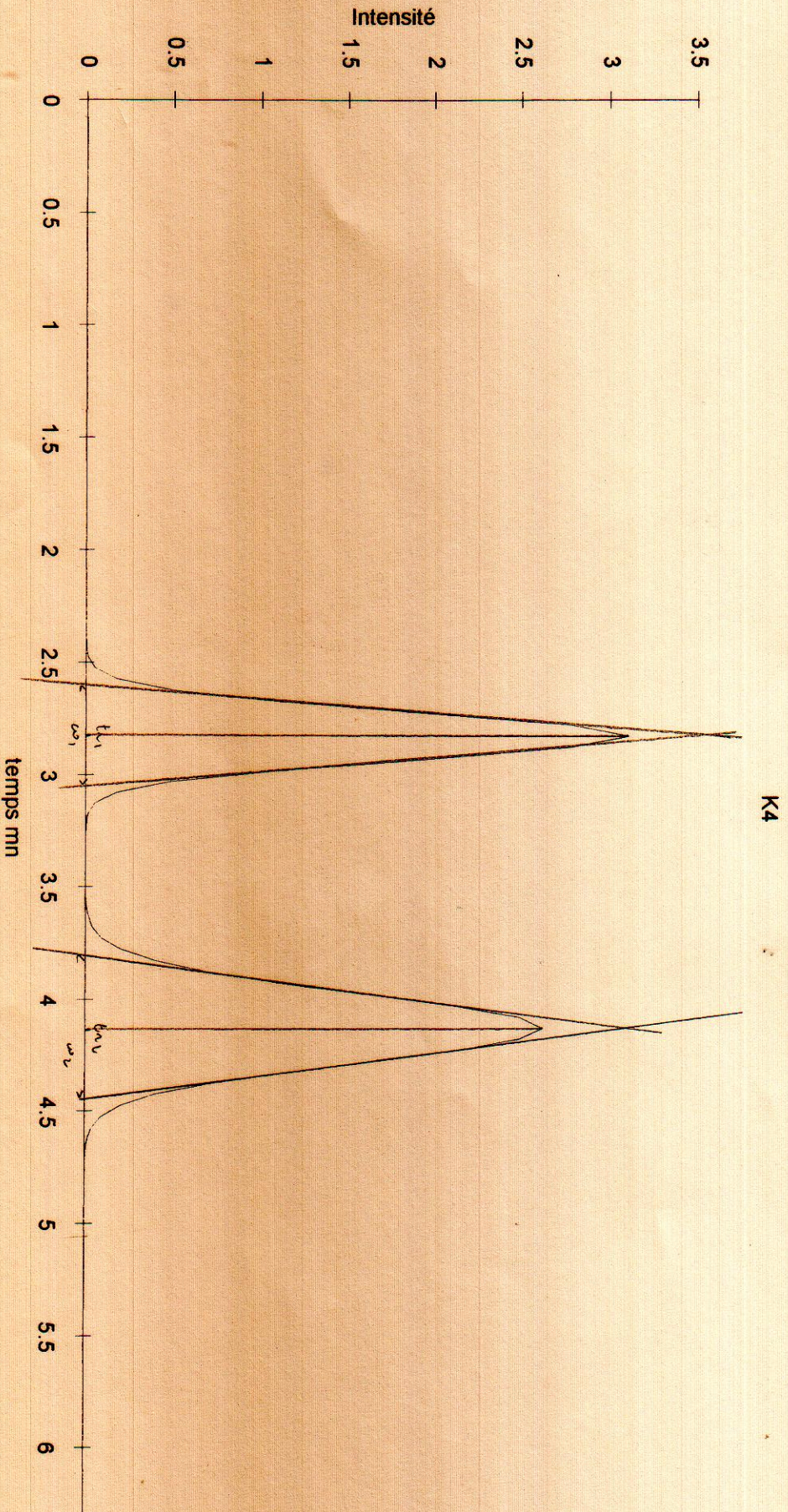
- 1 - LORSQU'ON NE VEUT PAS EXPLICITER L'INCERTITUDE DANS L'ÉCRITURE D'UN RÉSULTAT, L'INCERTITUDE DOIT TOUJOURS ÊTRE INFÉRIEURE À UNE UNITÉ DU DERNIER CHIFFRE SIGNIFICATIF (INCERTITUDE IMPLICITE)
- 2 - LORSQU'ON VEUT EXPLICITER L'INCERTITUDE DANS L'ÉCRITURE D'UN RÉSULTAT, (INCERTITUDE EXPLICITE), L'INCERTITUDE DOIT TOUJOURS S'EXPRIMER AVEC UN CHIFFRE SIGNIFICATIF, ON ADMET 2 CHIFFRES LORSQUE LE CALCUL D'ERREUR S'EST EFFECTUÉ PAR DES MÉTHODES STATISTIQUES
- 3 - DANS UN CALCUL :
 - A) ON COMMENCE PAR EFFECTUER TOUTES LES OPÉRATIONS AVEC TOUS LES CHIFFRES SIGNIFICATIFS DONT ON DISPOSE
 - B) PUIS ON ÉVALUE MENTALEMENT L'INCERTITUDE DU RÉSULTAT EN UTILISANT LES RÈGLES DU CALCUL D'ERREUR ET LES INCERTITUDES (IMPLICITES OU EXPLICITES) DES VALEURS EXPÉRIMENTALES
- 4 - POUR LES CALCULS SIMPLES N'UTILISANT QUE LES 4 OPÉRATIONS, ON UTILISE LES 2 THÉORÈMES SUIVANTS DU CALCUL D'ERREUR :
 - A) L'INCERTITUDE ABSOLUE D'UNE SOMME OU D'UNE DIFFÉRENCE EST INFÉRIEURE À LA SOMME DES INCERTITUDES ABSOLUES
 - B) L'INCERTITUDE RELATIVE D'UN PRODUIT OU D'UN QUOTIENT EST INFÉRIEURE À LA SOMME DES INCERTITUDES RELATIVES
- 5 - POUR LES CALCULS COMPLEXES, ON UTILISE LE THÉORÈME DE LA DIFFÉRENTIELLE TOTALE
SI U EST UNE FONCTION DE $(x, y, z \dots)$

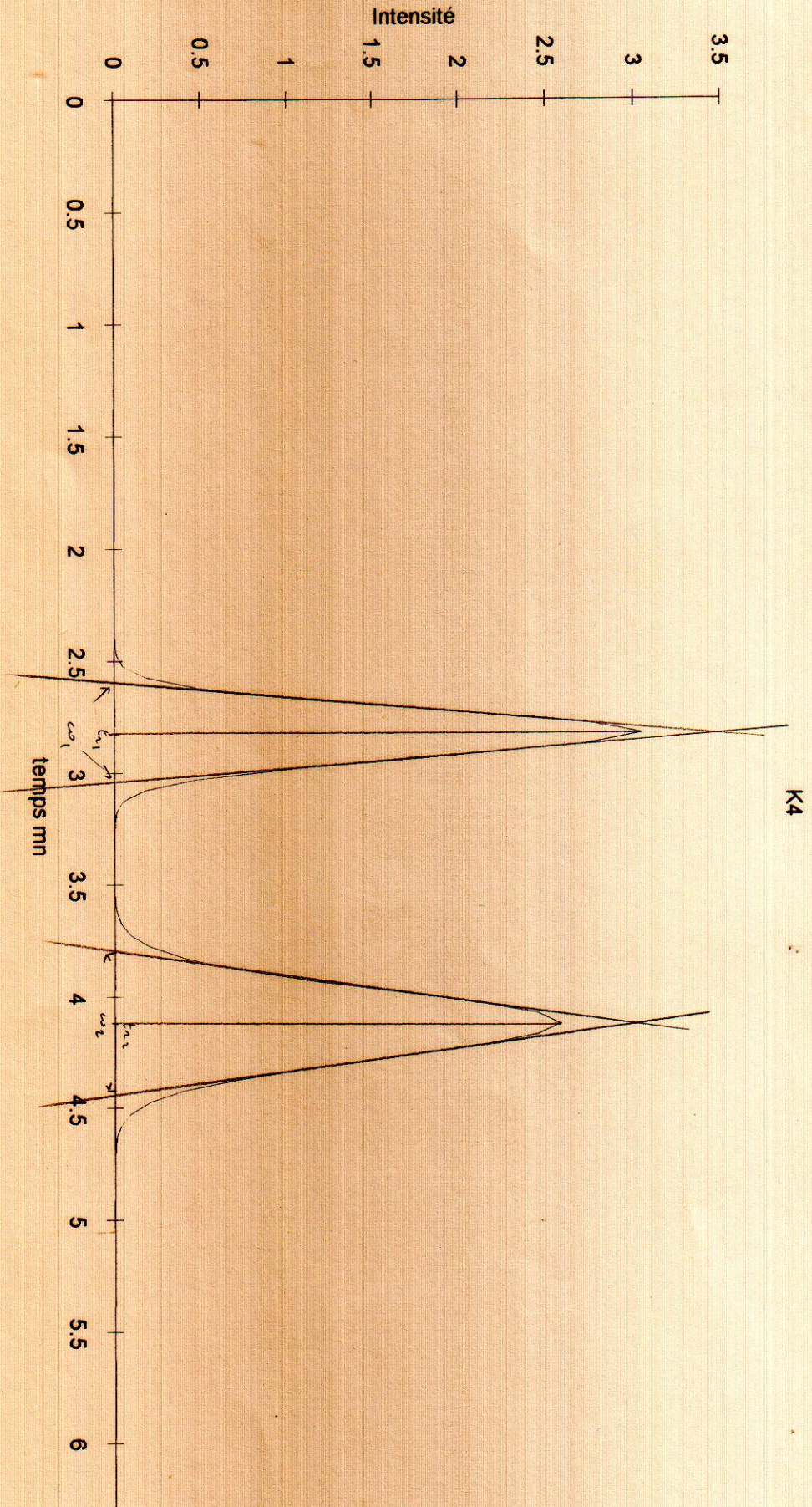
$$|\Delta U| \leq \left| \frac{\delta U}{\delta x} \right| |\Delta x| + \left| \frac{\delta U}{\delta y} \right| |\Delta y| + \dots$$

GRAPHIQUE.XLC



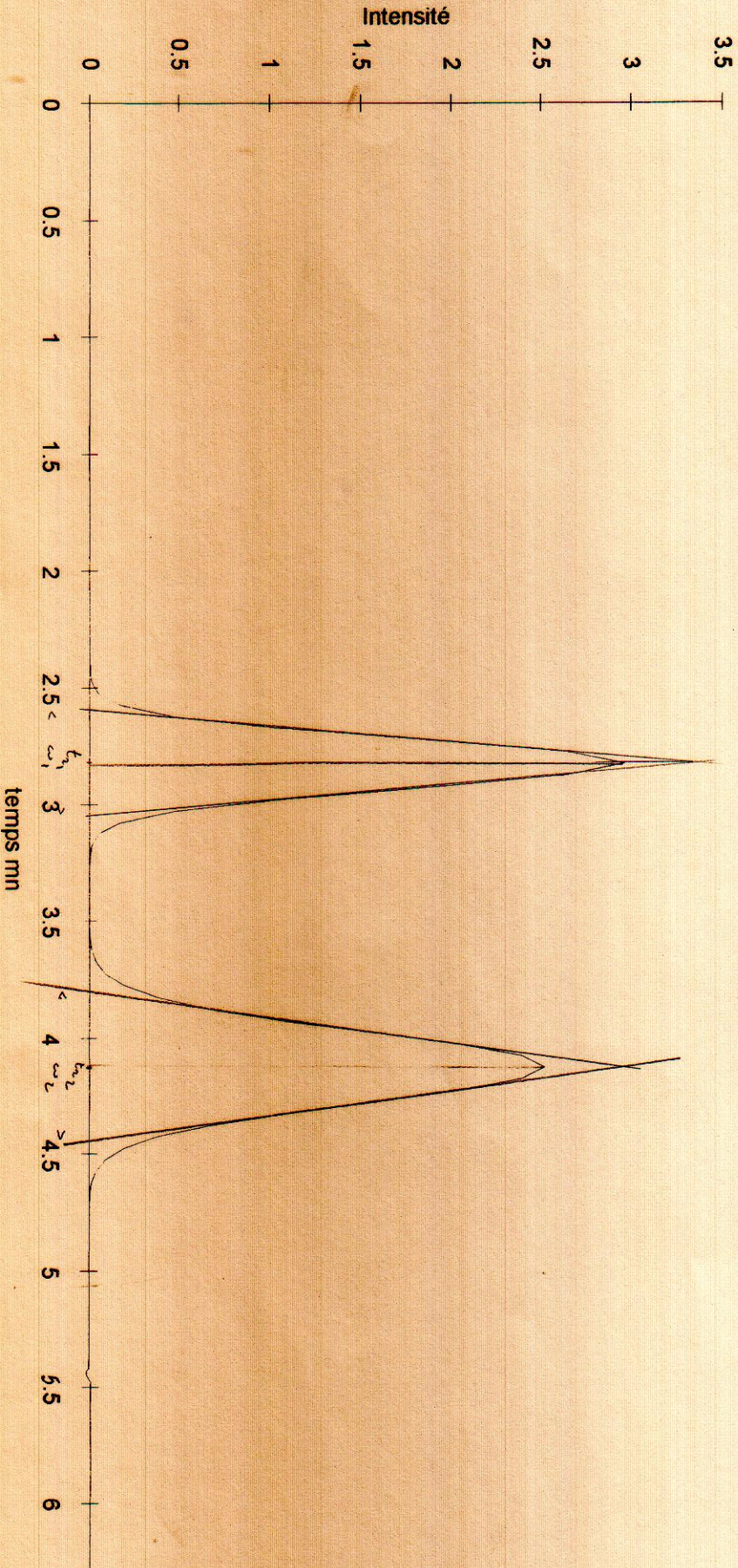
GRAPHIQUE.XLC





GRAPHIQUE.XLC

K4



CALIBRATION/CONCENTRATION

13-04-1994 17:54

Nbre.	Nominal	Mesure_E
1	0.0000	0.0236_1
2	5.0000	0.2909_2
3	5.0000	0.2598_3
4	5.0000	0.2687_4
5	10.000	0.5286_5
6	10.000	0.5005_6
7	10.000	0.5045_7
8	20.000	1.0304_8
9	20.000	0.9584_9
10	20.000	1.0246_0

KONTRON INSTRUMENTS

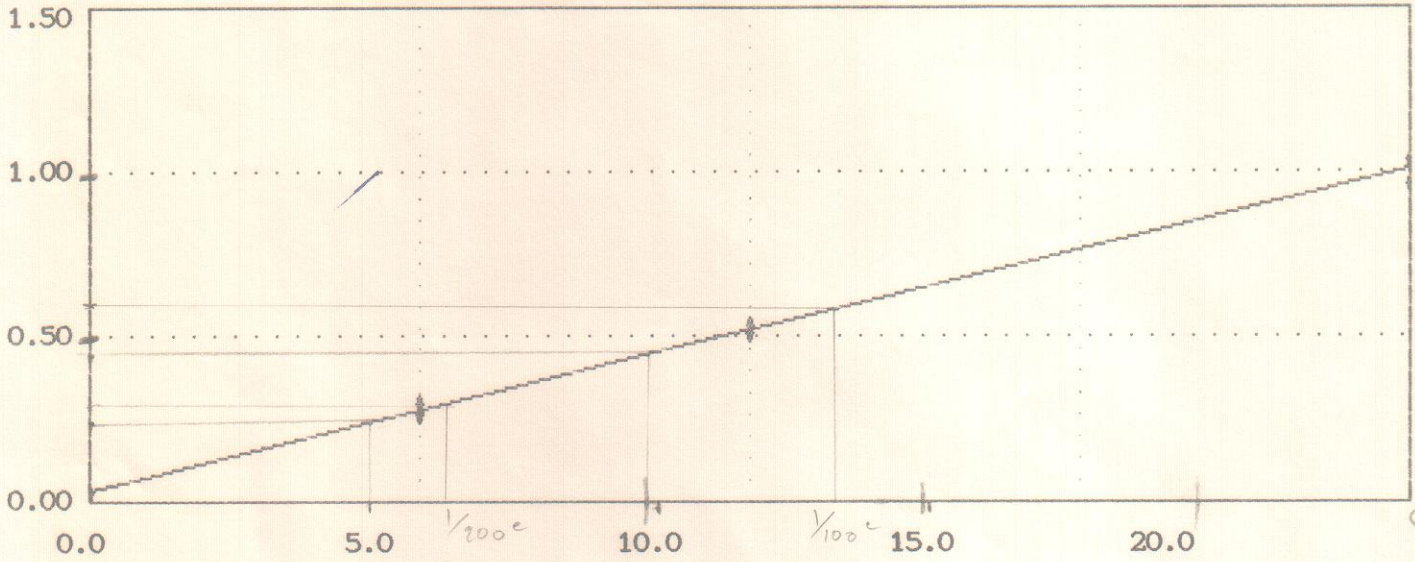
UVIKON 930

CALIBRATION/CONCENTRATION

13-04-1994 17:55

Coéfficient RegLin A..... 0.0489009023
Coéfficient RegLin B..... 0.0255405866

Dév std = 0.0011 CD = 0.9963



KONTRON INSTRUMENTS

UVIKON 930

LONGUEUR D ONDE FIXE

13-04-1994 18:01

Lambda	No.	Valeur_E	Valeur_E	Valeur_E	Valeur_E
273.0	1	1.1283_1	1.2061_2	2.3412_3	

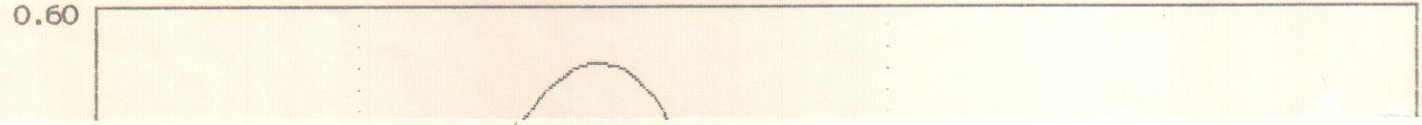
KONTRON INSTRUMENTS

UVIKON 930

BALAYAGE SPECTRAL

13-04-1994 18:04

Ymin = 0.0032 Ymax = 0.5302



LONGUEUR D ONDE FIXE

13-04-1994 18:19

Lambda	No.	Valeur_E	Valeur_E	Valeur_E	Valeur_E
273.0	1	0.1624_1	0.3066_2	0.6123_3	0.0246_4

LONGUEUR D ONDE FIXE

13-04-1994 18:29

Lambda	No.	Valeur_E	Valeur_E	Valeur_E	Valeur_E
273.0	1	0.1624_1	0.3066_2	0.6123_3	0.0246_4

LONGUEUR D ONDE FIXE

13-04-1994 18:30

Lambda	No.	Valeur_E
273.0	1	0.1624_1

LONGUEUR D ONDE FIXE

Résultats de Concentration

13-04-1994 18:32

MODE CALC..... Facteur conc
Unités..... mg/l

Ech. 1	Ech. 2	Ech. 3	Ech. 4
Conc	Conc	Conc	Conc
3.1636	5.9723	11.928	0.4798
<i>1/100</i>	<i>1/200</i>	<i>1/200</i>	<i>blanc</i>

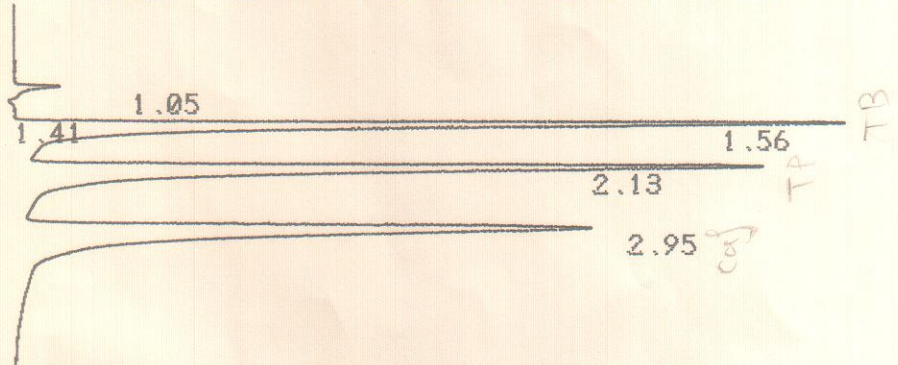
KONTRON INSTRUMENTS

UVIKON 930

12,5/10

Melangedo
Xanthino
90/10

CHANNEL A INJECT 13-04-94 16:12:31 STORED TO BIN # 88



DATA SAVED TO BIN # 88

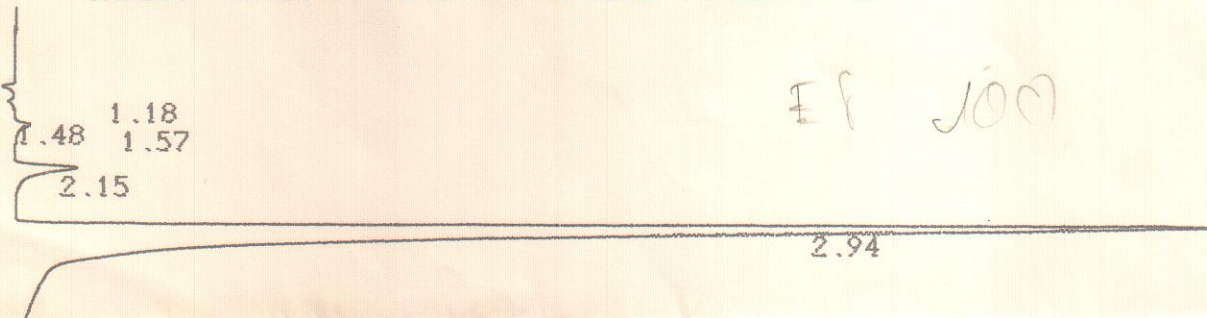
13-04-94 16:12:31 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 344 INDEX 344 BIN 88

PEAK#	AREA%	RT	AREA BC
1	29.232	1.56	534083 02
2	33.769	2.13	616965 02
3	36.999	2.95	675986 03
TOTAL	100.		1827034

WARNING - MEMORY AT 1. K - UNPROTECTED CHROMATOGRAMS WILL BE REPLACED

CHANNEL A INJECT 13-04-94 16:19:14 STORED TO BIN # 89



DATA SAVED TO BIN # 89

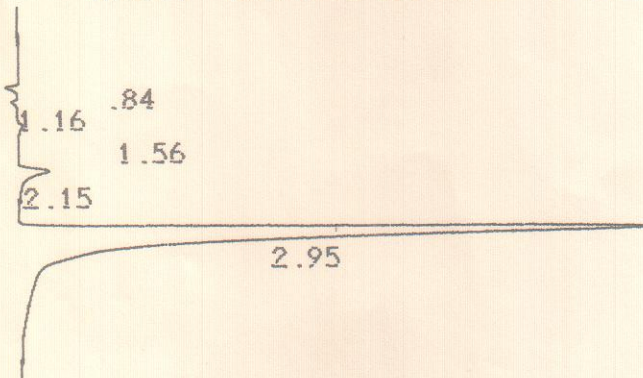
13-04-94 16:19:14 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 345 INDEX 345 BIN 89

PEAK#	AREA%	RT	AREA BC
1	100.	2.94	1302505 01
TOTAL	100.		1302505

WARNING - MEMORY AT 0. K - UNPROTECTED CHROMATOGRAMS WILL BE REPLACED

CHANNEL A INJECT 13-04-94 16:25:07 STORED TO BIN # 90



DATA SAVED TO BIN # 90

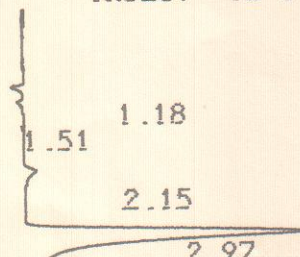
13-04-94 16:25:07 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 346 INDEX 346 BIN 90

PEAK#	AREA%	RT	AREA BC
1	100.	2.95	733384 03
TOTAL	100.		733384

WARNING - MEMORY AT 0. K - UNPROTECTED CHROMATOGRAMS WILL BE REPLACED

CHANNEL A INJECT 13-04-94 16:31:12 STORED TO BIN # 91



DATA SAVED TO BIN # 91

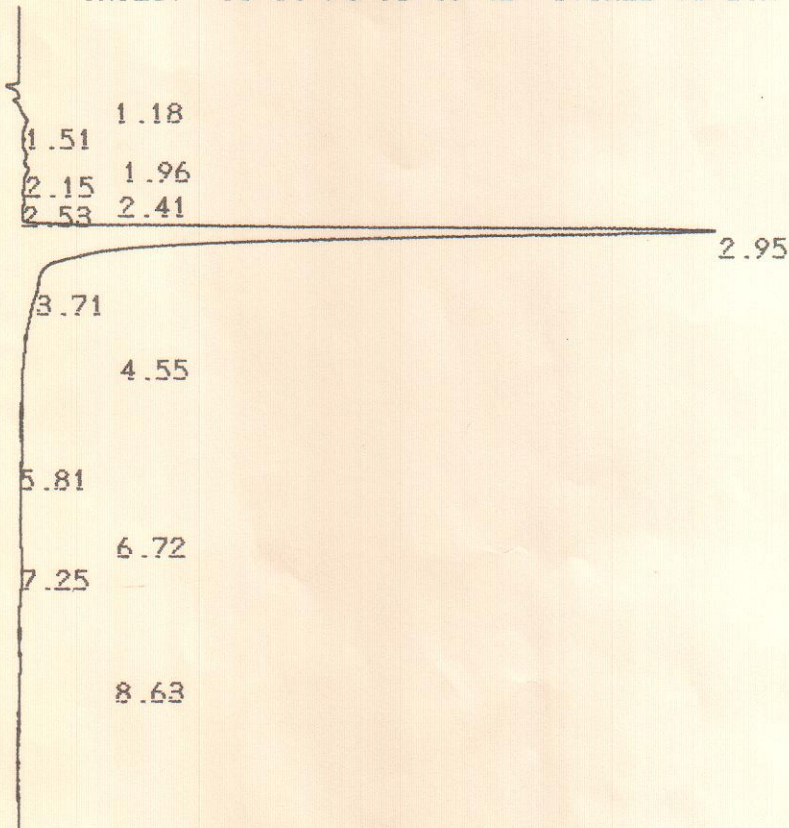
13-04-94 16:31:12 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 347 INDEX 347 BIN 91

PEAK#	AREA%	RT	AREA BC
1	100.	2.97	306715 01
TOTAL	100.		306715

WARNING - MEMORY AT 1. K - UNPROTECTED CHROMATOGRAMS WILL BE REPLACED

CHANNEL A INJECT 13-04-94 16:41:42 STORED TO BIN # 92



éch cafeine
cafe
100

DATA SAVED TO BIN # 92

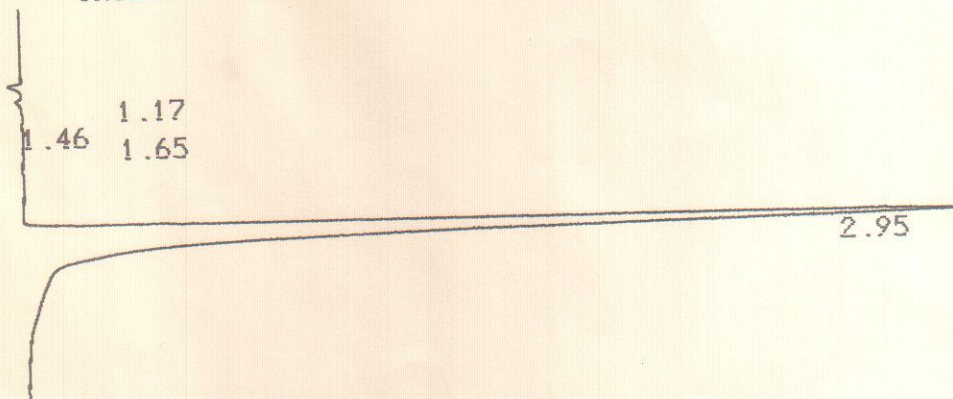
13-04-94 16:41:42 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 348 INDEX 348 BIN 92

PEAK#	AREA%	RT	AREA BC
1	100.	2.95	779107 09
TOTAL	100.		779107

WARNING - MEMORY AT 0. K - UNPROTECTED CHROMATOGRAMS WILL BE REPLACED

CHANNEL A INJECT 13-04-94 16:53:43 STORED TO BIN # 93



Suppos. f. air
150°C

DATA SAVED TO BIN # 93

13-04-94 16:53:43 CH= "A" PS= 1.

FILE 1.	METHOD 0.	RUN 349	INDEX 349	BIN 93
PEAK#	AREA%	RT	AREA BC	
1	100.	2.95	1035995 01	
TOTAL	100.		1035995	

WARNING - MEMORY AT 0. K - UNPROTECTED CHROMATOGRAMS WILL BE REPLACED

ANALYSE STRUCTURALE (IR)

T.P.

I - TP INFRA-ROUGE SUR ORDINATEUR

NOM : TONTHAT

DATE : 14/04/94

PRÉNOM : Pierre

T.P.

GROUPE : 8

N° ÉCHANTILLON : IR 14

X 97

192

16

CONSULTATION :A - REGION 1 4000 à 3100 cm^{-1}

- bande large de moyenne intensité
- qui continue en dessous de 3100 cm^{-1}
-

REGION 2 3100 à 2000 cm^{-1}

- 2 pics de forte intensité et fins.
-
-

REGION 3 2000 à 1400 cm^{-1}

- 1 pic fort à moyen
- 1 autre moyen et fin
-

REGION 4 1400 à 700 cm^{-1}

- un pic assez fort et moyen
- un pic fort et large.
-

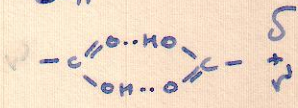
B - FREQUENCE :

→ bande large dans la région 1

- de 3000 à 2500 cm^{-1} → bande fine à 1720 cm^{-1} - bande moyenne vers 1300 cm^{-1}

→ pics vers 3000 caractéristiques.

C - GROUPES :

- \checkmark C=O
- \checkmark O-H
- 
- \checkmark C-H
-
-
-
-

Conclusions :

- on a affaire à un acide aliphatique.
- pas de double liaisons devant lieu à
- un alcène ou benzène.
-

D - LES GROUPES : Quels sont les coupes choisis ?

- COOH
- CH_x

Composition : Formule brute

- C₂H₄O₂

Analyse : Les groupes qui coïncident avec les données sont :

- acide carboxylique
- groupement aliphatique.
-
-
-

Formules possibles :

- $\text{CH}_3 - \text{COOH}$

-

Etude du spectre sans composition

Conclusions :

- acide acétique.

-

Solvants : Citer les solvants utilisables

- CCl_4 est le meilleur.

- CS_2 et HCCl_3 donnent peu d'interférences.

-

ANALYSE STRUCTURALE

T.P.

II - INTERPRÉTATIONS DE DONNÉES SPECTRALES

NOM : TONTHAT
 PRÉNOM : Pim
 GROUPE : 8

DATE : 14/04/99

SPECTRE N° : 192

17

I - Interprétation du spectre I.R.

Recherche des vibrations caractéristiques :

cm ⁻¹	Type de vibration	fonction	cm ⁻¹	type de vibration	fonction
3000	ν_{C-H}	CH ₃	760	ν_{C-Cl}	dérivé chloré.
1700	$\nu_{C=O}$ pas de ν_{C-H} aldihydrique	$>C=O$			
1600 1500 1450	$\nu_{C=C}$ typique	Benzène			
entre 300 et 800	ν_{C-H}	2 H adjacents sur le benzène. les para ?			

II - Interprétation des spectres RMN, U.V.

$PM = 154,5 \text{ g/mole}$, $n_x = \frac{0,35}{154,5} = 0,0036 \text{ mole}$
 $n_{CO_2} = \frac{1,253}{44} = 0,02847 \text{ mole de C}$
 $n_{H_2O} = \frac{0,224}{18} = 0,0124 \text{ mole} \rightarrow 0,0248 \text{ mole de H.}$

COMPOSITION ELEMENTAIRE :

nombre de C: $\frac{0,02847}{0,0036} = 8$

nombre de H: $\frac{0,0248}{0,0036} = 7$

Formule brute : $C_8H_7O_2Cl$ nombre de Cl : $154,5 \cdot \frac{100}{22,8} / 35,5 = 1$

a) Interprétation du spectre RMN nombre de O : $154,5 - 8 \times 12 - 7 - 35,5 = 16 \rightarrow 1 \text{ O.}$

Déplacements chimiques δ	Nombre de protons	Conclusions
2,5 ppm	3	1 singulet. pas de H voisin \rightarrow groupement CH_3
7,0 ppm	2	1 doublet asymétrique il y a 1 H à côté
8,0 ppm	2	idem \rightarrow cette asymétrie indique une interaction entre ces 4H.

b) Interprétation du spectre UV

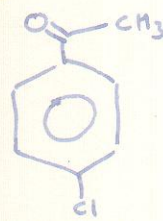
(positions et noms des bandes, déplacements, conclusions)

λ_{max}	type de bande	fonction
250	B benzénique	dérivé benzénique
200	K conjuguée	conjugaison possible
200	E éthylénique.	

voir au dos. \rightarrow

III - Formule développée, obtenue à l'aide des spectres étudiés ci-dessus :

le para chlorobenzyl méthyle cétone



oui

spectrométrie de masse.

P N groupements possibles.

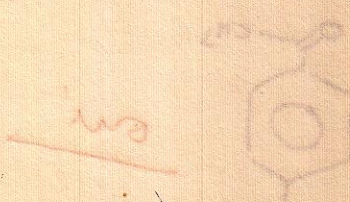


il y a 2 isotopes (en nombre 1/3 l'un par rapport à l'autre, il ne peut s'agir que du chlore).

d'autre part, l'acylation de phénol & Craft se fait sur le chlorobenzène en para puis en ortho.

Position	Type de bande	ν _{max}
ortho	bande aromatique	1500
para	bande aromatique	1500
meta	bande aromatique	1500

III - Formules développées, obtenues à l'aide des spectres étudiés ci-dessus :



la formule développée du chlorobenzène

Extraction de la caféine.

A. matériel.

- ampoule à décanter
- pipettes à traits $5 \pm 0,023$ ml et $2 \pm 0,015$ ml et $1 \pm 0,01$ ml
- fioles jaugées $100 \pm 0,1$ ml et $25 \pm 0,08$ ml
- tubes à essai 10 et 20 ml, éprouvettes 10 et 20 ml, bécher 100 ml.
- balance Mettler H80 (incertitude de pesée : 10^{-4} g)
- bain marie.

- eau Δ , CHCl_3 , sulfate d'ammonium, mélange MeOH/eau (25/75; v/v)
café et supportaire.

B. mode opératoire.

→ pour le café : extraction liquide/liquide

La caféine contenue dans 2 ml de café est transférée dans le chloroforme en présence de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, on agite 5 min dans l'ampoule à décanter, puis on laisse reposer jusqu'à ce que les phases se séparent. 5 ml de la solution chloroformique de caféine est évaporée au bain marie puis reprise par 2 ml du mélange méthanol/eau pour l'analyse au HPLC.

→ pour le support : extraction liquide/(semi)solide.

La caféine est extraite du supportaire fondu, dans 10 ml d'eau Δ , par dissolution à chaud. L'opération est réalisée 2 fois pour augmenter le rendement. Les 20 ml obtenus sont introduits dans un ballon et complétés à 100 ml par le mélange MeOH/eau .

On réalise ensuite une dilution au $\frac{1}{25}$ (prise : 1 ml complété à 25 ml par le mélange $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$). (creux de manig, la fiole de 25 a été prise à la glace d'une de 50).

C - discussions

- On peut augmenter les rendements d'extraction par différents moyens:
- augmentation de la ~~durée~~ ^{temps} de contact entre phases (pour atteindre l'équilibre)
 - augmentation du nombre d'extractions successives, afin d'épuiser la solution de départ. ^{ou}
 - l'agitation, la température, la surface de contact interphasique interviennent elle-même dans l'amélioration du rendement. ^{ou}

Chromatographie plane (CCP)

A. matériel

- balance Mettler H80 (incertitude 10^{-4} g)
- ballons 100 \pm 0,1 ml
- cuve de chromatographie, support: gel de silice 60F254R (20 x 10 cm) sur plaque métallique, tubes capillaires Spl, machine de dépôt: САРАБ noname II, séchoir, étuve à 60°C, lampe UV 254 nm.
- mélange butanol/chloroforme (40/60, v/v), échantillon 37
- phase mobile: NH_3 concentré, acétone, CCl_3 , butanol (10, 30, 30, 40; v/v)

B. mode opératoire.

→ préparation des 3 étalons.

cafféine (caf) \approx 1mg/ml : 100 mg purs
théophylline (TP) 1mg/ml : idem
thiobromine (TB) 0,5mg/ml : 50 mg purs

chacun dissout (à chaud) dans un ballon 100 ml, solvant: mélange butanol/ CCl_3 .

→ dépôt:

Spl de xanthine X 37, Spl chacun pour les 3 étalons.

dépôt à 1 cm du bord inférieur, écart entre les dépôts: 2cm.

durée de migration: suffisant pour que la phase mobile atteigne 15 cm à partir du bord inférieur.

→ révélation

sous lampe UV

C. résultats.

d'échantillon a le même

Rf que la caféine, on

note la présence d'une

unique tache: X 37

contient donc de la caféine ~~pure~~.

distance du front	14	Rf
distance pour Caf	11	0,79
(cm) TB	6,8	0,49
TP	2,9	0,21
X	10,8	0,77

Spectrométrie UV

25
/ 30

A. matériel.

- balance Mettler H80 (incertitude de pesée 10^{-4} g).
- pipettes double traits $5 \pm 0,023$ ml et $1 \pm 0,01$ ml.
- ballons $100 \pm 0,1$ ml et $50 \pm 0,03$ ml.
- tubes à essai 10 et 20 ml
- spectromètre double cuve informatisé UVIKON 930. (cuves en quartz)
- eau Δ , caféine cristallisée.

B. mode opératoire

→ méthode de dilution des étalons.

- préparation d'une solution mère de caféine à 1 mg/ml .
prise: 100 mg , dissolution dans 100 ml à chaud.
- solution à $20 \text{ } \mu\text{g/ml}$: dilution en $1/50^e$ de la solution mère,
prise: 1 ml , complété à 50 ml . (mélange)
- solution à $10 \text{ } \mu\text{g/ml}$: dilution en $1/2^e$ de la solution à $20 \text{ } \mu\text{g/ml}$
prise: 5 ml , complété à 10 ml par 5 ml d'eau Δ (mélange).
- solution à $5 \text{ } \mu\text{g/ml}$: dilution en $1/2^e$ de la solution à $10 \text{ } \mu\text{g/ml}$
prise: 5 ml , complété à 10 ml par 5 ml d'eau Δ (mélange).

→ méthode de dilution de l'échantillon de caféine X57.

dilution en $1/100^e$: prise de 1 ml , complété à 100 ml par de l'eau Δ .

C. tracé du spectre UV

absorbance de la solution à $20 \text{ } \mu\text{g/ml}$ de caféine en fonction de la longueur d'onde.

on obtient $\lambda_{\text{max}} = 273 \text{ nm}$ pour $A_{\text{max}} = 1,0304$.

cf tracé donné par l'ordinateur.

D. résultats

concentrations	5 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	20 $\mu\text{g/ml}$
A ₁	0,25032	0,52865	1,03048
A ₂	0,25383	0,5006	0,95849
A ₃	0,26874	0,50457	1,02460

blanc: A = 0,0236 pour 0 $\mu\text{g/ml}$.

	blanc (mesuré à nouveau)	1/100 ^e	1/200 ^e	1/400 ^e
Absorbances	0,0246	0,61233	0,30622	0,16241
concentrations ($\mu\text{g/ml}$) (donnée par l'ordinateur)	0,4738	<u>11,328</u>	5,3723	3,1636
			(à titre indicatif)	

E. calculs

→ droite de régression.

l'ordinateur donne pour $A = ac + b$

$$a = 0,04830$$

$$b = 0,02554$$

droite: $A = 0,04830 c + 0,02554$
cf trace.

coef de régression $CO = 0,9963$.

la linéarité parfaite: mesurée égale à 1.

→ erreurs

incertitudes sur la balance: $\frac{\Delta b}{b} = \frac{10^{-4}}{100 \cdot 10^{-3}} = 10^{-3}$

• dilution de la solution mère $\frac{\Delta d}{d} = \frac{0,1}{100} + \left(\frac{0,01}{1} + \frac{0,03}{50} \right) + \left(\frac{0,023}{5} \right) \times 4 = 0,0312$

• dilution de l'échantillon $\frac{\Delta e}{e} = \frac{0,1}{100} + \frac{0,01}{1} = 0,011$

• mesure de l'absorbance: négligeable par rapport aux autres.

$$\frac{\Delta a}{a} = \frac{10^{-6}}{0,61233} \approx 10^{-6}$$

incertitude relative totale: $\frac{\Delta t}{t} = \sum \frac{\Delta i}{i} = 0,0432$

incertitude absolue sur le résultat: $\Delta t = 0,0432 \cdot 11,328 = 0,5153 \mu\text{g/ml}$ (sur 1/100^e)

compte-tenue de la dilution:

la concentration de l'échantillon est de $1130 \pm 60 \text{ } \mu\text{g/ml}$.
1.2mg/ml.

F. discussions.

loi de Beer Lambert : $A = \epsilon l c$

formule de la droite : $A = a c + b$

le coef représentant la pente de la droite est, a b près, la valeur de l'absorptivité de la caféine pour un trajet optique de 1 cm.

L'absorbance du blanc correspond au facteur b de l'équation de la droite

Cette droite ne passe pas par 0 mais elle en est proche. L'ordonnée donne 0,0246 pour l'absorbance du blanc, mesurée ici avec les échantillons,

après l'étalonnage, il donne une concentration de 47,38 $\mu\text{g/ml}$

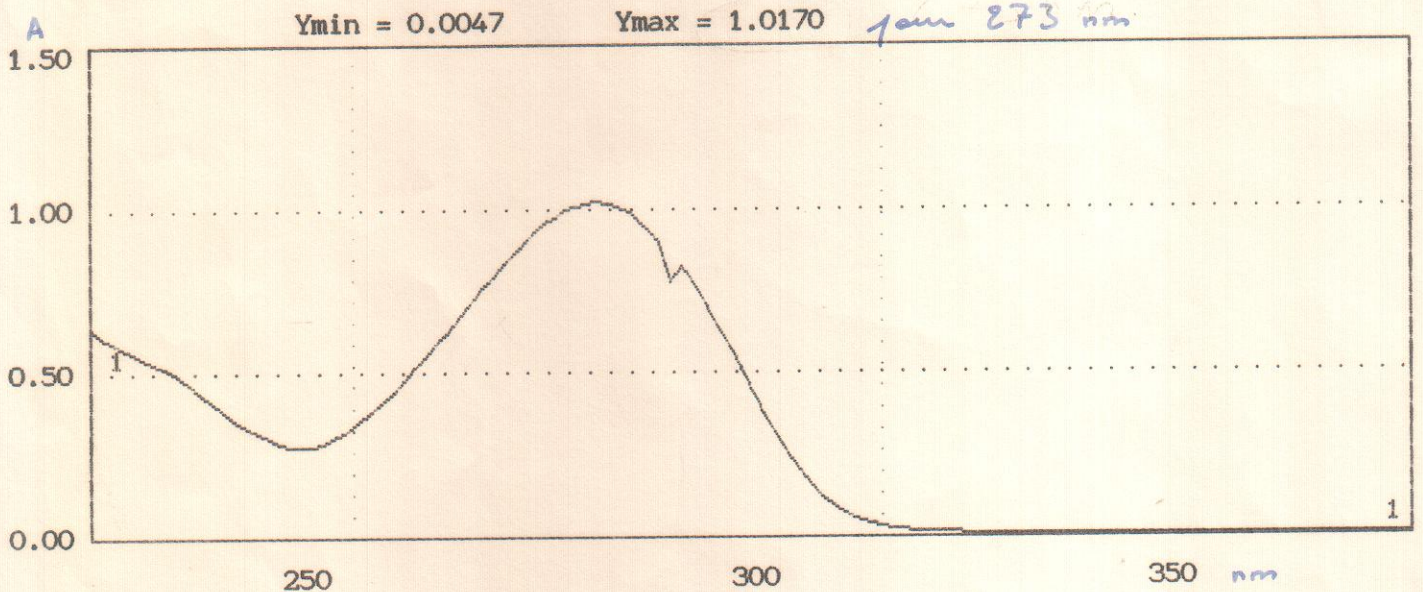
(après correction de la dilution) de caféine, ce qui est faux pour le

blanc (théorie : 0 $\mu\text{g/ml}$). Cette valeur est proche et inférieure à

l'incertitude de 60 $\mu\text{g/ml}$, b correspond donc aux erreurs de mesure.

BALAYAGE SPECTRAL

13-04-1994 17:43



HPLC

(travail sur l'appareillage)

A. matériel

- balance Mettler H80 (incertitude de pesée 10^{-4} g).
- ballons 100 ml $\pm 0,1$ ml
- pipette graduée 10 $\pm 0,075$
- pipette double trait 5 $\pm 0,023$ ml. et 1 $\pm 0,01$ ml
- appareil de HPLC spectrochimique (pompes Iscochrom LC + intégrateur Datajet)
- caféine cristallisée
- extraits de mugos et de café préparés lors de l'extraction.
- mélange $\text{HCOH}/\text{H}_2\text{O}$ (25/75 v/v)

B. mode opératoire.

→ préparation des solutions étalons.

- solution mère de caféine \bar{c} 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
pesée : 100 mg, dissolution dans 100 ml du mélange $\text{HCOH}/\text{H}_2\text{O}$.
- préparation de la solution \bar{c} 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$: dilution au $1/10^e$ de la solution mère, prise : 10 ml par pipette graduée, compléti \bar{c} 100 ml par du solvant.
- préparation de la solution \bar{c} 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$: dilution au $1/20^e$ de la solution mère ; prise 5 ml par pipette double trait, compléti \bar{c} 100 ml par du solvant.
- préparation de la solution \bar{c} 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$: dilution au $1/2$ de la solution \bar{c} 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; prise : 10 ml compléti \bar{c} 20 ml, par 10 ml de solvant (mélange).

→ dilution de l'extrait de café : ($1/10^e$) : prise 1 ml, puis ajout de 5 ml par pipette graduée de 10 ml.

→ sur HPLC:

- dépôts réalisés par une seringue, 20 μ l déposés au début de la colonne.
- identification des pics grâce à une solution étalon de différentes xanthines (caf, TB, TP) = 50 μ g/ml.
- étalonnage, grâce aux solutions de caféine = 100, 50, 25 μ g/ml.
- mesure des extraits dilués de café et mugo.

C. résultats.

essai	T_R (min)	Aire (unité arbitraire)	concentration μ g/ml
TB	1,56	534 083	
TP	2,13	616 565	50
caf	2,95	675 586	
caf	2,94	1 302 505	100
	2,95	7 33384	50
	2,97	306 715	25
café (V ₁₀₀)	2,95	77 5107	?
mugo (V ₂₅₀)	2,95	1 035 995	.

D. calculs

→ erreurs

$$\text{balance: } \frac{10^{-4}}{100 \cdot 10^{-3}} = 10^{-3}$$

$$\begin{aligned} \text{dilutions de la solution mère: } & \frac{0,1}{100} + \left(\frac{0,075}{10} + \frac{0,1}{100} \right) + \left(\frac{0,023}{5} + \frac{0,1}{100} \right) \\ & + \left(2 \times \frac{0,075}{10} \right) = 0,0301 \end{aligned}$$

$$\text{ls erreur sur l'étalonnage} = 0,0311$$

$$\text{dilution de la caféine: } \frac{0,023}{5} + \frac{0,015}{1} + \left(\frac{0,01}{1} + \frac{0,075}{5} \right) = 0,0214\bar{3}$$

$$\text{dilution du mugo: } \frac{0,1}{100} + \left(\frac{0,01}{1} + \frac{0,08}{25} \right) = 0,0142$$

→ calcul de la droite de régression.

à l'aide de la calculatrice

$$\text{Aire} = aC + b$$

on trouve $a = 13007$

$$b = 22155$$

$$C = \frac{\text{Aire} - b}{a}$$

pour le café (1/10): 58,1979 $\mu\text{g/ml}$

sucre (1/25): 77,9486 $\mu\text{g/ml}$.

→ résultats finaux

incertitude totale absolue: (0,0301 +

café: (0,0301 + 0,0214) \times 58,1979 = 2,9372 $\mu\text{g/ml}$ (1/10)

sucre: (0,0301 + 0,0142) \times 77,9486 = 3,4531 $\mu\text{g/ml}$. (1/25)

compte tenu de la dilution:

café: 580 \pm 30 $\mu\text{g/ml}$

sucre: 1950 \pm 90 $\mu\text{g/ml}$ } au niveau des extraits.

résultats:

café:

sucre: (1950 \pm 90 $\mu\text{g/ml}$) \times 100 ml = quantité contenue dans le sucre de

caféine = 195 \pm 9 mg

Conclusion !

café: 2 ml $\xrightarrow{\times \frac{1}{10}}$ 10 ml HClCl_3 $\xrightarrow{\text{rin}}$ 5 ml HClCl_3 $\xrightarrow{\times \frac{5}{2}}$ 2 ml H_2O $\xrightarrow{\frac{1}{10}}$ dilué au 1/10

$\xleftarrow{\times \frac{10}{2}}$ $\xleftarrow{\text{rin}}$ $\xleftarrow{\times \frac{2}{5}}$ $\xleftarrow{\times 10}$

$$\frac{10}{2} \times \frac{5}{5} = 2$$

on doit multiplier par 2 le volume de la dilution au 1/10

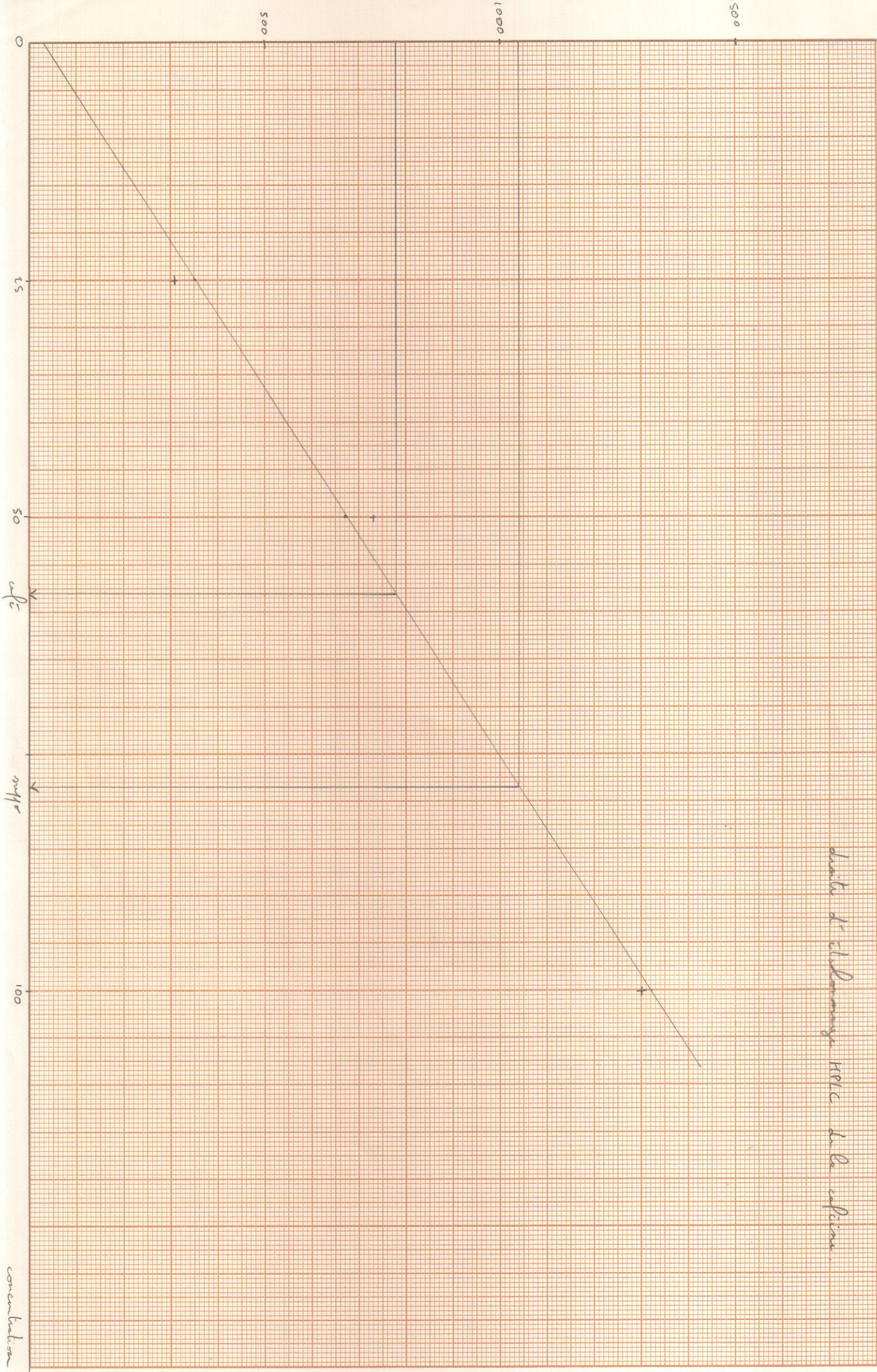
café: 1160 \pm 60 $\mu\text{g/ml}$

= 1160 \pm 60 mg/l.

1 mg/ml

E. tracé de la droite

à l'aide d'un papier millimétré



droite de régression HPLC de la caféine.

concentration
(pg/m³)

HPLC
(domin)

Non corrigé

Chromatogramme
Rejeune Dossier

A. valeurs.

l'indice 1 correspond à la théophylline
" 2 " à la caféine

(identification par comparaison avec les HPLC du travail sur l'appareillage).

→ valeurs pour l'étalonnage

	①			②		
T _r (min)	2,83	2,83	2,83	4,14	4,13	4,15
ω (min)	0,46	0,43	0,43	0,63	0,64	0,65
h (intensité)	3,35	3,47	3,56	2,95	3,00	3,01
A (à un coef de proportionnalité près)	1,54	1,43	1,53	1,86	1,92	1,96
efficacité N	606	693	693	690	666	652

coefficients de réponse Caféine par : 0,828 0,776 0,781

rapport à théophylline

$$\left(\frac{a_2}{a_1} = \frac{A_1}{A_2} \right)$$

réponse moyenne : 0,795 (sans unités).

→ valeurs de mesure de l'échantillon

	①	②
T _r (min)	2,83	4,14
ω (min)	0,43	0,64
h (intensité)	3,45	2,98
A (= h air)	1,48	1,91

$$c_2 = c_1 \cdot \frac{a_2}{a_1} \cdot \frac{A_2}{A_1} = 61,56 \text{ mg/ml}$$

des volumes injectés sont les mêmes, on peut travailler sur les concentrations.