



95, rue du Dessous des Berges
75013 PARIS
<http://www.etsl.fr>

TD N° 2

ligodin@free.fr
<http://ligodin.free.fr>

ANALYSE SÉPARATIVE – Chromatographie – CPL – HPLC – CCM

Nous désirons vérifier le dosage de certains principes actifs contenus dans une crème dépigmentante. Le tableau n°1 ci-dessous indique la composition de cette préparation.

Tableau n°1 : Composition théorique de la préparation de Kligman et rôle des composants.

	Masse (g)	Rôle(s)
Acide rétinoïque	0,012	Dépigmente, favorise la pénétration dans la peau
Hydroquinone	2,000	Dépigmente
Hydrocortisone	0,500	Anti-inflammatoire, dépigmente légèrement
Ethanol 95°	10,00	Solubilise
Acide ascorbique	0,500	Stabilise, agent conservateur
Excipient hydrocrème	Qsp 50 g	-

Les exercices 1, et 2 étudient certains dosages et sont indépendants.

Exercice 1 :

Afin de quantifier l'acide rétinoïque, nous effectuons une chromatographie liquide haute performance. La colonne est une Hypersil ODS - C18, 5 μm , de 20 cm de longueur. La phase mobile est constituée d'un mélange méthanol/eau ultrapure/acide acétique 85/14,5/0,5 (v/v/v). Le débit est de 1,4 mL/min. La détection se fait à 353 nm. L'injection est de 20 μL exactement.

Nous réalisons une gamme d'étalonnage à partir d'une solution d'acide rétinoïque commercial. Nous pesons 10,00 mg d'acide rétinoïque en poudre dans une fiole de 100 mL et nous complétons avec du méthanol. Cette solution est appelée solution mère S_M .

1/ Calculer le titre de la solution S_M ainsi fabriquée.

2/ Préparer une gamme d'étalonnage en 5 points étalons régulièrement espacés entre 0,02 et 0,1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ compris. Vous présenterez votre protocole sous forme d'un tableau et préciserez le matériel utilisé.

3/ Dans quel ordre injecter les solutions étalons ? Justifier.

4/ Chaque solution est injectée 2 fois et les aires obtenues moyennées. Tous les résultats sont donnés dans le tableau n° 2 ci-après. Tracer la droite d'étalonnage.

Tableau n°2 : Aire des solutions étalons.

Solutions	1	2	3	4	5
Aire	289 988	583 110	874 300	1 165 500	1 456 986

5/ Afin de vérifier l'exactitude de la droite d'étalonnage, nous réalisons deux inconnues connues (étalons de contrôle). Dans deux fioles jaugées de 5 mL, nous mettons respectivement 1,5 et 4,5 mL de solution S_M et nous complétons au méthanol. Ces solutions sont injectées après rinçages du système chromatographique et les aires mesurées sont respectivement de 436988 et 1 311 280. Conclure sur l'exactitude de la droite sachant que ces étalons de contrôle doivent se trouver dans un intervalle à $\pm 2\%$ de leur valeur de référence.

6/ Nous pesons 2 g de crème dans un tube à centrifugation recouvert de papier aluminium. Nous ajoutons 10 mL de méthanol puis vortexons 5 minutes. Nous mettons le tube dans de la glace pendant 15 minutes et nous filtrons. Après un rinçage du système, nous injectons 2 fois la solution. La moyenne des aires est de 688 914. Calculer la quantité d'acide rétinolique de la crème testée.

7/ Sachant que la crème peut être mise en vente avec une tolérance de $\pm 1\%$ du titre théorique, préciser si la crème testée est conforme.

Exercice 2 :

Nous voulons tester une méthode de dosage de l'hydrocortisone par étalon interne décrite dans la littérature sur ce type de produit. L'étalon interne est la prédnisolone.

La séparation chromatographique est effectuée à l'aide d'une colonne de silice greffée C18. La publication précise que la phase mobile est un mélange eau/acétonitrile 0 à 26 % d'acétonitrile en 20 minutes. Le débit est de 1 mL.min⁻¹. La détection est réalisée à 243 nm. L'injection est de 20 μ L exactement.

1/ Que signifie l'indication « eau/acétonitrile 0 à 26 % d'acétonitrile en 20 minutes ». Cette indication est-elle suffisante pour reproduire exactement ces conditions ?

2/ Quelles sont les propriétés de la molécule utilisée comme étalon interne ?

3/ Afin de vérifier que nos conditions chromatographiques sont correctes pour un tel dosage, nous réalisons l'essai suivant : nous ajoutons 1 mL exactement d'une solution de prédnisolone à 0,25 mg.mL⁻¹ dans l'essai utilisé pour le dosage de l'acide rétinolique (2 g de crème dans 10 mL de méthanol). Les résultats sont donnés dans le tableau n° 3 ci-dessous.

Tableau n°3 : Temps de rétention et largeur à la base des pics de l'hydrocortisone et de la prédnisolone.

	t_R (min)	w (min)
Hydrocortisone	2,79	0,20
Prédnisolone	3,75	0,23

Calculer la résolution et vérifier que la valeur trouvée est compatible avec la méthode de dosage par étalon interne.

4/ Cette méthode de dosage ayant été validée, nous l'appliquons à notre échantillon de crème. Nous pesons 2 g de crème dans un tube à centrifugation recouvert de papier aluminium. Nous ajoutons 10 mL de méthanol puis vortexons 5 minutes. Nous diluons cette solution au 1/50^{ème}. Nous injectons les solutions de la gamme puis la préparation de l'échantillon. Graphiquement, nous déterminons que cette dilution donne une concentration de 0,04 g.L⁻¹. Calculer la masse d'hydrocortisone contenue dans 50 g de crème.

Exercice 3 : CCM

L'huile essentielle de girofle est extraite des boutons floraux séchés du giroflier ou clous de girofle, alors que l'huile essentielle de giroflier est extraite des feuilles et rameaux du giroflier. Ces deux huiles, utilisées en parfumerie et en pharmacie, diffèrent par leur composition : elles contiennent toutes deux de l'eugénol, mais celle dite de girofle contient aussi 12 à 15 % d'un ester de l'eugénol, l'acétate (ou éthanoate) d'eugényle.

1. Extraction de l'huile essentielle du clou de girofle

Nous réduisons en poudre quelques clous de girofle, puis nous versons cette poudre dans un ballon. Nous ajoutons 100 mL d'eau distillée et quelques morceaux de pierre ponce. Nous réalisons le montage de distillation et nous portons à ébullition. Quand la température se stabilise, le distillat est recueilli dans un erlenmeyer. Nous recueillons environ 70 mL de distillat d'aspect trouble.

Nous ajoutons environ 50 g de chlorure de sodium au distillat, nous agitons jusqu'à dissolution, puis nous transvasons dans une ampoule à décanter. Sous hotte, nous ajoutons 10 mL de dichlorométhane. Nous agitons l'ampoule puis laissons décanter. Nous effectuons une deuxième extraction sur la phase adéquate avec 10 mL de dichlorométhane supplémentaire. Puis nous séchons le produit avec un peu de sulfate de magnésium anhydre.

1/ Quelles sont les précautions à respecter lorsque l'on agite l'ampoule à décanter ?

2/ À l'aide du tableau n° 1 ci-dessous, déterminer dans quelle phase se trouve l'huile essentielle et où cette phase se situe dans l'ampoule après décantation.

Tableau 1 : Densités des solvants d'extraction et solubilité de l'eugénol.

Solvant	Eau	Eau salée	Dichlorométhane
Densité	1,0	1,1	1,3
Solubilité de l'eugénol	très faible	insoluble	très soluble

2. Analyse par chromatographie sur couche mince des essences de girofle et de giroflier

Sur une plaque de silice sensible aux UV, nous effectuons les dépôts de quatre solutions dans le dichlorométhane : une d'eugénol (E), une d'acétate d'eugényle (O), une de l'essence de girofle (C) ; une de l'essence de giroflier obtenue à partir des feuilles et rameaux du giroflier (F). Comme l'acétate d'eugényle n'est pas commercialisé, nous effectuons sa synthèse à partir d'eugénol et d'anhydride acétique et réalisons plusieurs lavages pour avoir le produit le plus pur possible.

L'éluant est un mélange de toluène et d'éthanol. Après révélation, nous obtenons le chromatogramme donné par la figure n°1 ci- après.

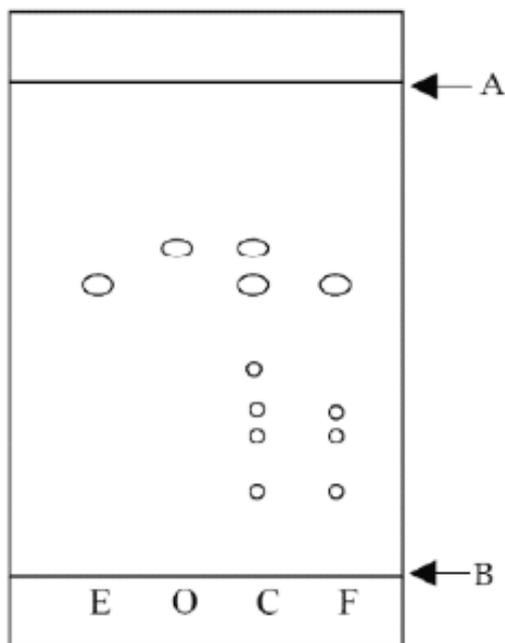


Figure 1 : Résultat de la chromatographie sur couche mince.

3/ Quel est le composé le plus hydrophobe ? Justifier votre réponse.

4/ Le protocole parle de « plaque de silice sensible aux UV », expliquer.

5/ Analyser le chromatogramme obtenu et conclure sur la composition des deux essences.