

2<sup>ème</sup> année BTS Bioanalyses et Contrôles

# Notice Technique GC450 de Varian & Turbomatrix HS16 de Perkin-Elmer



L. GODIN  
<http://ligodin.free.fr>

[godin.lionel@orange.fr](mailto:godin.lionel@orange.fr)

# TP n°6 : OPTIMISATION de MÉTHODE & DOSAGE de l'ETHANOL dans une SPÉCIALITÉ PHARMACEUTIQUE par CPG - HEADSPACE

<b>1. PROCÉDURE D'ACQUISITION D'UN CHROMATOGRAMME EN ISOTHERME 50°C</b>	<b>2</b>
1.1. Programmation d'une méthode en isotherme	2
1.2. Programmation d'une séquence d'analyse	5
1.3. Obtention du chromatogramme : paramétrage du HS16	7
<b>2. PROCÉDURE D'ACQUISITION D'UN CHROMATOGRAMME EN SOTHERME 90°C</b>	<b>9</b>
2.1. Injection de la solution à analyser	9
2.2. Injection de l'air	9
<b>3. PASSAGE DE LA GAMME, DE L'ETALON DE CONTROLE ET DE L'INCONNUE</b>	<b>10</b>
3.1. Programmation de la séquence d'analyse	10
3.2. Identification des pics	11
<b>4. ÉTALONNAGE INTERNE</b>	<b>12</b>
4.1. Création de la feuille de calibration en étalonnage interne (par la méthode locale)	12
4.2. Utilisation d'une feuille de re-calcul pour obtenir la courbe de calibration ainsi que la quantité recherchée pour l'inconnue	14
<b>5. LANCEMENT DE LA MÉTHODE DE COUPURE DU GC</b>	<b>17</b>
<b>6. ÉLÉMENTS DE REPONSE AUX QUESTIONS</b>	<b>18</b>

# 1. PROCÉDURE D'ACQUISITION D'UN CHROMATOGRAMME EN ISOTHERME

## 1.1. Programmation d'une méthode en isotherme 50°C

☞ Ouvrir le logiciel CompassCDS 3.0 (icône sur le bureau) :



Dans User Identification : Eleve

Le groupe : Labo TASS, et le projet TP TASS, cliquer sur OK,

☞ La création de méthode s'effectue en sélectionnant : **FILE / NEW / NEW METHOD**

Sélectionner dans system name : **GC450-HEADSPACE**

Cliquer sur NEXT

Donner un nom à la méthode : Isotherme50

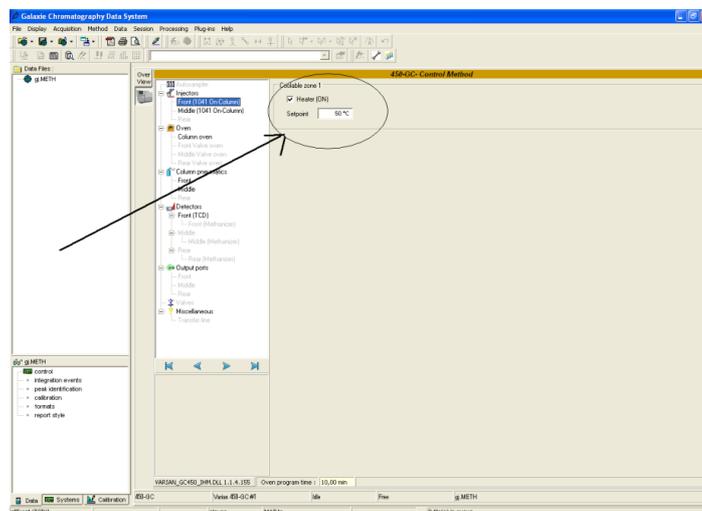
Cliquer sur OK

☞ Cliquer sur **Control** (dans l'onglet **Data** en bas à gauche), cela permet de paramétrer les différentes parties de GC (TRÈS IMPORTANT POUR L'OPTIMISATION D'UNE MÉTHODE),

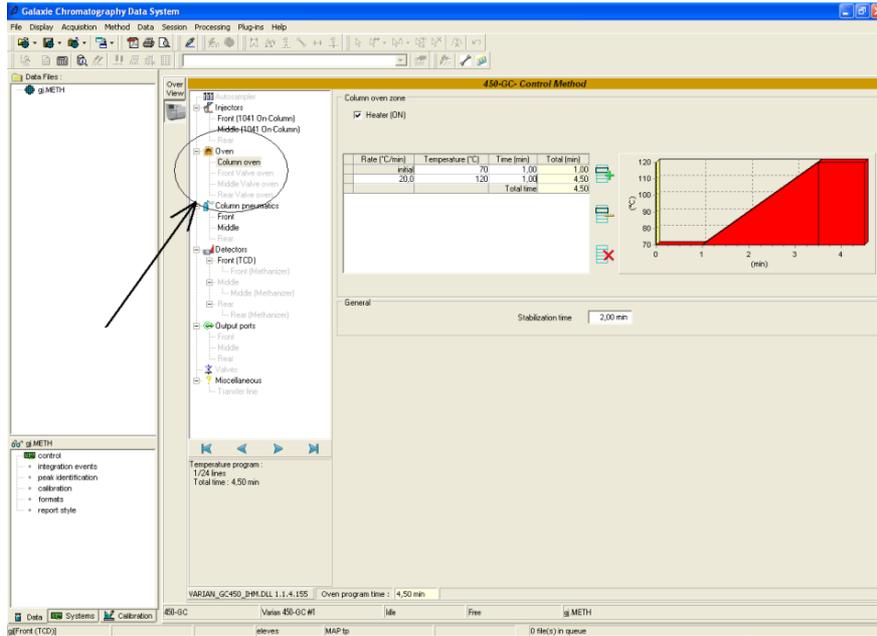
**Pour rentrer LES VALEURS DES PARAMÈTRES, à savoir,**  
**La TEMPÉRATURE des INJECTEURS,**  
**La TEMPÉRATURE de travail du FOUR,**  
**Le DÉBIT gazeux à travers les 2 COLONNES,**  
**La TEMPÉRATURE du DÉTECTEUR et de son FILAMENT.**

☞ Sur la fenêtre du milieu : cliquer successivement sur :

**injectors** : indiquer pour les 2 injecteurs **Front** et **Middle** 110°C

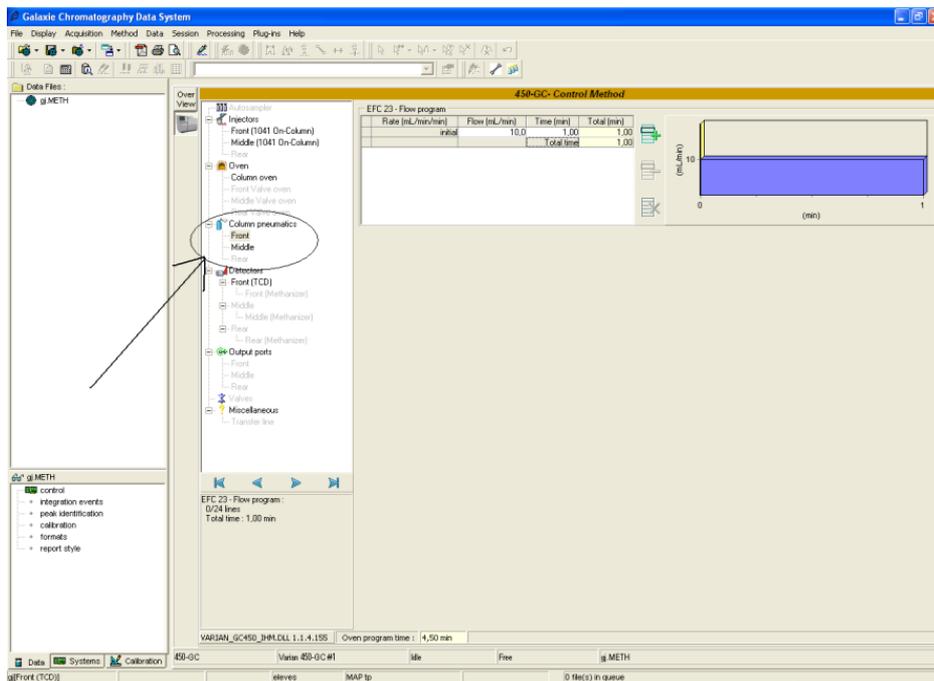


oven : isotherme 50°C pendant 1,5 minute.



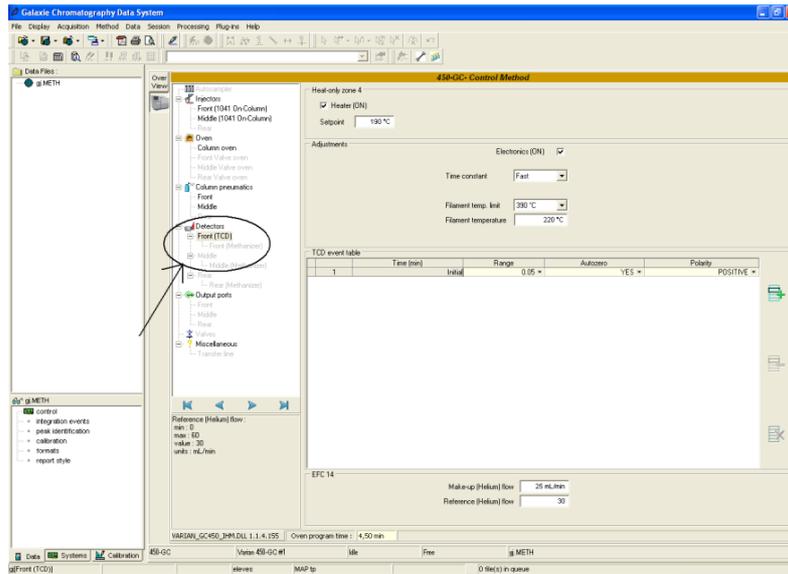
Mettre **Stabilization time** à 0,5 min

**Column pneumatics** : front et middle à 5 mL/min (par défaut on a 0)



**Q** L'utilisation du débit ici est de 5 mL/min, pourquoi n'utilise-t-on pas un débit beaucoup plus grand ?

**Detector** : set point 190°C, filament temperature : 220°C, make-up flow 15 mL/min, reference flow 20 mL/min ; Polarity : NEGATIVE.



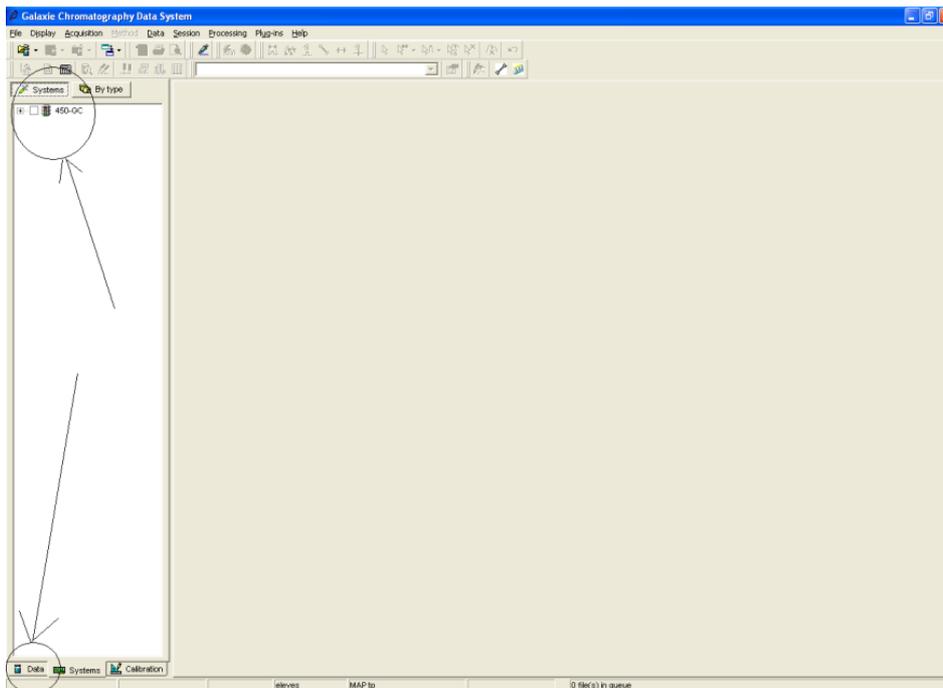
**Q** Pourquoi choisit-on une polarité "Négative" pour le détecteur ?



Remarque

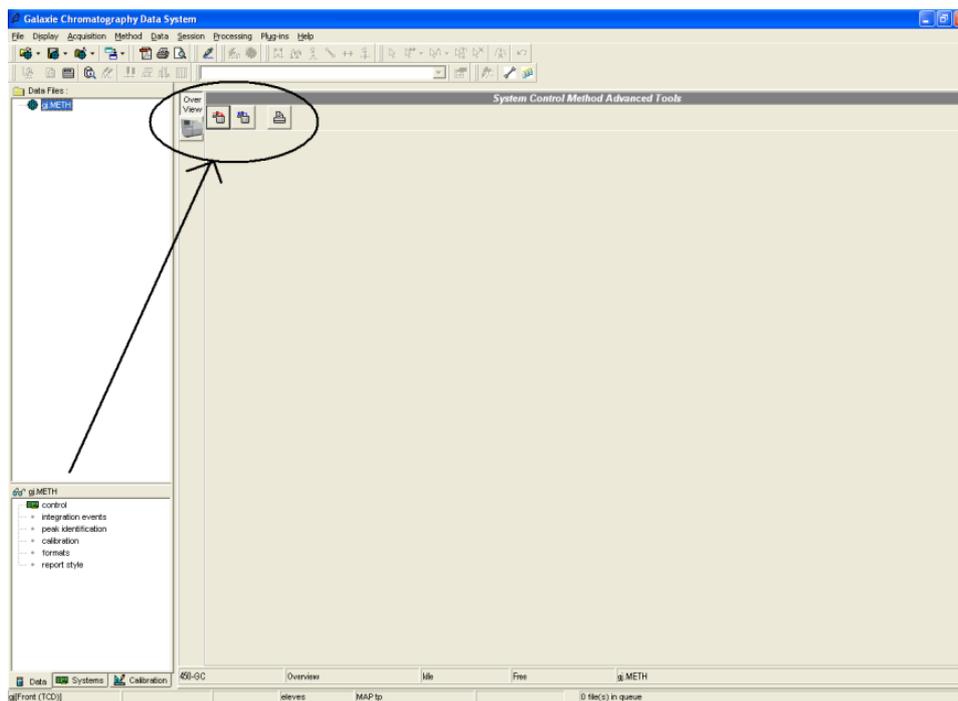
**Vérifier que le GC soit sélectionné, et connecté au PC via le câble réseau ; pour cela cliquer dans l'onglet System (en bas à gauche), GC450 doit être coché dans la fenêtre en haut à gauche !**

☞ Aller dans l'onglet **system** en bas à gauche et cocher en haut à gauche l'appareil utilisé GC450-HEADSPACE



Sauvegarder la méthode : **FILE/SAVE/SAVE METHOD**

☞ aller dans l'onglet data en bas à gauche, puis au milieu en haut cliquer sur overview



☞ Alors, on peut, grâce à **Overview** charger la méthode dans le GC ! pour cela cliquer sur Overview, puis sur l'icône juste à sa droite (flèche rouge du PC vers le GC).

Attendre que l'appareil chauffe (suivant que l'appareil était allumé avant ou pas, le temps de chauffe est compris entre quelques secondes et une trentaine de minutes)

L'appareil est prêt quand le voyant Ready (sur le devant de l'appareil) est vert.

## 1.2. Programmation d'une séquence d'analyse

☞ Pendant que l'appareil chauffe, préparer la séquence d'analyse, pour cela, cliquer dans FILE/NEW/NEW SEQUENCE

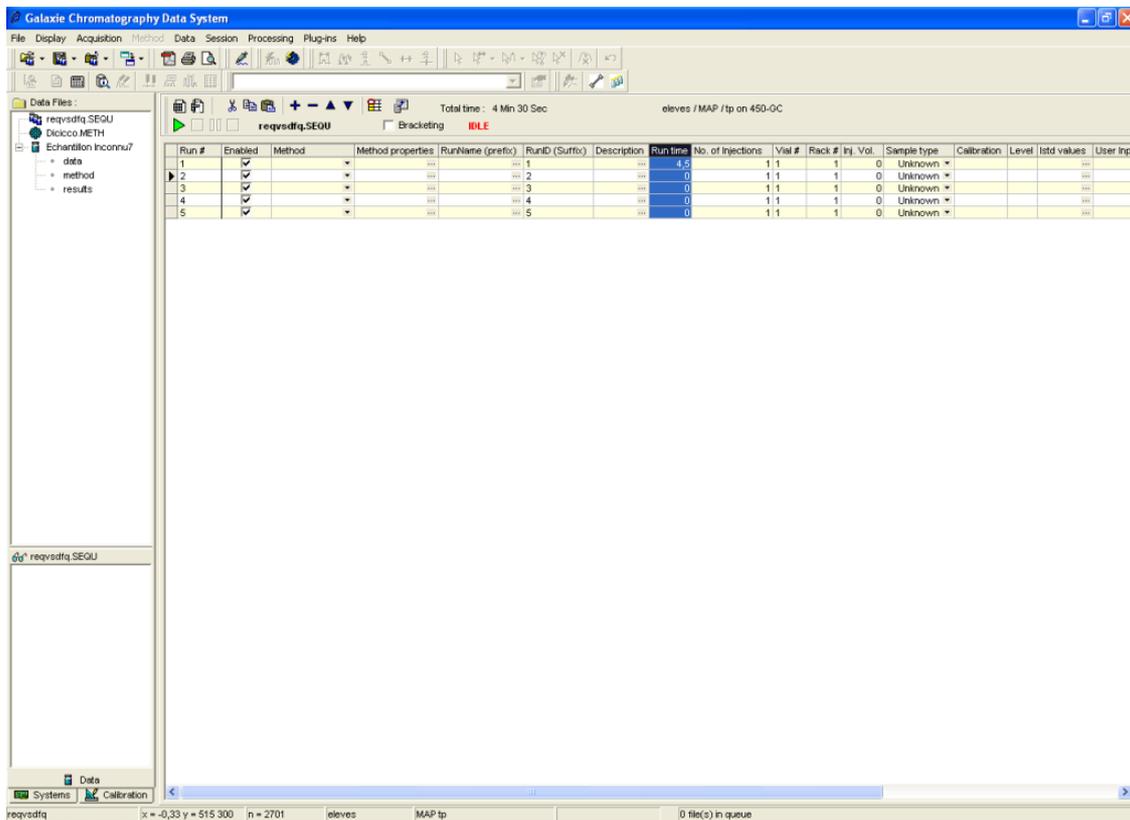
Sélectionner le nom du système ici GC450-HEADSPACE puis NEXT

Entrer le nombre de séquences d'analyse dans number of lines : 18, puis NEXT

Remarque : on peut toujours par la suite rajouter des lignes dans la séquence d'analyse.

**Une ligne correspond à une analyse, c'est-à-dire à une injection !**

Entrer le nom de sauvegarde de la séquence d'analyse puis OK



☞ Paramètres de la séquence d'analyse :

**Enabled** : cocher seulement l'analyse à faire (à changer à chaque injection)

**Method** : nom de la méthode (précédente) pour l'analyse

**Run Name** : le nom de l'échantillon

**Suffix** : le numéro de l'analyse (de 1 à n)

**Run Info** : composition exacte de l'échantillon

**Run Time** : temps d'analyse 1,5

Remarque : Pour démarrer une séquence d'analyse, il ne faut pas oublier, à chaque fois, de décocher les séquences déjà effectuées, puis il faut faire un « Start » (flèche verte) sur la séquence utilisée.

The diagram shows the Galaxie interface with several yellow callout boxes explaining the parameters of the analysis sequence:

- Choisir la méthode précédemment programmée.** (Choose the method previously programmed.)
- Durée de l'analyse (doit être la même que celle, programmée dans la méthode)** (Analysis duration (must be the same as that programmed in the method))
- Identification de l'analyse :**
  - Run Name** : nom de l'échantillon
  - Suffix** : numéro de l'analyse
- À remplir le plus exactement possible** (To be filled as accurately as possible)

The diagram also shows a table of analysis runs with columns for Run #, Enabled, Method, Method properties, Run Name, Suffix, Run Info, Run Time, No. of Injections, Vial #, Rack #, Inj. Vol., Sample type, Calibration, Level, Istd values, and User Inp. The runs are numbered 1 to 7. The 'Run time' column shows values of 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0. The 'No. of Injections' column shows values of 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1. The 'Vial #' column shows values of 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1. The 'Rack #' column shows values of 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1. The 'Inj. Vol.' column shows values of 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1. The 'Sample type' column shows values of, , , , , , . The 'Calibration' column shows values of, , , , , , . The 'Level' column shows values of, , , , , , . The 'Istd values' column shows values of, , , , , , . The 'User Inp' column shows values of, , , , , , .

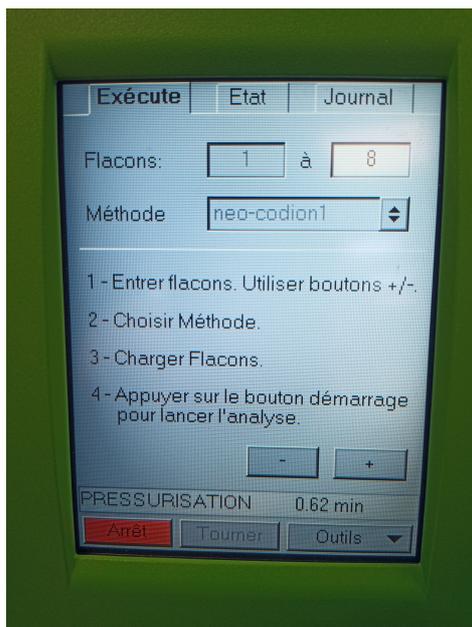
☞ Sauvegarder la séquence d'analyse : FILE/SAVE/SAVE SEQUENCE

Vérifier que dans l'onglet System, le GC soit connecté,  
si ce n'est pas le cas, cocher GC450-HEADSPACE

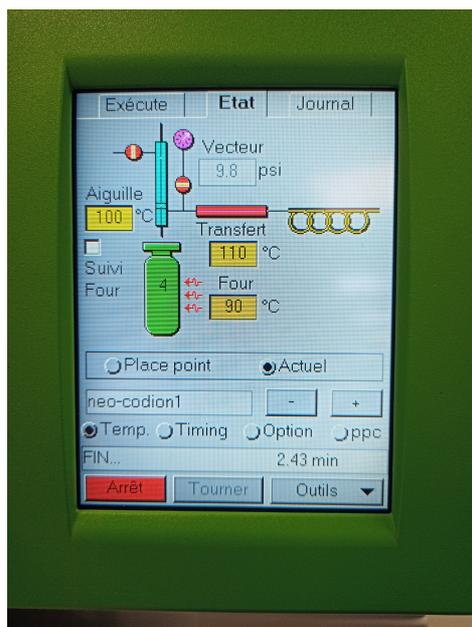
## 1.3. Obtention du chromatogramme : paramétrage du HS16

☞ Placer un vial en position 1 du carrousel.

Indiquer sur l'onglet « Exécute » de l'écran tactile de l'**Headspace HS16**, (à l'aide du stylet ou de votre doigt) que celui-ci ne doit analyser que le vial en position 1, c'est-à-dire indiquer **Flacons 1 à 1** :

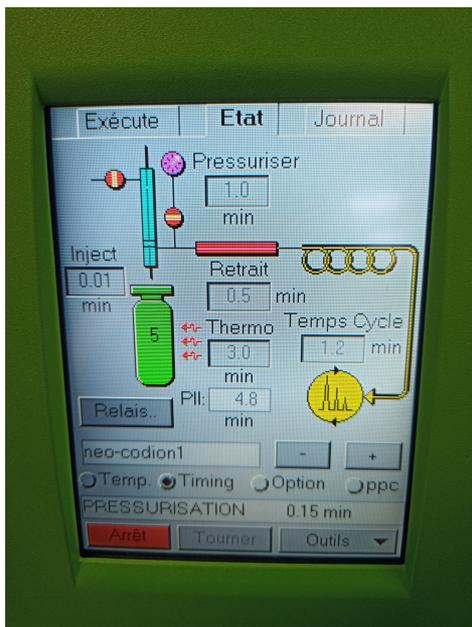


☞ Aller chercher la méthode **Bronchokod**, si ce n'est déjà fait, et sélectionner l'onglet « Etat », et sélectionner **Temp.** (en bas à gauche de l'écran) :



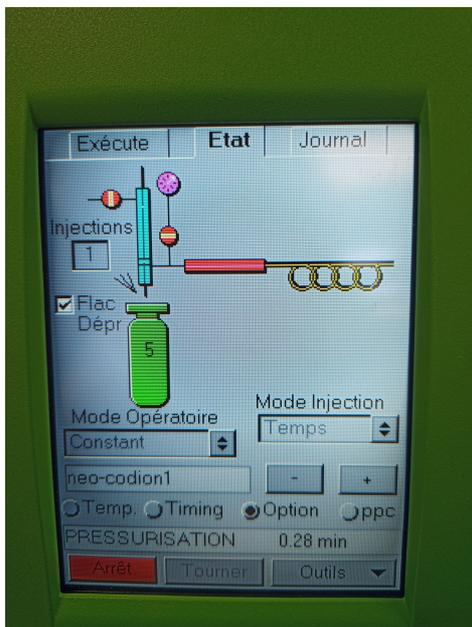
Indiquer, en sélectionnant **Place point** : Aiguille = 100°C ; Transfert = 110°C et Four = 90°C

☞ Sélectionner **Timing** (en bas au centre de l'écran) :



Indiquer : Inject = 0,02 min ; Retrait = 0,5 min ; Thermo = 3,0 min et Temps de Cycle = 1,5 min

☞ Sélectionner **Option** (en bas à droite de l'écran) :



Vérifier que le mode opératoire est constant et que le mode injection est temps !

☞ Cliquer sur l'icône (flèche verte) pour débuter une séquence d'analyse : start sequence  
Aller dans l'onglet system et attendre l'affichage de « **Waiting for injection** » en bas au centre de la fenêtre.

☞ Sur l'**Headspace HS16**, sélectionner « Démarrer » et « Méthode Active », le départ de l'analyse s'effectue automatiquement.

**Q** Pourquoi utilise-t-on une colonne polaire pour séparer l'éthanol et le propanol ?

Attendre la fin de l'analyse

Cliquer dans data

☞ Ouvrir le chromatogramme via File/Open/Open Chromatogram (le chromatogramme se trouve dans le dossier du jour de la semaine de réalisation du TP)

☛ Cliquer sur la méthode locale associée au fichier Chromatogram, puis cliquer sur « report style » et dans l'onglet data, ouvrir le fichier **Alcools.STYL**. L'éditer et le modifier de façon à obtenir une fenêtre chromatographique centrée sur les 2 pics d'intérêt. Sauvegarder la feuille de style

☛ Cliquer sur les résultats du fichier « Results » et faire apparaître une colonne Width USP

Sauvegarder :

**FILE / SAVE / SAVE CHROMATOGRAM**

**FILE / SAVE / SAVE UPDATE METHOD**

☞ **Imprimez** le premier chromatogramme, pour cela cliquer sur Print Preview : n'imprimer qu'à la condition que n'apparaisse pas en travers du chromatogramme : DATA NOT SAVED, et vérifier que le zoom est correctement réalisé sur les 2 pics d'intérêt ; dans le cas contraire, sauvegarder le chromatogramme et recommencer.

## 2. PROCÉDURE D'ACQUISITION D'UN CHROMATOGRAMME EN ISOTHERME 90°C

### 2.1. Injection de la solution à analyser

Reprendre la méthode précédente et changer la programmation du four comme suit :

**oven** : isotherme 90°C pendant 1 minute.

Sauvegarder la méthode : **FILE/SAVE AS/SAVE METHOD AS**, en modifiant le nom selon Isotherme90

Aller dans la séquence pour décocher la 1<sup>ère</sup> ligne et cocher la 2<sup>nd</sup> ligne. La remplir.

### 2.2. Injection de l'air

Cocher la 3<sup>ème</sup> ligne. La remplir et cliquer sur l'icône (flèche verte) pour débiter une séquence d'analyse : start sequence

Aller dans l'onglet system et attendre l'affichage de « **Waiting for injection** » en bas au centre de la fenêtre.

☞ Sur l'**Headspace HS16**, laisser le vial en position 1, et rajouter un vial rempli d'air en position 2 du carousel.

Indiquer sur l'onglet « Exécute » de l'écran tactile de l'**Headspace HS16**, (à l'aide du stylet ou de votre doigt) que celui-ci doit analyser les vials en position 1 et 2, c'est-à-dire indiquer **Flacons 1 à 2**.

☞ Sélectionner **Timing** (en bas au centre de l'écran) : Modifier, le Temps de Cycle = 1 min

☞ Sélectionner « Démarrer » et « Méthode Active », le départ de l'analyse s'effectue automatiquement.

## 3. PASSAGE DE LA GAMME, DE L'ETALON DE CONTROLE ET DE L'INCONNUE

### 3.1. Programmation de la séquence d'analyse

☞ Paramètres de la séquence d'analyse :

**Enabled** : cocher seulement l'analyse à faire (à changer à chaque injection)

**Method** : nom de la méthode optimisée pour l'analyse

**Run Name** : le nom de l'échantillon : *Etalon1*

**Suffix** : le numéro de l'analyse : en principe 4.

**Run Info** : composition exacte de l'échantillon

**Run Time** : 1 min

☞ Répéter le processus deux fois pour chaque point de gamme, l'étalon de contrôle, et l'inconnue. (Ne pas oublier de changer le **Run Name** et le **Suffix** à chaque fois !)

**La méthode reste identique pendant le passage** des autres points de gamme, de l'étalon de contrôle et de l'inconnue.

Remarque : Pour démarrer une séquence d'analyse, il ne faut pas oublier, à chaque fois, de décocher les analyses déjà effectuées.

Lorsque la séquence est entièrement remplie, cliquer sur l'icône (flèche verte) pour débiter la séquence d'analyse : start sequence.

Aller dans l'onglet system et attendre l'affichage de « **Waiting for injection** » en bas au centre de la fenêtre.

☞ Sur l'**Headspace HS16**, placer les vials dans les positions correspondantes à celles indiquées dans la séquence.

Indiquer sur l'onglet « Exécute » de l'écran tactile de l'**Headspace HS16**, (à l'aide du stylet ou de votre doigt) que celui-ci doit analyser les vials en position 1 à 15, c'est-à-dire indiquer **Flacons 1 à 15**.

☞ Sélectionner « Démarrer » et « Méthode Active », le départ de l'analyse s'effectue automatiquement.

## 3.2. Identification des pics

- ☞ Ouvrir le fichier chromatogramme correspondant au premier point de gamme, via File/Open/Open Chromatogram (le chromatogramme se trouve dans le dossier du jour de la semaine de réalisation du TP)
- ☞ Cliquer sur la méthode locale associée au fichier Chromatogram, puis dans l'onglet Data, cliquer sur « peak identification » puis faire un clic droit dans la fenêtre qui se trouve sous le chromatogramme : « initialize from chromatogram », et cliquer sur YES.
- ☞ Indiquer, ensuite, le nom des pics, puis réintégrer le chromatogramme, en cliquant sur l'icône d'intégration :



Le nom des pics doit clairement apparaître sur le chromatogramme, si ce n'est pas le cas, réitérer l'intégration. Supprimer les autres lignes si elles existent

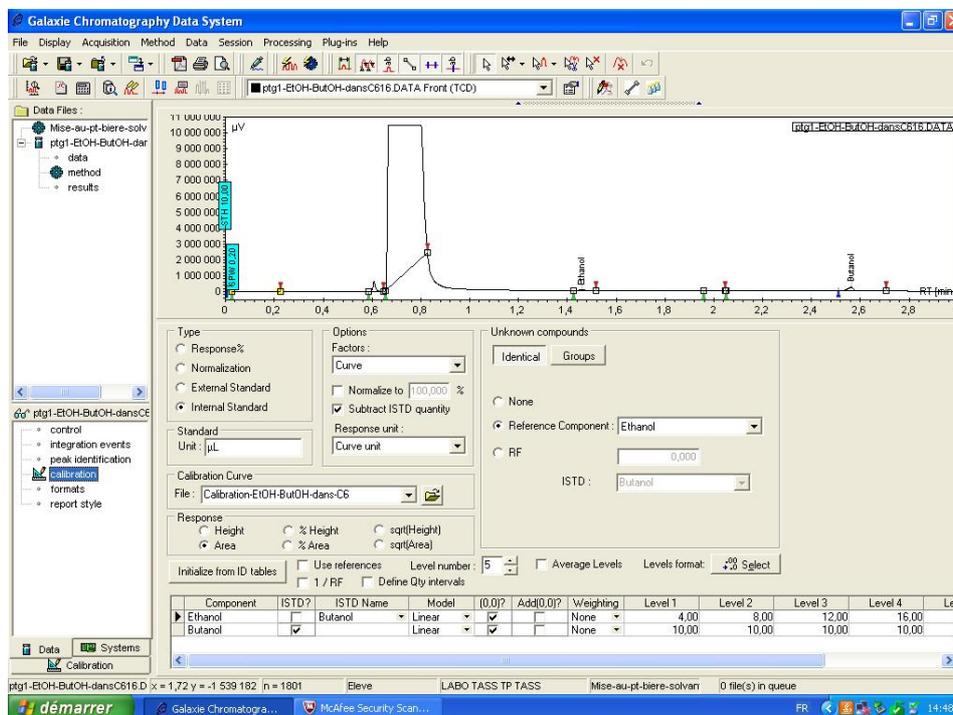
- ☞ Sauvegarder le chromatogramme FILE/SAVE/SAVE CHROMATOGRAM, et les modifications dans la méthode globale : FILE/SAVE/SAVE UPDATE METHOD, cliquer sur OK.

# 4. ÉTALONNAGE INTERNE

## 4.1. Création de la feuille de calibration en étalonnage interne (par la méthode locale)

☞ Le chromatogramme correspondant au premier point de gamme étant ouvert :

- ☛ Vérifier que les pics soient identifiés, **sinon** : sélectionner « **peak identification** », si la fenêtre de droite présente déjà un tableau, passer au point suivant, sinon faire un clic droit sur les pics à identifier, puis choisir dans le menu déroulant : peak → Add to peak ID table, et dans la table indiquer les noms des pics à la place d'UNKNOWN.
- ☛ Côté l'éthanol et l'étalon interne en Cal pour pouvoir l'utiliser dans la feuille de calibration.
- ☛ Sélectionner Calibration en bas à gauche.



- ☛ Dans Type : côté **Internal Standard**
- ☛ Dans File : indiquer un nom de fichier (dans lequel va se trouver votre courbe d'étalonnage) sous le format : **etalonnage-interne-jjmm-initiales**
- ☛ Dans Response unit : **Curve unit**
- ☛ Dans Standard Unit : **g/L**
- ☛ Il faut côté **l'étalon interne en ISTD** et côté **Substract ISDT quantity**
- ☛ Côté **Reference Component**
- ☛ **TRÈS IMPORTANT À REMPLIR** : Dans la ligne correspondant à l'éthanol : le nombre de Level (Level correspond à un point de gamme), ici 6. Indiquer dans level 1 : 32,13 ; level 2 : 64,26 ; level 3 : 96,39 ; level 4 : 128,52 ; level 5 : 160,65 et level 6 : 192,78 (les " tirets " ne doivent plus apparaître).

Ces valeurs sont théoriques, il faudra indiquer les valeurs réelles !

Dans la ligne correspondant à l'étalon interne, les 6 level doivent être à 112,455.

Ces valeurs sont théoriques, il faudra indiquer les valeurs réelles !

Si les lignes correspondantes à l'éthanol et à l'étalon interne (propanol) n'apparaissent pas, il faut au préalable cliquer sur **Initialize from ID Tables**.



Remarque

Les « level » se remplissent en bas de la fenêtre, si vous ne les voyez pas, il faut agrandir la fenêtre.

**Remarque importante** : pour que la prise en compte du nom de la courbe de calibration ait bien lieu, il faut cliquer sur **Reprocess** du chromatogramme (icône "roue dentée"), puis **Close**.

On sauvegarde :

**FILE / SAVE / SAVE CHROMATOGRAM**

**FILE / SAVE / SAVE UPDATE METHOD**

On pourrait faire toutes ces opérations pour chaque chromatogramme (gamme + inconnus), il est plus rapide et plus simple d'utiliser une feuille de re-calcul (Reprocessing List)

☞ Fermer le ou les chromatogrammes ouverts :

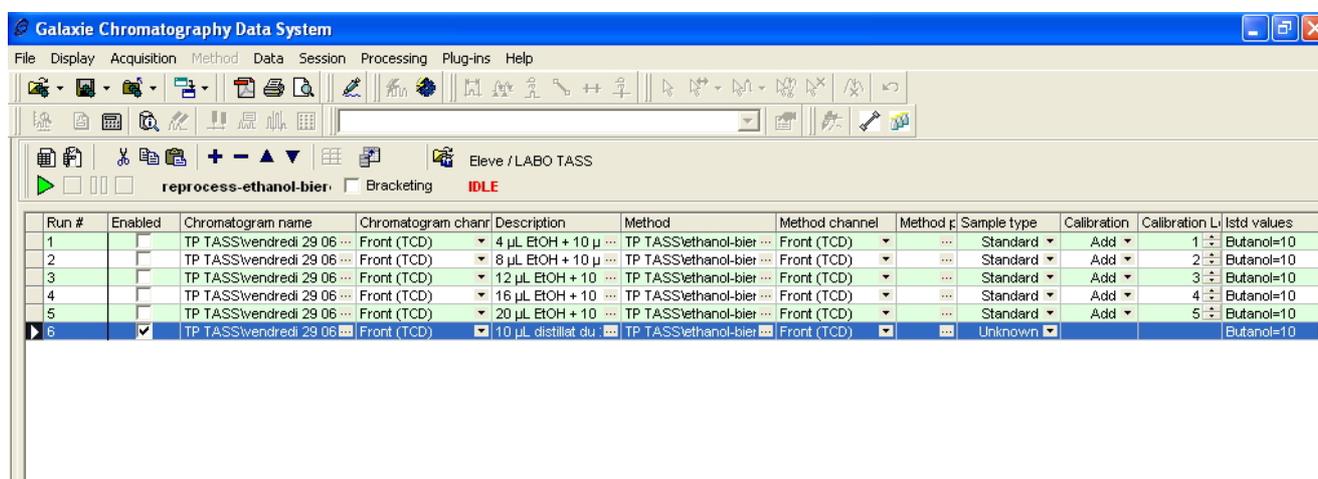
**FILE/CLOSE/CLOSE CHROMATOGRAM**

## 4.2. Utilisation d'une liste de re-calcul pour obtenir la courbe de calibration ainsi que la quantité recherchée pour l'inconnue

Ensuite, on retrace les chromatogrammes (afin d'obtenir les résultats de l'étalonnage interne, c'est-à-dire la courbe Aire pics d'éthanol/Aire pics d'étalon interne = f(cc en éthanol/cc en étalon interne). Il existe une méthode qui permet d'effectuer cette opération sur tous les chromatogrammes en même temps (très utile, lorsqu'il y a beaucoup de chromatogrammes à retracer), en créant, au préalable, une liste de re-calcul, pour cela :

### FILE / NEW / NEW REPROCESSING LIST

Dans Number of Lines : 15, clic sur NEXT, rentrer un nom de liste de reprocess, puis cliquer sur OK, la fenêtre suivante doit apparaître :



Remplir la colonne « **Chromatogram name** » en cherchant les fichiers data utiles de la gamme d'étalonnage interne, avec les inconnues (**ATTENTION : dans un premier temps : celles-ci devront être décochées**), puis on indique la méthode utilisée pour l'étalonnage interne. On indique pour les rubriques :

« **Sample type** » : **Standard** ; (pour les points de gamme)

« **Calibration** » : **Add** ;

« **Calibration level** » : **1** (correspond au premier point de gamme, **2** pour le second point, et ainsi de suite... ) ;

« **Method properties** » : décocher **Clear chromatogram manual operations** ;

et on indique la valeur de l'étalon interne dans la rubrique « **ISTD Values** », la valeur **96,39** (**Attention cette valeur est théorique**). On sauvegarde la liste :

### SAVE / SAVE REPROCESSING LIST

**ATTENTION : TOUS LES CHROMATOGRAMMES DOIVENT ÊTRE FERMÉS POUR QUE LE RETRAITEMENT PUISSE AVOIR LIEU !**

Appuyer sur la flèche verte pour démarrer le calcul, puis cliquer sur YES au message de signature.

Ensuite, il faut recalculer l'étalon de contrôle et les inconnues, pour cela il suffit de décocher les points de gamme, et de cocher inconnues.

On indique pour les rubriques :

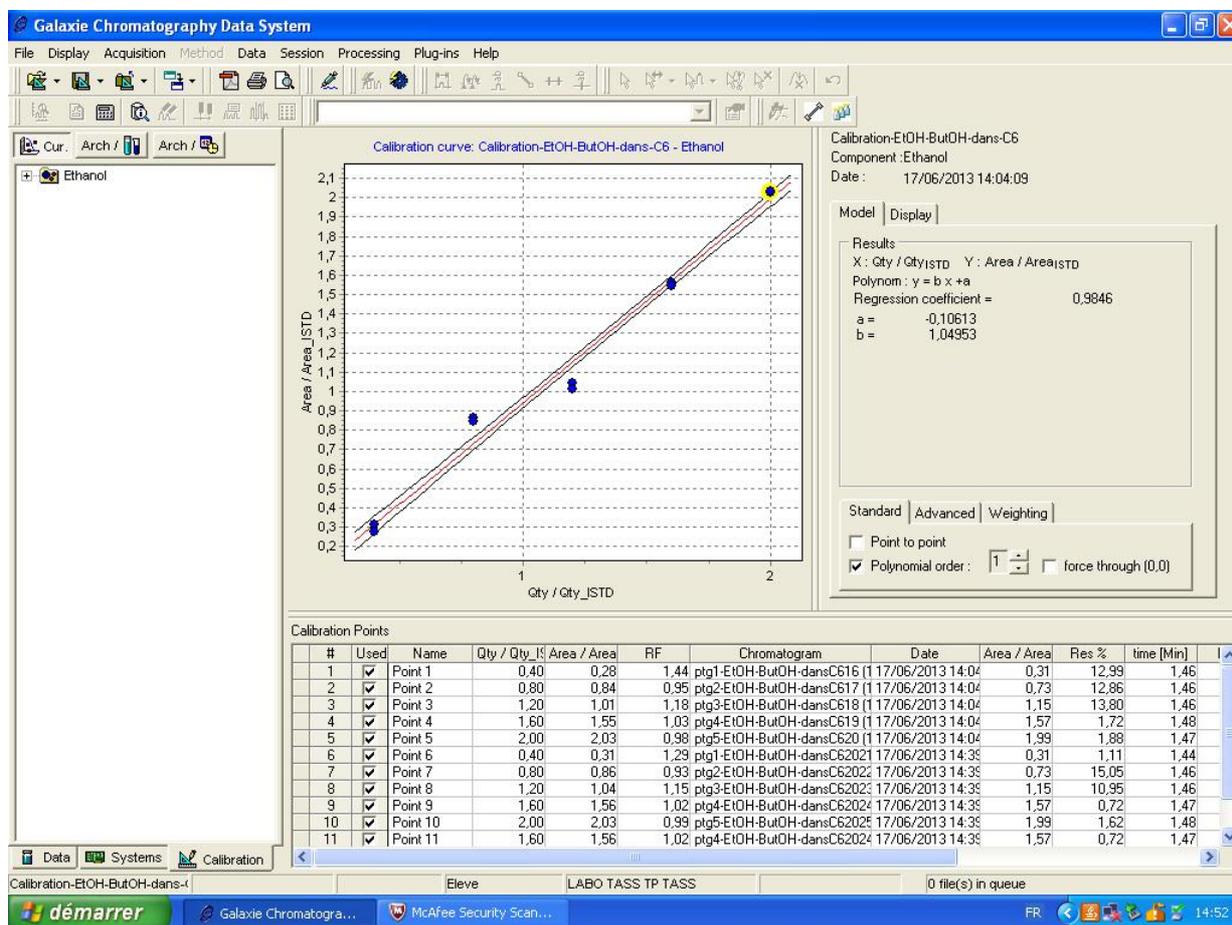
- « **Sample type** » : **Unknown** ;
- « **Calibration** » : Rien ;
- « **Calibration level** » : Rien ;
- « **ISTD values** » : **la masse pesée en EI.**

On sauvegarde la liste :

### SAVE / SAVE REPROCESSING LIST

et appuyer sur la flèche verte pour démarrer le calcul, puis cliquer sur YES au message de signature.

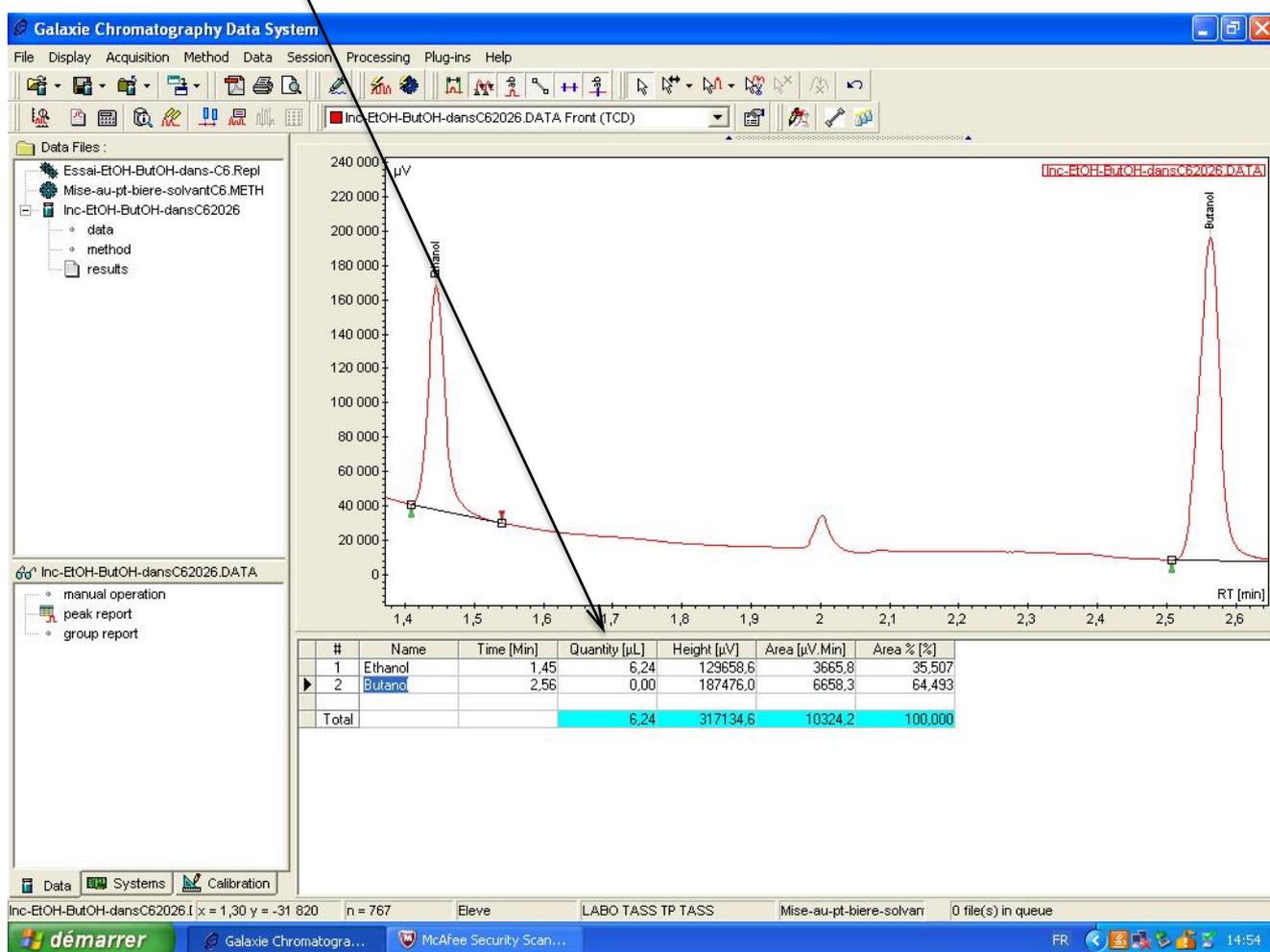
☞ Cliquer dans l'onglet Calibration (en bas à droite) puis observer les résultats de l'étalonnage : FILE / OPEN CALIBRATION CURVE



Q Quel est l'intérêt d'utiliser un étalon interne ?

Q Quelle particularité doit avoir l'étalon interne ?

☞ Ouvrir le fichier Chromatogramme de la première inconnue : File → Open Chromatogram, le résultat s'affiche dans « **Result** » colonne Quantity, supprimer les lignes inutiles,



☞ Cliquer sur la méthode locale associée au fichier Chromatogram, puis cliquer sur « report style » et dans l'onglet data, ouvrir le fichier **Alcools.STYL**.

☞ Cliquer sur les résultats du fichier « Results » et supprimer les pics inconnus (s'il y a lieu), en sélectionnant la ligne correspondante puis à l'aide du clic droit de la souris, faites « Delete Current Peak ».

Sauvegarder :

**FILE / SAVE / SAVE CHROMATOGRAM**

**FILE / SAVE / SAVE UPDATE METHOD**

☞ **Imprimez** les résultats de l'étalon de contrôle, pour cela cliquer sur Print Preview : n'imprimer qu'à la condition que n'apparaisse pas en travers du chromatogramme : DATA NOT SAVED ; dans le cas contraire, sauvegarder le chromatogramme et recommencer.

☞ **Imprimez** les résultats des inconnues, de la même façon, en ayant fermé au préalable, le chromatogramme précédent. **Imprimez** enfin la **courbe de calibration**. Pour cela cliquer sur la méthode locale associée au fichier Chromatogram, puis cliquer sur " report style" et dans l'onglet data, remplacer le fichier **Alcools.STYL** par **ALCOOL-courbe-calibration.STYL**.

## 5. LANCEMENT DE LA MÉTHODE DE COUPURE DU GC

FILE / OPEN / OPEN METHOD : sélectionner la méthode de coupure du GC et,

☞ Dans la partie **Control** de la méthode, vérifier que les différents paramètres suivants correspondent à ce qui est indiqué ci-dessous :

- **Injecteurs** : OFF 50 °C ;
- **Température four** : ON Isotherme à 30 °C pendant 10 min ; (la stabilisation doit être à 0,5 min).
- **Débit** sur colonnes via EFC23 : 0,2 mL/min ;
- **Détecteur** : OFF 50 °C ;
- **Température du filament** : 50 °C.

☞ Sauvegarder la méthode (FILE / SAVE / SAVE METHOD), puis charger-là dans le GC.

C'EST SEULEMENT LORSQUE LE VOYANT VERT « READY » DU GC APPARAÎT, QUE VOUS POUVEZ ALORS ÉTEINDRE L'APPAREIL.

## 6. ÉLÉMENTS DE REPONSE AUX QUESTIONS

**Q** L'utilisation du débit ici est de 5 mL/min, pourquoi n'utilise-t-on pas un débit beaucoup plus grand ?

L'augmentation du débit permet d'augmenter la vitesse de déplacement des solutés et donc de diminuer le temps d'analyse.

On pourrait, d'une part, voir que lorsque l'on augmente d'un facteur 2 le débit, cela diminue d'un facteur 2 les temps de rétention des composés considérés, mais au risque d'avoir une mauvaise résolution des pics d'intérêt. D'autre part, cela entraîne une diminution drastique de la durée de vie des colonnes.

**Q** Pourquoi choisit-on une polarité "Negative" pour le détecteur ?

Le détecteur fonctionne par mesure différentielle. Deux colonnes sont connectées sur le détecteur, une colonne polaire en position "Front" et une colonne apolaire en position "Medium". Le constructeur indique que la colonne en position "Front" correspond à une polarité "Négative", et celle en position "Medium" à une polarité "Positive". C'est la raison pour laquelle, il nous faut choisir une polarité "Négative" pour la colonne polaire, dans le cas contraire tous les pics seraient dirigés vers le bas !

**Q** Pourquoi utilise-t-on une colonne polaire pour séparer l'éthanol et le propanol ?

L'éthanol est polaire, le propanol un peu moins, étant donné que ces deux composés appartiennent à une série de composés homologue, leur séparation s'effectuera selon le point d'ébullition des espèces à séparer :

$$\theta_{\text{ébullition}}(\text{éthanol}) = 78 \text{ }^{\circ}\text{C} ;$$

$$\theta_{\text{ébullition}}(\text{propanol}) = 94 \text{ }^{\circ}\text{C} ;$$

Le 1<sup>er</sup> pic observé sera donc celui de l'éthanol, et le second celui du propanol.

On pourrait utiliser la colonne apolaire pour la séparation mais les pics seraient moins Gaussien.

**Q** Quel est l'intérêt d'utiliser un étalon interne ?

Cette méthode utilise un marqueur introduit comme référence. Cela permet de s'affranchir de l'imprécision concernant les volumes injectés, un handicap en étalonnage externe.

**Q** Quelle particularité doit avoir l'étalon interne ?

Il doit être pur et son pic d'éluion doit être bien résolu par rapport à tous ceux qui forment le chromatogramme de l'échantillon.

Son temps de rétention doit être proche de celui (ou de ceux) du (ou des) soluté(s) à doser ; sa concentration doit être proche ou supérieure à celle des autres solutés pour être dans les conditions d'une réponse linéaire du détecteur.

Il doit être inerte vis-à-vis des composés de l'échantillon.