

Plan d'expériences

Mise au point d'une méthode en Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP, HPLC) en vue d'un dosage avec étalon interne

I. Le plan d'expériences.

La notion de plan d'expériences s'est développée à partir des années 20 du siècle précédent, au début en biologie. Il fallait réduire le coût des expérimentations et les expérimentations animales. Cette méthode a gagné tous les domaines scientifiques et s'applique particulièrement bien à la chimie. Explorer en même temps plusieurs facteurs permet de minimiser le nombre d'expériences et de gagner du temps lors d'optimisation de méthode. Introduite dans de nombreux cycles universitaires, elle est enseignée par les collègues mathématiciens en BTS chimie. Il est recommandé de faire intervenir un plan d'expériences en travaux pratiques de chimie, en lien avec techniques utilisées par les élèves.

C'est pour cela que nous vous proposons un plan d'expériences faciles à mettre en oeuvre expérimentalement ou à utiliser directement avec les élèves. Il est basé sur l'étude par HPLC du rendement obtenu lors de la réaction de Sandmeyer sur l'acide 2-aminobenzoïque (ou anthranilique) pour préparer l'acide 2-chlorobenzoïque (BTS 1992).

II. Etude du plan proposé.

1-Caractéristiques générales du plan.

On désire trouver les meilleures conditions de dosage d'un mélange d'acide 2-chlorobenzoïque appelé composé (**a**) et d'acide 2-aminobenzoïque, composé (**b**), en prenant comme étalon interne la phénacétine, composé (**e**). L'éluant choisi est un mélange acétonitrile/eau. Les facteurs intervenant sont :

- La nature de la colonne
- La température
- Le volume injecté
- La concentration en étalon
- La concentration en acide 2-aminobenzoïque.
- d , le débit
- TE le titre de l'éluant
- CA la concentration en (**a**)

Les 5 premiers facteurs sont imposés soit par le matériel, soit par des expériences précédentes.

- Colonne : Wakosil C 18
- Température : 30°C
- Volume injecté : 20 μ L
- Concentration en étalon (**e**) : $2,5 \cdot 10^{-3}$ g/L
- Concentration en acide 2-aminobenzoïque (**b**) : $4,0 \cdot 10^{-3}$ g/L
- Longueur d'onde de mesure : 210 nm.

Les niveaux haut (+) et bas (-) des autres facteurs sont définis ainsi :

Facteur	+1	-1
d (mL/min)	1,5	0,5
TE (% acétonitrile/eau, V/V)	60/40	40/60
CA (g/l)	$16 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-3}$

Ordre de sortie : acide 2-chlorobenzoïque, acide 2-aminobenzoïque puis phénacétine.

On mesure trois réponses :

- Le temps de rétention du composé le plus long à sortir (l'étalon) : t_r
- La résolution (**a**)/(**b**) : R_{ab}
- La résolution (**e**)/(**b**) : R_{eb}

La résolution est définie par la relation :

$$R_{ab} = 2 \frac{(t_{r_2} - t_{r_1})}{\omega_2 + \omega_1}$$

t_{r_1} et t_{r_2} étant les temps de rétention des composés (**a**) et (**b**), ω_1 et ω_2 étant les largeurs à la base (en min) des pics déterminées par l'intersection des tangentes aux points d'inflexion des pics avec la ligne de base. La résolution doit être au moins égale à $2,16^1$

Le temps d'analyse (temps correspondant au retour à la ligne de base après la sortie du dernier pic chromatographique) doit être le plus petit possible.

On utilise une matrice factorielle complète 2^3 .

2-Préparations des solutions :

Les solutions « mères » sont préparées à ~ 1 g/L.

Les solutions « filles » sont préparées dans des fioles jaugées de 20 mL.

- Dans toutes les solutions « filles », placer :
 - 50 μ L de phénacétine (**e**) et
 - 80 μ L d'acide 2-aminobenzoïque (**b**).
- Ajouter 320 μ L de solution d'acide 2-chlorobenzoïque (**a**) pour la valeur haute ($16 \cdot 10^{-3}$ g/L) ou 80 μ L pour la valeur basse ($4 \cdot 10^{-3}$ g/L).
- Compléter au trait de jauge par l'éluant utilisé pour le numéro de l'expérience.

3-Plan d'expérimentation :

Expérience	Variables contrôlées			Réponses		
	d	TE	CA	t_r	Rab	Rbe
1	0,5	40/60	4.10^{-3}	8,79	3,456	6,336
2	1,5	40/60	4.10^{-3}	2,99	3,456	5,328
3	0,5	60/40	4.10^{-3}	5,54	3,312	3,312
4	1,5	60/40	4.10^{-3}	1,86	2,304	2,16
5	0,5	40/60	16.10^{-3}	8,72	3,6	4,176
6	1,5	40/60	16.10^{-3}	2,99	2,448	3,312
7	0,5	60/40	16.10^{-3}	5,44	1,872	2,016
8	1,5	60/40	16.10^{-3}	1,86	1,872	1,872

4- Exploitation des résultats :

Elle nécessite l'utilisation d'un logiciel. Nous nous sommes servis du logiciel LUMIERE².

Données :

Les caractéristiques des deux solvants sont les suivantes :

Viscosité² (en cP, à 25°C) :

- Eau 0,89
- Acétonitrile 0,34

Polarité² (suivant Rohrschneider)

- Eau $P_e = 10,2$
- Acétonitrile $P_a = 5,8$

On rappelle que la polarité d'un éluant peut se calculer par la loi des mélanges, en pondérant les polarités des solvants constitutifs par les fractions volumiques des solvants utilisés.

Par exemple pour un mélange en volumes V_A et V_B de deux solvants A et B de polarités P_A et P_B , la polarité du mélange sera prise égale à $P = (P_A V_A + P_B V_B) / (V_A + V_B)$.

La phénacétine est moyennement polaire.

Solubilité dans l'eau : 0,76g/L à 20°C. Soluble dans l'acétonitrile.

L'acide 2-chlorobenzoïque

Solubilité dans l'eau inférieure à 0,1g/L à 20°C. Soluble dans l'acétonitrile.

Comme tout acide carboxylique, il peut créer des liaisons hydrogène intermoléculaires.

L'acide 2 aminobenzoïque

Solubilité dans l'eau : 6g/L à 25°C. Soluble dans l'acétonitrile.

Peut créer des liaisons hydrogène intramoléculaires.

I. Etude du facteur t_r

A. Modèle complet

1. Rechercher les coefficients représentant les estimations des effets et donner l'expression du modèle pour le facteur t_r sous la forme polynomiale $t_r = f(e_0, e_1 \dots)$
2. Repérer les effets importants et les effets qui sont *a priori* négligeables.
3. Interpréter physico-chimiquement l'influence de chaque facteur prépondérant. Le signe d'un coefficient (effet) indique si la réponse varie dans le même sens (s'il est positif) ou en sens inverse (s'il est négatif).
On rappelle qu'un effet représente la demi-variation de la réponse lorsque la variable passe d'un état bas à un état haut.

Exemple : Etude du facteur d.

- Déterminer le signe du coefficient d , donc de son effet.
 - En déduire la variation de t_r quand d passe de la valeur basse à la valeur haute.
 - Montrer que cette variation correspond à ce que l'on pouvait attendre.
4. Etudier de la même manière l'effet de TE.
 5. On veut vérifier que certains effets sont négligeables. Pour cela, on va utiliser **le test de validité des effets**. On admettra que l'écart type expérimental σ vaut 0,035. Cette valeur est évaluée à partir de résultats expérimentaux et ajustée pour être cohérente avec celle trouvée par le modèle de Student. On rappelle que le test se compose des éléments suivants :
 - Un seuil de risque, fixé ici à 5%
 - Une hypothèse nulle H_0 correspondant ici à : **l'effet e considéré est nul.**
 - Une hypothèse alternative H_1 correspondant ici à : **l'effet e considéré est non nul.**

On se place dans l'hypothèse **Ho vraie** et on calcule les valeurs critiques. On suppose donc l'effet considéré comme nul. Alors l'intervalle d'acceptation de l'hypothèse est :

$$J_{\alpha} = \left[-t_{\alpha} \frac{\sigma}{\sqrt{n}} ; + t_{\alpha} \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \right], \text{ n étant le nombre d'expérience et } t_{\alpha} = 1,96 \text{ pour } \alpha = 5\%.$$

Montrer que les 4 effets sont négligeables.

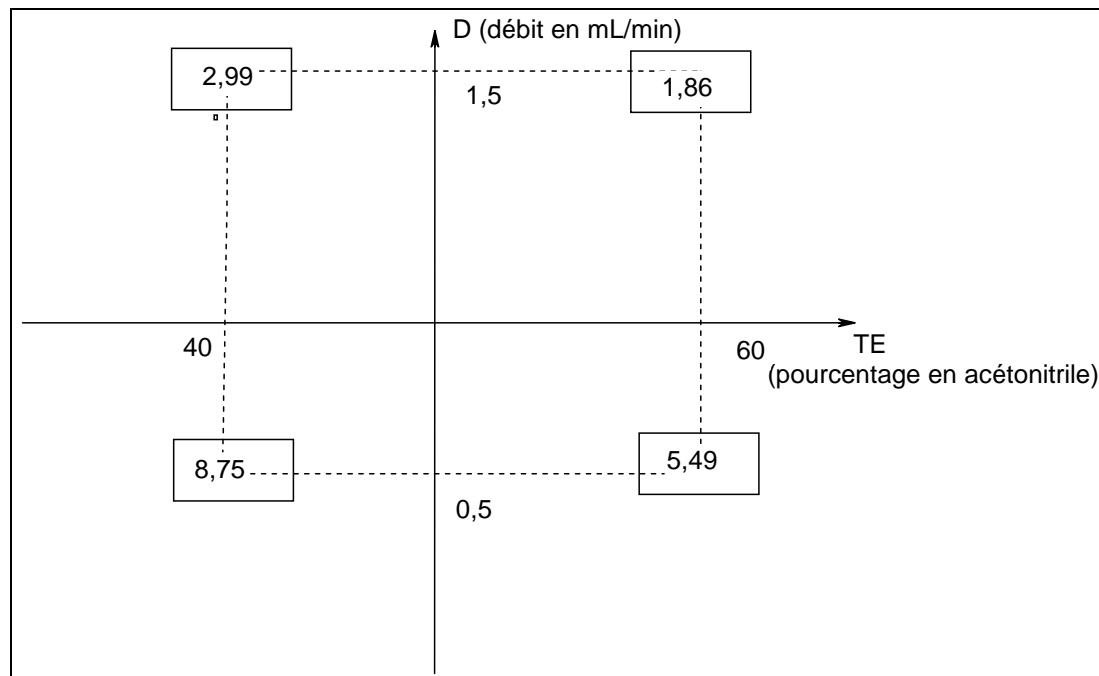
On peut alors utiliser un modèle réduit pour estimer T_r en ne faisant intervenir que les termes prépondérants.

6. Donner l'expression du modèle simplifié de t_r .

Pour aller (un peu) plus loin

B. Interaction entre les variables.

On peut observer que l'effet de $d \cdot TE$ n'est pas négligeable. Il y a donc interaction entre ces deux variables. On peut visualiser cette interaction entre les variables d et TE en étudiant le diagramme suivant :



A chaque intersection, on a représenté dans un rectangle la moyenne des valeurs prises par t_r pour d et TE fixés. Par exemple, pour l'intersection (60 ; 0,5), on a représenté la moyenne entre 5,54 et 5,44.

- On se place à un taux de 40% en acétonitrile. Calculer l'influence du débit sur T_r .
- Faire de même pour un taux de 60% en acétonitrile.
- Comparer les deux influences.

En étudiant les données sur la viscosité des deux solvants utilisés, interpréter la variation d'influence observée.

Ce type d'étude permet de mettre en évidence certains paramètres qui influencent une expérience et n'apparaissent pas de manière évidente au départ.

C. Modèle réduit.

A l'aide du logiciel, établir une nouvelle Régression Multiple avec seulement 4 paramètres. Il faut introduire en plus le nombre de degré de liberté du système réduit : $DDL = n - p$, p étant le nombre d'effets retenus (ici, $p=4$) et n le nombre d'expériences. Comme on a alors plus d'expériences que d'effets à estimer, on peut aussi calculer une estimation de l'écart type σ_{res} par un modèle de Student et le comparer à celui donné précédemment. Si ces deux écarts type sont du même ordre de grandeur, les estimateurs sont fusionnés (les variances sont moyennées) et le logiciel recalcule les paramètres statistiques. Vérifier que dans le cas étudié, les estimateurs sont bien fusionnés. Donner l'écart type fusionné.

II. Etude du facteur Rab

- Etudier d'abord le modèle complet comme pour le facteur t_r .
- Déterminer le nombre d'effets négligeables en prenant l'écart type égal à 0,05.
- Etudier seulement l'influence de d.

III. Etude du facteur Rbe

- Etudier d'abord le modèle complet comme pour le facteur t_r .
- Déterminer le nombre d'effets négligeables en prenant l'écart type égal à 0,32.
- Etudier seulement l'influence de d.

IV. Conclusion.

Estimer si, « physico-chimiquement », les effets trouvés et les interactions observées sont cohérents. Déterminer, à l'aide des résultats, les meilleures conditions : temps d'analyse le plus court et résolutions optimales. On pourra aussi tenir compte de l'environnement et, dans les choix prévus, intégrer le facteur : "le moins de solvant (acétonitrile ici) possible".

Notes et bibliographies.

1- Valeur plus grande que celle usuellement utilisée (1,5 à 2) à cause de la non symétrie des pics obtenus.

2- SIER . Logiciel LUMIERE version 5.01 tel. : 01 39 89 73 01 - fax : 01 39 89 83 82) . (Ne semble plus être disponible).

Tout logiciel de traitement statistique convient.

3- Valeurs tirées de : Manuel pratique de chromatographie en phase liquide. R. Rosset; M.Caude; A. Jardy. Masson. Seconde édition.

Sur les plans d'expériences :

- Les plans d'expériences. G. et M.C. Sado. AFNOR
- Chimie industrielle. R.Perrin et J.P. Scharff. Masson.
- Sur la toile :
 - Méthodologie expérimentale. Cours de Fabien Picaud (format PDF)
lpm.univ-fcomte.fr/Cours/CYCLE1/fab_cours.pdf
 - Cours sur les plans d'expériences : site des Ressources Nationales de Chimie
Paul Bénichou