

# Compléments à l'article « Dosage des acides organiques dans les vins par électrophorèse capillaire », M. Grimault, C. Sarazin et D. Lucas (*L'Act. Chim.*, 2016, 411, p. 26)

## Électrophorèse capillaire – Protocole du TP Année universitaire 2015-2016

L' électrophorèse capillaire (EC) est une technique complémentaire des méthodes chromatographiques qui permet la séparation d'un grand nombre de molécules par la migration d'espèces chargées dans un champ électrique (cations, anions, acides organiques, sucres...).

Tout comme la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) qui regroupe de nombreux modes de séparation (échange d'ions, partage entre phases normale et inverse, adsorption, exclusion...) selon la nature des phases stationnaire et mobile utilisées, l'EC regroupe un grand nombre de modes selon la nature de l'électrolyte de séparation et du capillaire utilisés (électrophorèse de zone, électrophorèse micellaire, électrophorèse sur gel...).

L'EC est une méthode d'analyse désormais reconnue en raison de ses qualités intrinsèques : efficacité et résolution élevées, rapidité et automatisation des séparations, conditionnement aisé du capillaire de séparation, faible consommation d'échantillons et de tampons de séparation, compatibilité avec de nombreux détecteurs (conductimétrique, fluorométrique, UV, spectrométrie de masse...).

### But

Vous aurez pour objectif d'analyser les acides organiques présents dans les vins, tout en procédant en parallèle à la validation de votre méthode (Cf. cours de validation de méthodes M1 CAC). Les analyses seront basées sur la norme OIV « Dosage des principaux acides organiques des vins et des sulfates par électrophorèse capillaire », provenant du *Recueil International des Méthodes d'Analyses* (2006) – Méthode OIV-MA-AS313-19.

### Principe

#### Mécanismes

La séparation des composés en EC résulte de deux mécanismes de transport : l'électromigration et l'électro-osmose.

#### Électromigration

L'électromigration résulte du déplacement d'une espèce chargée lorsqu'elle est soumise à un champ électrique.

La vitesse électrophorétique acquise est alors proportionnelle au champ électrique et à la mobilité électrophorétique de l'ion.

L'électromigration s'effectue dans le sens du champ électrique (mobilité électrophorétique positive) pour les cations et dans le sens opposé pour les anions (mobilité électrophorétique négative).

Les molécules neutres ne sont pas concernées par ce phénomène. En revanche, les ions, lorsqu'ils sont soumis à un champ électrique, se déplacent à une vitesse caractéristique constante qui est fonction de leur taille et de leur charge : un ion sera d'autant plus mobile que sa charge est élevée et que sa taille (ou son rayon ionique) sera faible.

#### Électro-osmose

Le flux électro-osmotique est quant à lui un phénomène particulier au capillaire de silice, correspondant à l'écoulement d'un liquide remplissant un capillaire (dont la paroi interne possède une charge de surface) lorsque celui-ci est soumis à un champ électrique tangentiel.

Dans le cas d'un capillaire de silice, les groupements silanols sont très acides et donnent facilement des groupements Si-O<sup>-</sup> dès que le pH est supérieur à 2, ce qui confère au capillaire une charge interne négative. Lorsque le capillaire est rempli d'un tampon électrophorétique, les cations du tampon viennent s'adsorber à la paroi interne. Lorsqu'on impose une tension dans le capillaire, la solution sera entraînée vers la cathode par la création d'un flux, entraînant dans le même mouvement toutes les espèces portées par le fluide, qu'elles soient chargées ou non.

Il est possible de modifier ou d'inverser ce flux de façon dynamique en ajoutant au tampon d'analyse certains tensioactifs cationiques ou des surfactants fluorés qui réduisent ou inversent la charge de surface par interaction avec les groupements silanols.

La somme de ces deux phénomènes définit la vitesse caractéristique de la molécule étudiée :

$$\text{vitesse de migration} = \text{vitesse électrophorétique} + \text{vitesse électro-osmotique}$$

Dans la configuration usuelle, la migration se fait dans un capillaire constitué de silice d'un diamètre interne allant de

50 à 100  $\mu\text{m}$ . Il est rempli d'une solution tampon ; l'injection se fait communément à l'anode (+) et on détecte à la cathode (-). On applique une tension aux bornes du capillaire et le déplacement des espèces est régi par les deux phénomènes que sont l'électromigration et l'électro-osmose.

Lorsqu'on applique une tension positive au sein du capillaire lorsqu'il s'agit d'un cation, les mobilités électrophorétique et électro-osmotique sont de même signe (*figure 1*) et provoquent un mouvement de migration rapide du cation vers le détecteur. Pour un anion, la mobilité électrophorétique est de signe opposé à celle du flux électro-osmotique (*figure 1*) ; ainsi, un anion ne migre vers la cathode que si sa mobilité électrophorétique est inférieure en valeur absolue à la mobilité électro-osmotique. Sinon, il est possible d'analyser cet anion en inversant le signe de la tension de séparation (tension négative).

Les molécules non chargées migrent toutes à la vitesse du flux électro-osmotique et ne sont pas séparées entre elles.

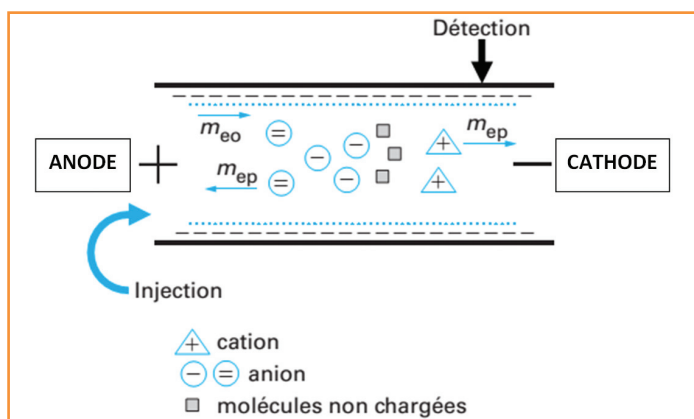


Figure 1 - Principe de séparation en électrophorèse capillaire.

### Types de détection

La détection UV est fournie commercialement sur tous les appareillages d'électrophorèse capillaire. Elle est réalisée directement à travers le capillaire au niveau d'une fenêtre établie en éliminant la couche de revêtement externe (*figure 2*).

D'après la loi de Beer-Lambert, l'absorbance UV dépend de la longueur du chemin optique, relié au diamètre du capillaire. Pour pallier le manque de sensibilité lié à ce faible chemin optique, des cellules en Z ou bien des capillaires à bulle peuvent être utilisés.

La plupart des anions et cations inorganiques n'absorbent pas ou peu dans la zone UV-visible. Ils ne peuvent donc pas être directement détectés. Pour pallier cette absence d'absorbance, de nombreuses méthodes impliquant une détection en UV indirecte ont été mises en œuvre avec l'utilisation d'agents visualisants ou chromophores.

Le chromophore doit être anionique pour l'analyse des anions, et cationique pour celle des cations. Lorsque les analytes passent devant le détecteur, une chute d'absorbance est détectée liée au défaut de concentration du chromophore et qui se traduit par un pic négatif. La valeur de la mobilité électrophorétique du chromophore est un paramètre très important : elle doit se situer dans la même gamme que celles des anions d'intérêt sous peine d'obtenir des pics fortement dissymétriques.

D'autres types de détection sont possibles pour les espèces inorganiques, telles que la conductimétrie qui est



Figure 2 - Fenêtre de détection sur le capillaire.

une alternative intéressante. Cette technique de détection a pour avantage d'être universelle pour l'analyse d'espèces ioniques. Elle implique une mesure de conductance entre deux électrodes, qui peut être réalisée soit par contact entre l'électrolyte de séparation et les électrodes de mesure, ou bien en mode sans contact dans lequel les électrodes se situent de part et d'autre du capillaire.

Enfin, pour les molécules organiques, des modes de détection tels que l'ampérométrie, la fluorimétrie ou bien la spectrométrie de masse ont été rapportés. Enfin, les couplages EC/SM (spectrométrie de masse) se sont énormément développés depuis la fin des années 1980, bien que présentant encore quelques difficultés de mise en œuvre.

### Paramètres importants

Le **pH du tampon** est le paramètre le plus important puisqu'il détermine l'état d'ionisation des espèces analysées ainsi que l'amplitude du flux électro-osmotique.

La **force ionique** influe aussi de façon importante sur le flux électro-osmotique ainsi que sur la mobilité électrophorétique des ions analysés. Si des tampons de force ionique faible permettent de réaliser des séparations rapides, des tampons de force ionique élevée sont aussi intéressants car ils offrent l'avantage d'améliorer la résolution de la séparation.

La **tension appliquée** et la **température** représentent des paramètres secondaires dans l'optimisation d'une séparation.

### Appareillage

L'EC est constituée d'un capillaire de séparation dont les extrémités sont immergées dans des réservoirs contenant un électrolyte, de deux électrodes de platine plongeant dans ces réservoirs et alimentées par un générateur de tension, d'un système d'injection des échantillons et d'un système de détection (*figure 3*).

### Capillaire

Le capillaire, d'environ 50 cm de longueur et 50  $\mu\text{m}$  de diamètre interne, est constitué de silice fondue et revêtu d'une couche de polyimide afin d'en assurer la flexibilité.

La surface interne de silice est constituée de silanols dont l'ionisation permet de générer un flux électro-osmotique dirigé vers la cathode (voir § « Principe »).

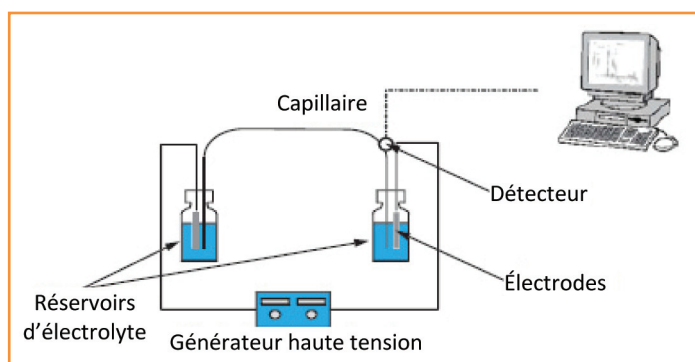


Figure 3 - Appareillage de l'électrophorèse capillaire.

### Générateur de tension

Le générateur de haute tension permet d'imposer une différence de potentiel entre les deux électrodes de platine, situées à chaque extrémité du capillaire. Cette différence de potentiel est essentielle, non seulement lors de la séparation, mais aussi lors de certains types d'injection (voir ci-après).

Le générateur utilisé peut générer des tensions variant de 0 à  $\pm 30$  kV.

Dans notre cas, les ions analysés étant des anions, nous appliquerons des tensions négatives, c'est-à-dire que l'électrode négative est du côté de l'injection.

### Thermorégulation

L'EC possède un système de thermorégulation. En effet, les courants générés lors de l'application d'un voltage conduisent à un échauffement (effet Joule) du capillaire et de l'électrolyte. Il est donc nécessaire de dissiper cette chaleur. Un système de convection forcée à l'air est donc en place sur l'EC.

Dans notre cas, la température sera régulée à 25 °C.

### Modes d'injection

#### Hydrodynamique

Ce mode d'injection est particulièrement utilisé en EC car il est indépendant de la nature des composés.

L'injection hydrodynamique consiste à imposer une différence de pression entre les deux extrémités du capillaire, plongées préalablement dans l'échantillon (du côté de la cathode) et dans le tampon (du côté de l'anode), créant une surpression à l'entrée et une dépression à la sortie.

On injecte pendant quelques secondes (3 à 10 s) sous 50 mbar de pression, ce qui conduit à l'injection de volumes de l'ordre de 1 à 50 nL.

#### Électrocinétique

L'injection électrocinétique consiste à appliquer une tension qui va permettre l'introduction des solutés par migration, après avoir plongé ici encore une des extrémités du capillaire dans l'échantillon.

Les solutés migrant à des vitesses différentes, les quantités injectées sont différentes. De plus, elles dépendent également de la matrice de l'échantillon. On ne peut plus dans ce cas parler de volume d'injection de l'échantillon, mais de quantités injectées, et ce pour chacun des solutés.

Dans notre cas, les injections seront effectuées à - 10 kV pendant 3 s.

### Détecteur

Le détecteur de l'EC est un détecteur UV à longueur d'onde fixe (de 190 à 380 nm), utilisant une lampe à deutérium ( $D_2$ ) comme source de lumière. Les limites de détection sont de l'ordre de  $10^{-8}$  à  $10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup>.

Il sera déjà fixé à 254 nm dans le cadre de l'analyse des acides organiques dans les vins, car il s'agit de la longueur d'onde d'absorption maximale du chromophore dans le tampon d'analyse.

Une partie de la surface du capillaire est brûlée afin de créer une fenêtre de détection à 9 cm de la sortie, permettant une analyse directement sur le capillaire et donc de s'affranchir du volume mort, mais induisant en contrepartie des volumes de détection extrêmement faibles.

### Traitement des données

La jonction entre l'EC et l'ordinateur est assurée par un module contrôlé par clé USB. Il sera donc nécessaire de toujours brancher cette clé sur l'ordinateur afin de faire fonctionner le logiciel « Clarity », sur lequel vous traiterez les données.

### Validation de méthodes

Pour la validation de méthodes, on étudiera les trois acides organiques suivants : malique, tartrique et lactique.

Quatre principaux paramètres seront à déterminer : la linéarité, la limite de détection (LD), la limite de quantification (LQ) et la répétabilité.

### Linéarité

La linéarité de la gamme d'étalonnage est en général établie avec un minimum de cinq concentrations.

En EC, l'analyse quantitative est effectuée le plus souvent en utilisant les surfaces des pics plutôt que les hauteurs car la gamme de linéarité s'en trouve étendue.

On considérera qu'une droite est dite linéaire si son coefficient de régression est supérieur ou égal à 0,99.

L'ajout d'un étalon interne à la solution permet de gagner en linéarité. Dans cette méthode, l'aire corrigée du pic de l'analyte est calculée à partir de la formule suivante :

$$\text{aire corrigée} = \frac{\left( \frac{\text{aire acide}}{\text{temps migration acide}} \right)}{\left( \frac{\text{aire étalon interne}}{\text{temps migration étalon interne}} \right)}$$

### Limite de détection (LD) et de quantification (LQ)

La limite de détection correspond à la quantité la plus faible d'analyte qui peut être détectée dans l'échantillon, mais pas nécessairement quantifiée comme une valeur exacte. Elle est souvent définie comme la quantité d'analyte qui donne un rapport signal/bruit égal à 3.

La limite de quantification correspond à la quantité d'analyte la plus faible qui peut être quantifiée avec une exactitude et une fidélité convenables. Elle est souvent définie comme la quantité d'analyte qui donne un rapport signal/bruit égal à 10.

LD et LQ peuvent être évaluées en se basant sur une évaluation visuelle, sur le rapport signal/bruit ou sur l'écart-type de la réponse et la pente de la droite d'étalonnage ; nous appliquerons cette dernière méthode dans notre cas.

LD et LQ peuvent être abaissées en augmentant le diamètre du capillaire (qui a pour effet d'augmenter le parcours optique et le volume injecté), en augmentant le temps et la pression d'injection, en utilisant un solvant de l'échantillon de faible conductivité par rapport à l'électrolyte, en choisissant un tampon dont les ions ont une mobilité voisine de l'analyte.

### Répétabilité

Elle exprime la fidélité (l'écart de l'accord entre des résultats d'essai indépendants obtenus sous des conditions stipulées) lorsque les mêmes conditions opératoires (même analyste, même appareil...) sont appliquées sur un court intervalle de temps.

La répétabilité est évaluée par injections successives (souvent dix injections) d'une même solution étalon. Les réponses analysées sont les temps de migration et les surfaces. Parmi les principaux facteurs qui contribuent à assurer une bonne répétabilité des temps de migration et des surfaces en EC figurent la nature du tampon de l'électrolyte, l'introduction d'étapes de rinçage dans le protocole d'injection, le volume injecté et l'utilisation d'un étalon interne.

La répétabilité des temps de migration est un paramètre important si les temps de migration sont utilisés pour confirmer l'identité des substances ; elle est souvent voisine de 1 % en EC.

La répétabilité des surfaces corrigées (par ajout de l'étalon interne) en EC est souvent voisine de 1-2 % pour un produit principal. Nous tolérerons dans le cadre de ce TP une répétabilité pouvant aller jusqu'à 5 %. L'étalon interne permet de s'affranchir des variations du système d'injection.

Le coefficient de variation CV se calcule de la manière suivante :

$$CV = \frac{\text{écart - type}}{\text{moyenne}} * 100$$

## Partie expérimentale

Commencer par allumer l'EC (temps de chauffe de la lampe du détecteur de 30 min à 1 h).

### Préparation des solutions

**Attention : toutes vos solutions doivent être préparées dans l'eau ultrapure et être filtrées avant d'être analysées !**

➤ Tampon (déjà préparé – voir norme pour plus d'informations)

On utilisera dans notre cas un tampon de pH = 5,64 comprenant notamment :

- du CTAB (bromure d'hexadécyltriméthylammonium) ajouté en tant qu'agent tensioactif ;
- du PDC (2,6-pyridinedicarboxylate) agissant comme ion chromophore.

➤ Préparation de la solution de NaOH 0,1 M

À partir de la solution de NaOH à 1 M, préparer la solution à 0,1 M dans une fiole de 50 mL.

Pendant ce temps, conditionner la colonne capillaire en procédant aux étapes 1 et 2 du mode opératoire disponible en salle, **en pensant à bien filtrer vos solutions sur membranes Millipore**, tout en préparant la suite de vos solutions.

➤ Préparation des solutions mères d'acides organiques

- Dans des fioles de 200 mL, préparer des solutions à 1 g/L en acides malique (1) et tartrique (2).
- Pour la solution d'acide lactique, préparer une solution à environ 1 g/L (3) à partir de la solution mère à environ 10 g/L.

Celle-ci sera titrée afin de connaître sa concentration exacte par un dosage avec de la soude à 0,01 M (à préparer) et un indicateur coloré.

Dosage acide faible/base forte donnant une base faible à l'équivalence.

pH à l'équivalence :

$$pH = 7 + \frac{1}{2} (pK_a + \log C) = 7 + \frac{1}{2} (3,9 + \log 0,01) = 8$$

Conditions liées à la formule :

✓ pH ≥ 7,5

✓ pH ≥ pK<sub>a</sub> + 1

**pK<sub>a</sub> acide lactique = 3,9**

**Bleu de Thymol : 8,0-9,6 (zone de virage : jaune à bleu)**

➤ Préparation d'une solution étalon comprenant tous les acides

À partir des solutions mères en acides (1), (2) et (3), préparer une solution étalon comprenant les trois acides, chacun à une concentration de 200 mg/L, dans une fiole de 250 mL (4).

**Remarque :** cette gamme sera celle utilisée pour les 12 h de TP (à conserver dans le noir entre les deux séances sous votre paillasse).

➤ Préparation de l'étalon interne

Dans une fiole de 100 mL, préparer une solution à 2 g/L en chlorate de sodium (5).

À partir de cette solution (5), préparer une solution diluée de 100 mL afin d'avoir une concentration en étalon interne à 200 mg/L (6).

➤ Préparation de la gamme étalon comprenant tous les acides

Préparer la gamme étalon suivante dans des fioles de 50 mL :

Concentration des acides (mg/L)	mL solution (4) mélange d'acides	mL solution (6) étalon interne	mL eau ultrapure
20	5	10	qsp 50 mL
40	10	10	qsp 50 mL
60	15	10	qsp 50 mL
80	20	10	qsp 50 mL
100	25	10	qsp 50 mL

Penser à bien recalculer les concentrations exactes de chacun de vos acides dans les solutions étalons finales.

**Filtrer TOUTES vos solutions sur membrane Millipore.** Les placer sur le carrousel comme lors du conditionnement en suivant le mode opératoire distribué en cours (partie 2).

### Validation de méthodes

Procéder à la suite du mode opératoire pour lancer vos analyses (partie 3). Tous les tests de validation seront effectués avec les deux modes d'injection : hydrodynamique et électrocinétique.

### ➤ Optimisation de la tension

Tester ces différentes tensions d'analyse en hydrodynamique et électrocinétique sur la solution intermédiaire à 60 mg/L. Relever la réponse de l'appareil selon les conditions imposées : - 10 kV, - 16 kV, - 22 kV.

En fonction du tampon utilisé, déterminer le mode de détection appliqué dans notre cas (direct ou indirect). Justifier votre réponse.

Quelle est la meilleure tension dans chacun des cas ? Justifier votre choix.

Ces tensions seront appliquées et conservées jusqu'à la fin du TP.

### ➤ Linéarité

Passer votre gamme étalon préparée précédemment.

Tracer la droite d'étalonnage pour chacun des acides, avec les aires et les aires corrigées.

Conclure sur vos résultats.

### ➤ LD et LQ

À partir de vos droites d'étalonnage et de la méthode des moindres carrés, déterminer LD et LQ pour chacun des acides. Vous pouvez effectuer vos calculs grâce à la fiche jointe en annexe et au fichier Excel disponible sur l'ordinateur.

### ➤ Répétabilité

À partir de la solution intermédiaire à 60 mg/L, effectuer des tests de répétabilité pour vos acides, avec les aires et les aires corrigées, ainsi que les temps de migration.

Pour cela, effectuer dix analyses successives dans les deux modes d'injection, et calculer la moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation.

Le coefficient de variation est jugé acceptable lorsqu'il tourne aux alentours de 5 %.

Conclure sur vos résultats.

## Analyses qualitatives et quantitatives des vins

Diluer vos échantillons de vin d'un facteur 25 dans des fioles

de 50 mL, en incorporant également 10 mL de la solution d'étalon interne (6).

Passer de nouveau votre gamme étalon, puis les préparations diluées des vins par trois fois.

Identifier vos pics, en vous basant sur votre gamme étalon, ainsi que sur l'électrophérogramme disponible en annexe.

Déterminer les concentrations en acides malique, tartrique et lactique pour chacun des échantillons.

Quelles conclusions pouvez-vous faire pour chacun des vins (en fonction de leur origine, type, concentrations...) ? Y a-t-il des différences notables ?

## Analyses qualitatives et quantitatives de la solution inconnue

Pour cette solution inconnue, procéder comme pour les échantillons de vin (dilution, intégration de l'étalon interne).

Passer la solution résultante sans repasser la gamme, à la suite des préparations diluées des vins, par trois fois.

Quelle est la composition de votre solution inconnue ?

Déterminer les concentrations en acides malique, tartrique et lactique de votre inconnue.

Quelles conclusions pouvez-vous faire par rapport aux échantillons de vins que vous avez étudiés précédemment ?

## Bibliographie

- Taverna M., Le Potier I., Morin P., Électrophorèse capillaire – Principe, *Techniques de l'Ingénieur*, 10/12/2003, p. 3365.
- Hagège A., Huynh T.N., Électrophorèse capillaire – Appareillage, *Techniques de l'Ingénieur*, 10/10/2013, p. 3366.
- Dosage des principaux acides organiques des vins et des sulfates par électrophorèse capillaire (Résolution OIV-Oeno 5/2006, révision par Oeno 407-2011), *Recueil des méthodes internationales d'analyses – OIV – Méthode OIV-MA-AS313-19*.
- Estimation de la limite de détection et de quantification d'une méthode d'analyse (Résolution Oeno 7/2000), *Recueil des méthodes internationales d'analyses – OIV – Méthode OIV-MA-AS1-10 : R2000*.
- Fabre H., Validation des méthodes d'électrophorèse capillaire appliquées à l'analyse des composés pharmaceutiques, *Analisis*, 1999, 27(2), p. 155.

# ANNEXES

## Annexe 1 : Méthode des moindres carrés - Détermination de LD et LQ

Utilisation de la droite d'étalonnage :  $Y = b + m X$

La limite de détection est la plus petite concentration que l'on peut distinguer du blanc avec un risque de 0,13 % de garder des échantillons ne contenant rien, c'est-à-dire la valeur à partir de laquelle un test statistique de comparaison de la réponse à la valeur 0 devient significatif avec un risque d'erreur de 0,13 %, d'où :

$$Y_{LD} = b + 3 S_b$$

$$X_{LD} = (b + 3 S_b)/m$$

avec  $S_b$  l'écart-type sur l'ordonnée à l'origine de la droite de régression,  $b$  l'ordonnée à l'origine,  $m$  la pente de la droite.

Le raisonnement est le même pour LQ où le facteur de multiplication est 10 (à la place de 3).

## Calcul de la droite des moindres carrés

Le tracé de la meilleure droite au milieu de points expérimentaux est un problème courant au laboratoire. Une méthode numérique objective appelée analyse de régression permet d'établir cette droite et de calculer les incertitudes associées. On ne considère ici que la méthode de régression la plus simple : la méthode des moindres carrés.

### - Hypothèse

Soit une relation linéaire  $y = mx + b$ .

On considère que  $x$  est affecté d'incertitude négligeable mais que  $y$  est entaché d'erreurs expérimentales aléatoires. Ce cas simple s'applique facilement dans le cas d'une courbe d'étalonnage.

### - Calcul de la droite des moindres carrés

L'écart vertical de chaque point à la droite est appelé un

« résidu ». La droite calculée par la méthode des moindres carrés est celle qui minimise la somme des carrés des résidus de tous les points (voir ouvrage spécialisé).

En pratique, on définit trois grandeurs  $S_{xx}$ ,  $S_{yy}$ ,  $S_{xy}$  :

$$S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}$$

$$S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N}$$

$$S_{xy} = \sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = \sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N}$$

où  $x_i$  et  $y_i$  sont des paires de données,  $N$  le nombre de paires et  $\bar{x}$  et  $\bar{y}$  les valeurs moyennes des variables.

On peut en déduire :

- la pente de la droite :

$$M = S_{xy}/S_{xx}$$

- l'ordonnée à l'origine :

$$b = \bar{y} - m\bar{x}$$

- l'écart type des résidus :

$$s_r = \sqrt{\frac{S_{yy} - m^2 S_{xx}}{(N-2)}}$$

- l'écart type de la pente :

$$s_m = \sqrt{\frac{s_r^2}{S_{xx}}}$$

- l'écart type de l'ordonnée à l'origine :

$$s_b = s_r \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{N \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}}$$

Ces calculs sont facilement accessibles sur calculette. Par ailleurs, il existe de nombreux logiciels sur micro-ordinateur, tableurs ou graphiques, intégrant ces calculs avec le tracé automatique des points et de la droite, ce qui permet un contrôle visuel du résultat.

## Annexe 2 : Exemple d'électrophérogramme sur un échantillon de vin (norme OIV)

