

**FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES & BIOLOGIQUES**

**UNIVERSITE PARIS SACLAY**

**Rue Jean-Baptiste Clément - 92296 CHATENAY-MALABRY**

---

**UE 91 1<sup>ère</sup> partie**

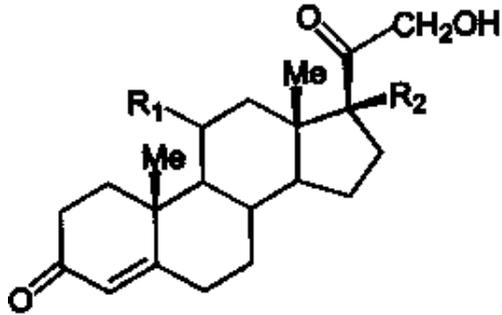
**« Préparation au concours de l'Internat en Pharmacie »**

**Exercices de Chimie Analytique  
Méthodes séparatives**

**27 Mars et 7 avril 2023**

## EXERCICE 1

Un mélange de 3 stéroïdes est analysé par chromatographie sur couche mince :



**Composé A**= Cortésone : R1 = H et R2 = H

**Composé B**= Corticostérone : R1 = OH et R2 = H

**Composé C**= Cortisone : R1 = O et R2 = OH

### Partie A

L'identification des 3 stéroïdes (A, B, C) est réalisée sur une plaque de silice greffée octadécyle avec un solvant de migration constitué d'un mélange acétone / eau [50 :50 v/v]. La ligne de dépôt est située à 10 mm du bas de la plaque. La chromatographie est arrêtée après migration du front de solvant à 90 mm du bas de la plaque.

Les spots observés présentant les caractéristiques suivantes :

Spot	Distance de migration	Diamètre du spot
1	$x_1 = 25,7 \text{ mm}$	$\omega_1 = 2,0 \text{ mm}$
2	$x_2 = 35,5 \text{ mm}$	$\omega_2 = 2,5 \text{ mm}$
3	$x_3 = 45,6 \text{ mm}$	$\omega_3 = 3,1 \text{ mm}$

- 1) Attribuer à chaque spot, le stéroïde correspondant.
- 2) Calculer pour chaque composé, le facteur de rétention  $R_f$  et le nombre de plateaux  $N$ .

- 3) Quel serait l'ordre des pics chromatographiques si la même séparation était effectuée par chromatographie liquide de partage à polarité de phases inversée, sur colonne, avec une phase mobile constituée d'un mélange acétonitrile / méthanol / eau [10 :50 :40 v/v/v] ?

### Partie B

La plaque chromatographique est scannerisée par densitométrie à 254 nm.

La teneur en cortisone dans l'échantillon est calculée par étalonnage externe avec des solutions étalons de cortisone de concentrations croissantes dans le méthanol (1,0 mg.L<sup>-1</sup>, 1,5 mg.L<sup>-1</sup> et 2,0 mg.L<sup>-1</sup>). Chaque solution est déposée 2 fois sur la plaque et les aires obtenues sont les suivantes :

Solution témoin	Aire 1	Aire 2
1,0 mg.L <sup>-1</sup>	A <sup>1</sup> <sub>1</sub> = 2581	A <sup>1</sup> <sub>2</sub> = 2613
1,5 mg.L <sup>-1</sup>	A <sup>2</sup> <sub>1</sub> = 3708	A <sup>2</sup> <sub>2</sub> = 3850
2,0 mg.L <sup>-1</sup>	A <sup>3</sup> <sub>1</sub> = 5170	A <sup>3</sup> <sub>2</sub> = 5089

La solution échantillon à analyser est préalablement diluée au 50<sup>ème</sup>. 3 dépôts sont effectués sur la plaque chromatographique et conduisent aux aires suivantes : E<sub>1</sub> = 3021, E<sub>2</sub> = 2989 et E<sub>3</sub> = 2897.

- 1) Calculer le facteur de réponse moyen (exprimé en unité d'aire / mg.L<sup>-1</sup>) à partir des solutions témoins de cortisone et le coefficient de variation correspondant.
- 2) Calculer la concentration (exprimée en mg.L<sup>-1</sup>) de la cortisone dans la solution échantillon à analyser.
- 3) Quelle est la répétabilité de cette analyse, exprimée par le coefficient de variation relatif?

### **EXERCICE 2**

L'analyse chromatographique en phase gazeuse d'une solution d'esters méthyliques d'acides gras préparée en méthylant 32 mg d'un prélèvement lipidique dans un volume final de 10 ml d'hexane donne les résultats suivants :

Tr (min)	ω <sub>0,5</sub> (mm)	Aire (UI)
3,59	1,5	46 174
6,86	2,4	23 968
7,62	3,1	41 596
9,16	3,1	22 246
11,73	4,2	13 402

Le chromatogramme est réalisé pendant 15 minutes, soit 10 cm.

- 1) Quel est l'intérêt d'estérifier les acides gras avant de les chromatographier ?
- 2) Quelle est la paire critique (c'est-à-dire les 2 composés les moins bien séparés) du chromatogramme. Faire 2 propositions pour améliorer ce résultat sans changer de colonne chromatographique.
- 3) Identifiez les différents constituants de ce mélange, sachant que l'acide oléique est élué à 7,62 min et en vous appuyant sur le tableau suivant :

Acide Gras	TR / TR(C 18 :1)
Acide laurique [C 12 :0]	0,11
Acide myristique [C 14 :0]	0,22
Acide palmitique [C 16 :0]	0,48
Acide stéarique [C 18 :0]	0,90
Acide oléique [C 18 :1]	1
Acide linoléique [C 18 :2]	1,19
Acide linoléique [C 18 :3]	1,54
Acide arachidique [C 20 :0]	1,70
Acide arachidonique [C 20 :4]	2,92

- 4) Pour calculer la masse de chacun des constituants présents dans le mélange, quelle méthode d'analyse quantitative pouvez-vous utiliser à partir des données proposées ? Quelle hypothèse devez-vous émettre pour que ce calcul soit correct ? Quel détecteur semble alors le plus approprié ? Calculez ainsi la masse de chacun des constituants présents dans 100mg de prélèvement lipidique sachant 2 $\mu$ l ont été injectés.

### **EXERCICE 3**

Sur une colonne de 35 cm, ont été séparés par chromatographie en phase liquide 2 composés A et B dont les facteurs de rétention sont respectivement 2,8 et 3,1.

- 1) Quel est le degré de résolution quand :  
 $d_r(A) = 26$  cm et  $\omega_A = 3$  cm  
 $d_r(B) = 30$  cm et  $\omega_B = 5$  cm
- 2) Si on veut faire une séparation avec une résolution égale à 1,5, quelle est la valeur de la HEPT ?
- 3) On change la nature des phases et les facteurs de rétention de A et B deviennent égaux à 2,76 et 3,26 avec le même nombre de plateaux qu'en 2. Quel est le degré de résolution obtenu ?

#### **EXERCICE 4**

On considère la séparation de 3 phénothiazines par chromatographie d'adsorption sur une colonne de silice (diamètre nominal des particules 5  $\mu\text{m}$ ) de 5 cm de longueur et de 4,1 mm de diamètre interne. La vitesse linéaire de la phase mobile est de 0,16  $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Les résultats obtenus sont les suivants :

Composé	tR (min)	$\omega$ (sec)
A	2,5	11,4
B	5,2	24,6
C	10,0	51,6

- 1) Calculer pour chaque phénothiazine le facteur de rétention  $k$  et le nombre de plateaux théoriques.
- 2) Calculer, pour les couples A-B et B-C, la sélectivité et la résolution. Quel est le couple le plus difficile à séparer ?
- 3) De quelles manières pourrait-on optimiser cette séparation ?

#### **EXERCICE 5**

On dose un principe actif acide A ( $\text{pK} = 8,1$ ) et son métabolite oxydé B ( $\text{pK} = 4,3$ ) dans le plasma d'un patient à l'aide de 2 méthodes : une méthode chromatographique et une méthode spectroscopique.

##### 1/ CLHP

On utilise une phase stationnaire de type C18 et une phase mobile constituée d'un mélange méthanol/ tampon acétate ( $\text{pH} = 3$ ). Boucle d'injection de 20  $\mu\text{l}$ .

- Préciser l'ordre d'éluion des composés A et B. Justifier votre réponse.
- Calculer les concentrations plasmatiques en A et B en  $\text{mg/L}$  à partir des données ci-dessous :

##### *Préparation de l'échantillon :*

A 1 ml de plasma, on ajoute 5 ml d'éthanol pour précipiter les protéines. La solution est centrifugée. 500  $\mu\text{l}$  de surnageant sont prélevés puis évaporés à sec. Le résidu est repris par 100  $\mu\text{l}$  de phase mobile et 20  $\mu\text{l}$  sont injectés. La détection UV est réalisée à 2 longueurs d'onde.

##### *Résultats :*

	Composé A	Composé B
Aire du pic à 254 nm	3039	9
Aire du pic à 282 nm	250	105

Gammes d'étalonnage

Cpsé A (254 nm) :  $Y_A = 600 X_A + 35$

Cpsé B (282 nm) :  $Y_B = 1250 X_B + 4,7$

avec Y : aire du pic et X : conc en mg/L

## 2/ Spectroscopie UV

A 2 ml de plasma, on ajoute 1 ml d'éthanol. On centrifuge et on recueille la solution surnageante ; Les absorbances de cette solution déterminées à 254 nm et 282 nm dans une cuve de 1 cm d'épaisseur sont respectivement de 0,48 et de 0,1.

- Calculer les concentrations en mg/L des composés A et B dans la solution de mesure sachant que les coefficients d'extinction spécifiques (en  $L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) sont :  $\epsilon_A(254) = 120$ ,  $\epsilon_A(282) = 21$ ,  $\epsilon_B(254) = 22$  et  $\epsilon_B(282) = 259$ .

- Calculer les concentrations plasmatiques en mg/L des composés A et B.

## **EXERCICE 6**

On dose en chromatographie liquide, le composé A d'une solution inconnue en utilisant comme étalon interne le composé B.

Les temps de rétention de A et de B sont respectivement de 5,5 min et 3,8 min.

On dispose d'une solution mère de A de  $100 \mu g \cdot mL^{-1}$  et d'une solution mère de B à  $100 \mu g \cdot mL^{-1}$  dans l'éthanol.

On prépare la gamme d'étalonnage comme suit :

Tube	1	2	3	4
Solution mère de A ( $\mu L$ )	60	120	240	360
Ethanol ( $\mu L$ )	940	880	760	640
Solution mère de B ( $\mu L$ )	100	100	100	100

Le dosage de la solution inconnue est fait en double :

On mélange 1000  $\mu L$  de la solution à doser et 100  $\mu L$  de B

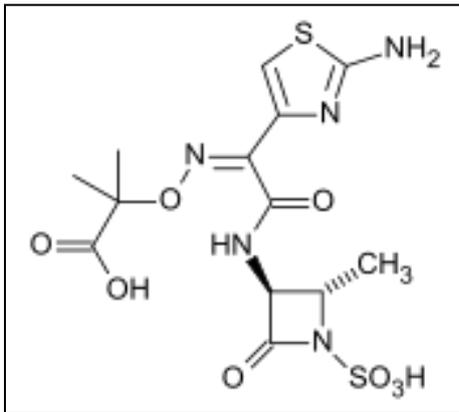
On injecte 20  $\mu L$  de chaque solution dans le chromatographe.

Les chromatogrammes obtenus donnent des hauteurs de pic A et B suivants :

Tube	1	2	3	4	Dosage D1	Dosage D2
Hauteur pic A (cm)	0,85	1,80	3,50	5,60	3,70	3,85
Hauteur pic B (cm)	2,70	2,70	2,60	2,70	2,65	2,75

Quelle est la concentration en A de la solution inconnue ?

## EXERCICE 7



### **Aztréonam**

Antibiotique d'origine synthétique appartenant à la famille des bêta-lactames.

Fonctions :

-SO<sub>3</sub>H : pKa non indiqué

-COOH : pKa = 3,91

-NH<sub>2</sub> : pKa = 2,75

On dispose d'une phase stationnaire de silice octadécylsilylé 150 mm x 4,6 mm, granulométrie 3,5 µm et d'une phase mobile composée de tampon phosphate pH 6,0 + bromure de tétrabutylammonium 0,05 M/méthanol (60:40 V/V).

Dans ces conditions, le temps de rétention de l'aztréonam est de 4,2 min et celui de son isomère E (produit de dégradation) est de 5,8 min. En admettant que les 2 pics présentent une largeur à la base identique de 0,4 min, calculer la valeur de la résolution et celle de la rétention relative de l'isomère E par rapport à l'aztréonam.

## EXERCICE 8

On sépare en chromatographie en phase gazeuse à 200°C, deux constituants d'une préparation à usage thérapeutique : eucalyptol et camphre. On utilise du naphthalène comme étalon interne. Le temps mort est de 0,20 min.

Le temps de rétention réduit  $t_{RN}'$  et la largeur ( $\omega$ ) à la base du pic du naphthalène sont  $t_{RN}' = 4,20$  min et  $\omega = 12$  secondes.

1/ Quelle est l'efficacité de la colonne utilisée ?

2/ Les temps de rétention réduit  $t_R'$  et  $\omega$  de l'eucalyptol et du camphre sont respectivement :

Eucalyptol :  $t_{RE}' = 5,4$  min  $\omega_E = 15$  secondes

Camphre :  $t_{RC}' = 8,2$  min  $\omega_C = 23$  secondes

Calculer les résolutions.

3/ Quelle valeur minimale fixera-t-on à la résolution pour avoir une bonne séparation entre le camphre et l'eucalyptol et un temps d'analyse le plus court possible ?

4/ Peut-on diminuer le temps d'analyse ? Si oui, comment ?

5/ Après changement du paramètre adéquat, l'ordre de sortie des pics est inchangé, le  $t_R$  de l'eucalyptol est de 2,8 min, sa largeur de 10 secondes : la résolution eucalyptol/camphre est de 2,5. Quelle est la durée de l'analyse ?

Pour contrôler une solution buvable de Nifedipine, dosée à 50 mg /10 mL, des analyses par chromatographie liquide haute performance avec étalon interne sont réalisées.

## EXERCICE 9

**Préparation de la solution à examiner :** Introduire 1 mL de solution buvable dans une fiole jaugée de 100 mL et compléter avec de l'eau pour préparation injectable. Diluer de nouveau au 1/50. Prélever 1 mL de cette solution diluée et introduire 2  $\mu$ L d'une solution d'étalon interne à 0,5 mg/mL (le volume de solution ajouté est considéré comme nul).

**Préparation de la solution standard :** A partir d'une solution de référence en nifédipine à 1,2  $\mu$ g/mL, prélever 1 mL de cette solution et introduire 2  $\mu$ L d'une solution d'étalon interne à 0,5 mg/mL (le volume de solution ajouté est considéré comme nul).

**Analyse des solutions standard et à examiner :** Injecter 20  $\mu$ L de solution dans la boucle de 50  $\mu$ L. Après intégration des pics du chromatogramme, on mesure l'aire des pics chromatographiques (AUC), les temps de rétention (Tr) et la largeur à la base ( $\omega$ ) pour les pics de la nifédipine et de l'étalon interne.

		Tr (min)	$\omega$ (sec)	AUC (mAU)
Solution à examiner	Nifédipine	4,4	12	3200
	Etalon interne	5,55	15	3100
Solution standard	Nifédipine	4,4	12	3420
	Etalon interne	5,55	15	3000

- 1) Calculer l'efficacité de la colonne et la résolution entre les deux pics. (10 points)
- 2) Calculer la durée minimale de l'analyse (en minutes) permettant l'élution totale des deux composés. (5 points)
- 3) Calculer la concentration en étalon interne dans la solution à examiner en  $\mu$ g/mL. (5 points)
- 4) En considérant le rapport des signaux nifédipine/étalon interne proportionnel au rapport des concentrations, calculer la concentration de la nifédipine dans la solution à examiner en  $\mu$ g/mL. (5 points)
- 5) En déduire la concentration de la nifédipine de la solution buvable, exprimée en mg/10 mL et en déduire l'erreur relative (%). Les spécifications étant de +/-10,0%, conclure sur la conformité de la préparation. (15 points)

## EXERCICE 10

Le contrôle de la teneur en caféine contenue dans un sirop de citrate de caféine à 2,5%, indiquée pour le traitement de l'apnée du nouveau-né, est réalisé par HPLC selon deux méthodes :

- par étalonnage externe
- par la méthode des ajouts dosés

**Conditions chromatographiques :** L'analyse se fait sur une colonne C18 (250 x 4 mm : 5  $\mu$ m) en mode isocratique avec une phase mobile constituée d'un mélange acétonitrile/eau (70/30 (V/V)). La pression est de 139 bars. La détection se fait en UV à 254 nm.

## Partie I : Etalonnage externe

*Préparation de la solution à examiner :* Introduire 1 mL de solution buvable dans une fiole jaugée de 200 mL et compléter avec de l'eau. Puis prélever 1 mL de cette solution diluée, l'introduire dans une fiole jaugée de 100 mL et compléter avec la phase mobile.

*Préparation des solutions standards :* A partir d'une solution de référence en caféine à 1 g/L, préparer deux solutions diluées en introduisant 20,0  $\mu$ L (Solution standard 1) et 30,0  $\mu$ L (solution standard 2) dans une fiole jaugée de 20,0 mL et compléter avec la phase mobile.

*Analyse des solutions standards et de la solution à examiner :* Injecter 20,0  $\mu$ L de la solution à examiner dans la boucle de 100  $\mu$ L. Après intégration des pics du chromatogramme, on calcule les AUC pour les pics correspondants à la caféine. Les valeurs des AUC pour chacune des solutions sont notées dans le tableau suivant :

Solution	AUC du pic de la caféine
Standard 1	0,200
Standard 2	0,300
Solution à examiner	0,220

- 1) Déterminer les concentrations du standard 1 et du standard 2 exprimés en mg/L
- 2) En considérant le signal proportionnel à la concentration, déterminer la concentration de la caféine dans la solution à examiner en mg /L.
- 3) En déduire la concentration en caféine dans la solution buvable en mg/mL.

## Partie II : Méthode des ajouts dosés

*Préparation de la solution à examiner :* Introduire 1 mL de solution buvable dans une fiole jaugée de 200 mL et compléter avec de l'eau. Puis prélever 1 mL de cette solution diluée, l'introduire dans une fiole jaugée de 100 mL et compléter avec la phase mobile.

*Préparation de la solution standard :* Prélever 1 mL de la solution buvable à analyser, introduire dans une fiole jaugée de 200 mL et compléter avec de l'eau. Puis prélever 1 mL de cette solution et l'introduire dans une fiole jaugée de 100,0 mL. Ajouter 100  $\mu$ L d'une solution de référence en caféine à 1 g/L et compléter avec la phase mobile jusqu'au trait de jauge.

*Analyse des solutions standards et de la solution à examiner :* Injecter 20,0  $\mu$ L de la solution à examiner dans la boucle de 100  $\mu$ L. Après intégration des pics du chromatogramme, on calcule les AUC pour les pics correspondants à la caféine. Les valeurs des AUC pour chacune des solutions sont notées dans le tableau suivant :

Solution	AUC du pic de la caféine
Solution à examiner	0,225
Standard	0,405

- 4) Déterminer la concentration en caféine dans la solution à examiner.
- 5) En déduire la concentration dans la solution buvable.
- 6) Comparer les résultats des 2 méthodes de dosage, conclure sur l'influence des excipients du sirop sur le dosage et la conformité de la solution buvable.

### **EXERCICE 11**

Dans une crème, nous voulons déterminer la présence et la concentration d'un ou plusieurs des éléments suivants écrans solaires qui ont la capacité d'absorber les rayonnements dans la même zone du spectre:

- ester isooclylique de l'acide N,N-diméthylaminobenzoïque (composé B),
- benzophénone-3 ou 2-hydroxy-4-méthoxy-4-méthoxy benzophénone (composé A),
- et 4-t-butyl-4'-méthoxydibenzoyl le méthane (composé C),

Les analyses sont réalisées par chromatographie liquide haute performance avec long une détection dans l'UV. Le temps mort est de 0,23 min. Les temps de rétention des différents composés son respectivement de 4,35 min pour le composé A, 6,51 min pour le composé B et de 8,43 min pour le composé C et des largeurs à la base de 36 s, 40 s et 42 s.

- 1) Calculer, pour les couples A-B et B-C, la sélectivité et la résolution.
- 2) La séparation est elle suffisante pour garantir l'analyse des 3 composés correctement ?

Des courbes d'étalonnage ont été réalisées pour chacun des composés en injectant des solutions standards (mélanges des trois composants) aux concentrations indiquées dans le tableau, les signaux suivants ont été obtenus :

Concentration (m/v)	(% ; Composé A	Composé B	Composé C
0,05	86129	132057	24486
0,10	161382	264114	51072
0,15	243487	396171	74258
0,20	325627	528228	98345

- 3) Exprimer les concentrations des solutions standards en g/L.

L'analyse d'un échantillon est effectuée sur une pesée de 2,3450 g d'échantillon qui est extraite avec 10 mL de méthanol en milieu acide. Ensuite, 0,5 ml du surnageant sont prélevés et introduits dans une fiole jaugée de 25 ml. Le volume est complété à 25 mL. Cette solution est injectée dans le système chromatographique et 4 pics chromatographiques sont mis en évidence.

Tr (min)	Signal
2,37	18590
6,51	367985
7,34	5232

10,83	50232
-------	-------

- 4) Parmi les composés A, B et C, identifier lequel ou lesquels de ces composés est ou sont présents.
- 5) Calculer la concentration de chaque composé dans la solution analysée, en exprimant en g/L.
- 6) Calculer la concentration de chaque composé dans l'échantillon, en exprimant le résultat en % (m/m) (g de composé/100 g d'échantillon).