

On souhaite réaliser le dosage plasmatique d'une substance AH qui présente un caractère acide faible ($pK_a = 5,8$). Le protocole de dosage consiste en une extraction liquide/liquide de AH en milieu acide et d'un dosage par chromatographie liquide haute performance (HPLC) avec une détection UV à 245nm.

Extraction

Placer 1 mL de plasma dans un tube à hémolyse et ajouter 1 mL de tampon formiate 0,1M de $pH = 3,5$. Ajouter 2mL de methyl ter-butyl ether et agiter vigoureusement. Placer le tube à $-20^\circ C$ pendant 2 heures et récupérer la phase organique par retournement. La phase organique est évaporée à sec et conservée avant analyse chromatographique.

Dosage par HPLC

Le résidu sec est repris par 200 μL de phase mobile et 10 μL est injecté dans le système chromatographique. La rétention du composé est assurée par une colonne C18 de 5cm de longueur (d.i : 4,6mm, granulométrie 5 μm) à l'aide d'une phase mobile composée d'acétonitrile et d'une solution tampon $pH=2,2$ (30-70 ;v/v).

Question 1

L'extraction est réalisée avec un tampon de $pH = 3,5$. Est-ce que le pH de la phase aqueuse permet une extraction optimale ?

Question 2

Le rendement d'extraction est de 96,0%. En déduire la valeur du coefficient de partage entre la phase aqueuse et la phase organique.

Question 3

Afin de réaliser l'extraction L/L, on se propose de préparer 1L la solution tampon formiate 0,1M, $pH = 3,5$.

On dispose des réactifs suivants :

- Acide formique 0,2 M
- Hydroxyde de sodium 0,5M

Quels sont les volumes des solutions d'acide formique, d'hydroxyde de sodium et d'eau nécessaires à la réalisation de cette solution tampon.

$pK_a (HCOOH/HCOO^-) = 3,7$

Question 4

Quel est le mécanisme de rétention ?

Question 5

Afin de déterminer la concentration de AH dans le plasma d'un patient (plasma patient), un plasma vierge est surchargé à des concentrations connues de AH et est analysé dans mêmes conditions opératoires. Les résultats sont les suivants :

	Plasma vierge	Plasma vierge	Plasma vierge	Plasma patient
Concentration de AH ($\mu\text{g/L}$)	20	40	70	Inconnu
Aire du pic chromatographique à 245nm (u.a)	480	960	1680	1320

Question 1 : Oui, $\text{pH} < \text{pK}_a - 2$

Question 2

$$\rho = 1 - \frac{1}{\left(1 + \lambda \frac{V_B}{V_A}\right)^n} \text{ avec } V_B = 2\text{mL}, V_A = 2\text{mL (1 ml de plasma et 1mL de tampon)} \text{ et } n = 1$$

Donc $\lambda = 24$

Question 3 : Pour 1 L de solution tampon 0.1M, il faut 500mL d'acide formique 0.2M (la molarité du tampon = $[\text{HCOOH}] + [\text{HCOO}^-]$).

Soit x, le nombre de moles de NaOH à ajouter,

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log\left(\frac{[\text{HCOOH}]}{[\text{HCOO}^-]}\right)$$

$$3,5 = 3,7 + \log(x/(0.1-x))$$

$$x = 38,6 \text{ mmol soit } 77,4\text{mL de NaOH } 0,5\text{M}$$

500mL d'acide formique 0.2M

77,4mL de NaOH 0,5M

422,6mL d'eau

Question 4

AH est sous sa forme protonée, il est non chargé : chromatographie à polarité de phases inversée = partage

Question 5

Mêmes conditions opératoires gamme et patient, signal proportionnel à la concentration = plasma patient = 55 $\mu\text{g/L}$