

**FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES & BIOLOGIQUES**

**UNIVERSITE PARIS SACLAY**

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

---

**UE 93**

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

**Exercices de Chimie Analytique**

**Méthodes séparatives – Exercices**

Spectrophotométrie

Laetitia LE

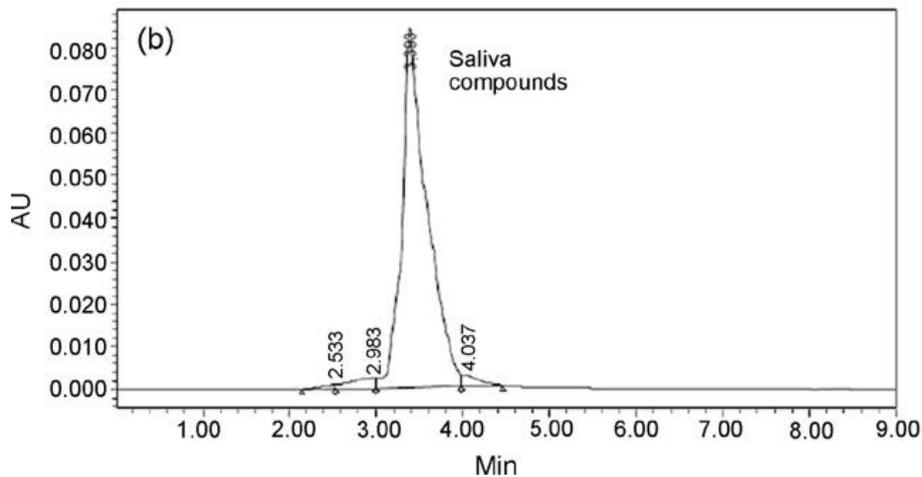
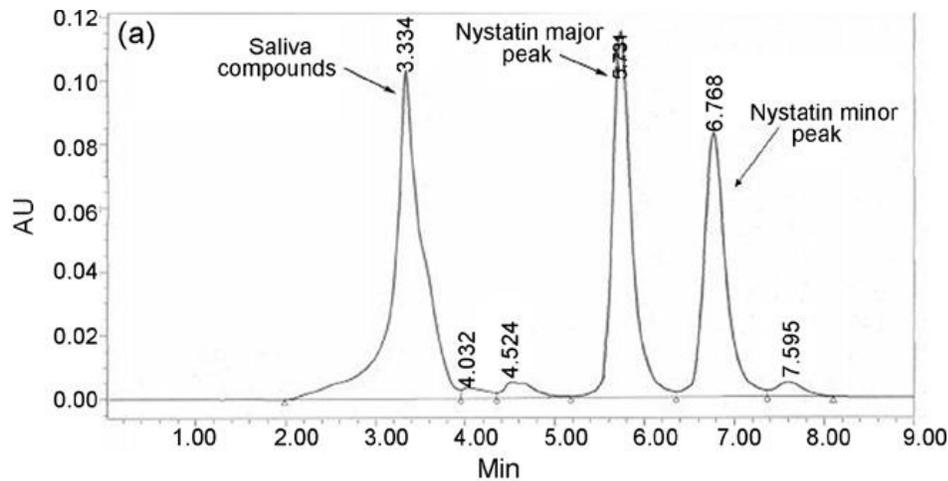
Lundi 11 septembre

Méthodes séparatives

Laetitia LE

Mercredi 27 Septembre





3/ La linéarité de la réponse fluorimétrique a été vérifiée entre  $4,2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  et  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . L'équation de la fonction réponse est :  $S_{(\text{pic majoritaire} + \text{pic minoritaire})} = 620 C_{(\mu\text{g}/\text{mL})} + 1,1$  avec  $r^2 = 0,992$ . Quel est le facteur de réponse moyen de la nistatine dans les conditions chromatographiques choisies ?

4/ La surface observée de la somme des deux pics de nistatine est de 39 268 pour un échantillon salivaire. Calculer à quelle concentration salivaire correspond cette surface sachant que le protocole de préparation de l'échantillon est le suivant :  $500 \mu\text{L}$  de salive sont déprotéinisés par ajout d'1 mL du mélange [méthanol:acétonitrile 1 :1; v/v]. Le mélange est vortexé durant 15 sec toutes les 10 min pendant 30 minutes puis centrifugé pendant 10 minutes à  $5000 \text{ tours}\cdot\text{min}^{-1}$ .  $50 \mu\text{L}$  du surnageant sont injectés.

5/ Le même échantillon salivaire préalablement dilué au 1/2 avec de l'eau ultrapure est analysé dans les mêmes conditions que la question précédente. La surface observée de la somme des deux pics de nistatine est de 28 934 pour l'échantillon salivaire dilué. Calculer à quelle concentration salivaire correspond cette surface et concluez.

## **EXERCICE N°2**

Un mélange de composés est analysé par chromatographie liquide à polarité de phases inversée sur une colonne de 10 cm de long avec une phase mobile méthanol : eau [35 :65 ; v/v] à un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup>. La température est de 20°C. Le temps mort a été mesuré à 41s.

Le chromatogramme est décrit dans le tableau suivant :

Nom du soluté	Temps de rétention réduit t'r (s)	Largeur à mi-hauteur $\omega_{0,5}(s)$
Uracile	28	10,9
Phénol	141	13,1
Alcool benzylique	158	13,4
2-phényl-éthanol	282	15,8
Benzoate de benzyle	341	16,9
Diméthylphtalate	519	20,4

1/ Indiquer les composés qui ne sont pas correctement séparés

2/ Toutes choses égales par ailleurs, quelle serait la résolution entre le phénol et l'alcool benzylique si la colonne avait une longueur de 25 cm ?

3/ Toutes choses égales par ailleurs, quelle taille de colonne permettrait d'atteindre une résolution satisfaisante entre le phénol et l'alcool benzylique ?

4/ La pression en tête de colonne est de  $69 \cdot 10^5$  Pa. Quelle serait la pression en tête de colonne avec une colonne de 25 cm ?

### **EXERCICE N°3**

On veut déterminer les taux sériques de diazépam, 15 minutes et 45 minutes après injection intraveineuse de 10 mg de ce produit. Pour ce faire, on procède à une extraction suivie d'une chromatographie en phase gazeuse utilisant la méthode de l'étalon interne (concentration de la solution étalon = 1  $\mu\text{g/mL}$ ).

Le protocole est le suivant : à 0,4 mL de sang total, on ajoute 1 mL de tampon à pH 7,0 et 0,4 mL de la solution de l'étalon interne. On extrait par le n-heptane, en répétant l'extraction deux fois avec chaque fois 5 mL de phase organique. Les phases organiques sont réunies et on ajoute 3 mL d'acide chlorhydrique molaire. Après agitation et décantation on récupère la phase aqueuse que l'on alcalinise à l'aide d'hydroxyde de sodium 6 M. A partir de la phase aqueuse ainsi obtenue, on procède à une nouvelle extraction répétée deux fois avec chaque fois 5 mL de n-heptane. La totalité de l'extrait est évaporée sous vide et le résidu est repris par 1 mL de n-heptane.

On injecte 2  $\mu\text{L}$  de cette solution dans le chromatographe. L'injection de 2  $\mu\text{L}$  de solutions contenant successivement : 0,1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 0,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  et 0,4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de diazépam auxquelles sont ajoutés 0,4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  d'étalon interne, donne les rapports de surface suivants : 0,208 ; 0,416 et 0,832.

1/ Sachant que les rapports de surface obtenus pour les prélèvements 1 (15 min) et 2 (45 min) sont respectivement de 0,25 et 0,32, calculer la concentration en  $\mu\text{g/L}$  du diazépam dans 1 et 2 en considérant un rendement de 100%.

2/ Si l'on sait qu'une surcharge de 1  $\mu\text{g}$  de diazépam dans un prélèvement témoin permet, par cette méthode, de trouver une valeur égale à 0,902  $\mu\text{g}$ . Quel est le rendement de ce dosage ?

3/ En considérant le résultat du rendement d'extraction, calculer la concentration sanguine pour les prélèvements 1 (15 min) et 2 (45 min).

4/ Le diazépam est une molécule qui présente un  $\text{pK}_a = 3,1$ . D'après le protocole d'extraction, conclure au caractère acide ou basique du diazépam.

## **EXERCICE N°4 : Concours Internat 2020**

### **PARTIE A**

Deux acides ( $HA_1$ ) et ( $HA_2$ ) ont été séparés par chromatographie d'échange d'ions sur une colonne dont la longueur est égale à 15 cm. Pour chacun des composés, les temps de rétention ( $t_r$ ) et les largeurs des pics ( $w$ ) extrapolés par les tangentes aux points d'inflexion sont les suivants :

$HA_1$  :  $t_r = 5$  min et  $\omega = 0,3$  min

$HA_2$  :  $t_r = 6$  min et  $\omega = 0,4$  min

Question 1 : calculer pour le composé le plus retenu :

- Le nombre de plateaux théoriques de la colonne
- La HEPT

Préciser dans quelle(s) condition(s) ces calculs peuvent être réalisés.

Question 2 : Quel paramètre permet d'évaluer la séparation entre les 2 composés  $HA_1$  et  $HA_2$  ? Calculer et interpréter la valeur de ce paramètre.

### **Partie B**

#### **Enoncé**

On dose l'acide salicylique (métabolite de l'acide acétylsalicylique) par HPLC dans un plasma de patient ayant ingéré de l'aspirine.

A 1 mL de plasma, on ajoute 1 mL d'une solution d'acide para-hydroxybenzoïque (étalon interne) à  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ .

On extrait deux fois avec 10 mL de dichlorométhane en milieu acide.

On concentre les deux extraits réunis à 1 mL et on injecte  $100 \mu\text{L}$  dans le chromatographe.

On obtient sur l'enregistrement :

- surface du pic de l'acide salicylique : 32 300 unités arbitraires (UA)
- surface du pic de l'étalon interne : 7 000 UA

L'injection sans extraction de  $100 \mu\text{L}$  des solutions d'acide salicylique à  $1000 \text{ mg.L}^{-1}$  et d'acide para-hydroxybenzoïque à  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  donne respectivement des surfaces de pics de 80 500 UA et 7400 UA.

#### **Questions**

##### **QUESTION N° 1 :**

Quel est le rendement d'extraction de l'acide para-hydroxybenzoïque ?

##### **QUESTION N° 2 :**

En supposant que l'acide para-hydroxybenzoïque et l'acide salicylique présentent le même rendement d'extraction, quelle est la concentration plasmatique en acide salicylique, en  $\text{mg.L}^{-1}$  ?

##### **QUESTION N° 3 :**

Calculer le coefficient de partage  $\lambda$  de l'acide parahydroxybenzoïque entre le plasma et le dichlorométhane.

## **EXERCICE N°5 : Concours Internat 2019**

### **Enoncé**

Les deux questions sont indépendantes.

On veut doser la vitamine E dans les hématies de patients, récupérées après centrifugation d'un sang total.

### **Questions**

#### **QUESTION N° 1 :**

Pour un patient A, on procède de la façon suivante :

A 0,5 mL de culot de globules rouges ( $GR_1$ ), on ajoute 200  $\mu$ L de solution d'hydroxyde de potassium ; on chauffe à 70°C.

On ajoute 2,5 mL d'eau distillée et 5 mL d'heptane. On agite jusqu'à obtention de l'équilibre. La phase heptanique est récupérée puis évaporée à sec. Le résidu est dissous dans 50  $\mu$ L de méthanol.

On injecte 10  $\mu$ L de cette solution méthanolique dans une colonne de chromatographie.

La surface du pic de vitamine E obtenu est de 1500 unités.

Le rendement d'extraction est de 91,5 %.

Les surfaces des pics obtenues après injection directe de 10  $\mu$ L de deux solutions étalons de vitamine E de concentrations respectives 0,05 et 0,10  $mg \cdot mL^{-1}$  sont 1000 et 2000 unités.

Quelle est la concentration (en  $mg \cdot L^{-1}$ ) en vitamine E dans les hématies de ce patient ?

#### **QUESTION N° 2 :**

Pour un patient B, un autre protocole de dosage de la vitamine E érythrocytaire en deux temps est proposé sur un nouveau culot de globules rouges ( $GR_2$ ) :

a) Dans un premier temps, à 5 mL d'un culot de  $GR_2$  on ajoute 200  $\mu$ L d'hydroxyde de potassium ; on chauffe à 70°C.

On ajoute 2,5 mL d'eau distillée. On extrait à l'aide de 5 mL d'heptane contenant un étalon interne. La phase heptanique récupérée est évaporée à sec. Le résidu est dissous dans 50  $\mu$ L de méthanol.

On injecte 20  $\mu$ L de cette solution méthanolique. On obtient la valeur de 0,36 pour le rapport de la surface du pic de vitamine E sur la surface du pic de l'étalon interne.

b) Dans un deuxième temps, deux autres échantillons de culot de  $GR_2$  sont préparés de la manière suivante :

- Dans un premier tube, on ajoute à 5 mL de culot de  $GR_2$ , 200  $\mu$ L d'hydroxyde de potassium ; on chauffe à 70°C. On ajoute 2,5 mL d'eau distillée et 100  $\mu$ L de solution de Vitamine E à 0,25  $g \cdot L^{-1}$ .

- Dans un second tube, on ajoute à 5 mL de culot de GR<sub>2</sub>, 200 µL d'hydroxyde de potassium ; on chauffe à 70°C. On ajoute 2,5 mL d'eau distillée et 200 µL de solution de Vitamine E à 0,25 g.L<sup>-1</sup>.

Ces deux échantillons sont extraits à l'aide de 5 mL d'heptane contenant le même étalon interne. La phase heptanique récupérée est évaporée à sec. Le résidu est dissous dans 50 µL de méthanol.

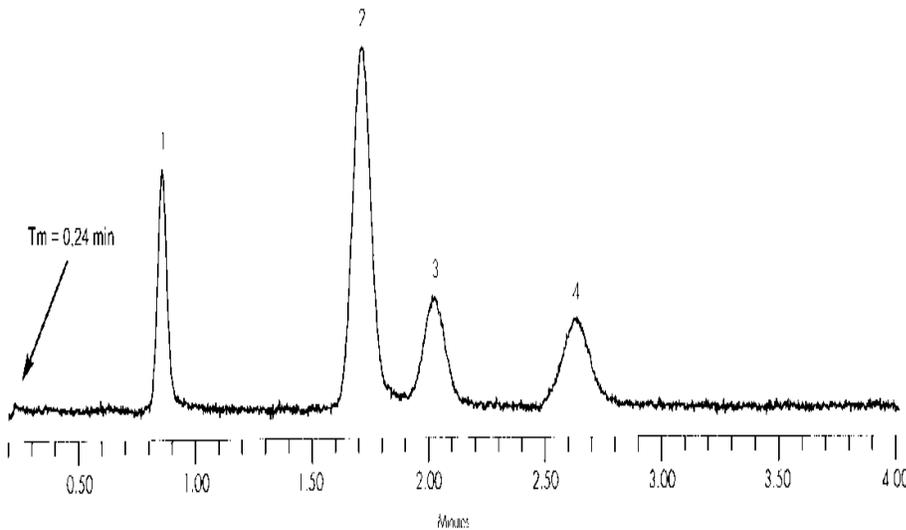
On injecte 20 µL de chacune des solutions méthanoliques obtenues. Les rapports de la surface du pic de vitamine E sur la surface du pic de l'étalon interne sont respectivement 0,56 et 0,76.

Quelle est la concentration (mg.L<sup>-1</sup>) en vitamine E dans les hématies de ce patient ?

## EXERCICE N°6 : Sujet d'examen blanc internat UE 91 Mai 2018

Les conditions de la séparation chromatographique de 4 anti-inflammatoires (1 = Kétoprofène; 2 = Fénoprofène; 3 = Flurbiprofène; 4 = Ibuprofène ) sont les suivantes :

- Colonne : Atlantis dC<sub>18</sub> (2 cm × 0.46 cm i.d., d<sub>p</sub> = 3 μm),
- Phase mobile : A / B = 65 / 35 (v/v)
  - A = 0,1% HCOOH dans H<sub>2</sub>O
  - B = 0,1% HCOOH dans ACN
- Détection : 220 nm ; Injection : 10 μl ; Débit : 1 ml/min;



 1 = Kétoprofène pKa=4,45 LogP = 3,12 Mw = 254,28	 2 = Fénoprofène pKa=3,96 LogP = 3,65 Mw = 242,27	 3 = Flurbiprofène pKa=4,42 LogP = 3,94 Mw = 244,26	 4 = Ibuprofène pKa=4,54 LogP = 3,97 Mw = 206,29
--	--	--	---

- Indiquez le type de chromatographie mis en œuvre et le mécanisme principal de séparation impliqué ?
- Expliquer l'ordre d'élution
- Si l'on désirait modifier la sélectivité de la phase mobile A / B = 65/35 (v/v), sans modifier sa force éluante, quel autre solvant modificateur utiliseriez-vous ?
- Calculez la sélectivité ( $\alpha$ ) et la résolution ( $R_s$ ) entre les pics 2 (Fénoprofène) et 3 (Flurbiprofène).
- Un dosage de l'ibuprofène plasmatique 1H après administration orale de 2 comprimés dosés à 200 mg d'ibuprofène est réalisé par étalonnage interne en utilisant le flurbiprofène comme étalon interne.

Pour préparer la solution analytique échantillon, 200  $\mu\text{L}$  de plasma sont ajoutés à 1 mL d'une solution de flurbiprofène contenant 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dans l'acétonitrile pour faciliter la précipitation des protéines. La suspension est centrifugée, le surnageant prélevé en totalité et évaporé à sec. Le résidu est repris par 500  $\mu\text{L}$  de phase mobile. Le chromatogramme obtenu présente 2 pics, l'un à 2,08 min (aire = 96 230 UI) et l'autre à 2,65 min (aire = 47 380 UI).

La solution analytique témoin est préparée de façon identique à la solution analytique échantillon en remplaçant le volume de plasma par 200  $\mu\text{L}$  d'une solution aqueuse contenant 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'ibuprofène. Le chromatogramme témoin obtenu présente 2 pics, l'un à 2,08 min (aire = 96 165 UI) et l'autre à 2,65 min (aire = 52 890 UI).

Calculer la concentration plasmatique en ibuprofène en  $\text{mg}/\text{L}$ .

## **EXERCICE 7**

La séparation chromatographique des composés A, B, C et D a été obtenue sur une colonne de silice greffée NH<sub>2</sub> à une température de 23°C. La phase mobile (débit de 1 mL/min) est composée d'heptane additionné d'éthanol.

Les résultats chromatographiques sont résumés dans le tableau suivant :

Longueur de colonne : <b>15 cm</b> Temps mort : <b>41 sec</b>	Teneur en éthanol : <b>18%</b>	Pression en tête de colonne : <b>33.10<sup>5</sup>Pa</b>
Nom du composé	Temps de rétention $t_r$ (min)	Largeur à mi-hauteur $\omega_{0,5}$ (min)
A	1,90	0,082
B	5,0	0,265
C	5,50	0,281
D	6,42	0,321

1/ Quel est le mécanisme utilisé pour cette séparation ?

2/ Quelle est la paire de composés la moins bien séparée ?

3/ Comment améliorer les performances de l'analyse ?

4/ Sachant que le facteur de rétention est fonction du pourcentage en éthanol selon une relation de type  $\text{Log } k' = a \cdot \log(\text{fraction volumique en éthanol}) + b$  et que le composé C présente un temps de rétention de 6,3 min. pour une phase mobile contenant 12% d'éthanol.

Calculer le temps de rétention de C pour une phase mobile contenant 15% d'éthanol.

Calculer également le nombre de plateaux théoriques sur le composé C en supposant que l'efficacité est une fonction linéaire du temps de rétention réduit.

## **EXERCICE 8**

A la suite d'une intoxication aiguë par le méprobamate, le laboratoire procède au dosage de ce tranquillisant dans le sang par CPG.

Dans ce but 5 mL de sang total sont extraits par 50 mL de chloroforme. 45 mL de la phase organique obtenue sont évaporés à sec et le résidu est repris par 100  $\mu$ l d'une solution de paradiméthylaminobenzaldéhyde (PDAB) de concentration C1, le PDAB jouant le rôle d'étalon interne.

1  $\mu$ L de solution de reprise est injecté dans le chromatographe et les hauteurs des deux pics obtenus de méprobamate et de PDAB sont mesurées.

Par ailleurs, on a procédé à l'étalonnage en injectant d'une part 1  $\mu$ L de solution étalon E1 de méprobamate à 5g/L et de PDAB à concentration C1, d'autre part 1  $\mu$ l d'une solution étalon E2 de méprobamate à 10g/L et de PDAB à concentration C1. En mesurant les hauteurs des pics obtenus, les valeurs suivantes ont été obtenues :

	Hauteur en mm du pic de méprobamate ( $H_M$ )	Hauteur en mm du pic de PDAB ( $H_P$ )
Extrait à doser	65	100
Solution étalon E1	40.8	102
Solution étalon E2	88	110

L'étalonnage a permis d'obtenir une droite d'étalonnage de la forme  $y = ax + b$  passant par l'origine.

- 1- Quel est le rôle de l'étalon interne dans ce dosage ?
- 2- Calculer la concentration en méprobamate dans l'extrait à doser.
- 3- En considérant que le coefficient de partage du méprobamate entre le chloroforme et le sang est de 10, calculer le rendement d'extraction.
- 4- Calculer la concentration sanguine en méprobamate en mg/L et en mmol/L (Masse Molaire du méprobamate : 218,3  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

## **EXERCICE 9**

Le flunitrazepam et son métabolite, le 7-aminoflunitrazepam, sont dosés dans la salive par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (ionisation chimique en mode négatif). A 1 mL de salive sont ajoutés 1 mL de solution d'étalon interne de concentration 1 µg/L et 4 mL de tampon phosphate à pH=6. Après extraction en phase solide, évaporation de l'éluat et dérivatisation, le résidu est repris par 40 µL d'acétate d'éthyle. La phase stationnaire utilisée est le polydiméthyl siloxane.

1/ Expliquer pourquoi le 7-aminoflunitrazepam est élué avant le flunitrazepam.

La séparation est réalisée par gradient de température selon le schéma suivant :

- Température initiale : 70°C pendant 2 min
- A 2 min, passage de 70°C à 310°C avec une augmentation de 30°/min
- Maintien de la température à 310°C pendant 5 minutes

Les données chromatographiques suivantes ont été obtenues :

Pic N°1 : Tr = 9,22 min  $\omega=4,2$  sec

Pic N°2 : Tr = 9,31 min  $\omega=4,8$  sec

2/ Calculer la résolution entre le flunitrazepam et son métabolite.

3/ Calculer le nombre de plateaux théoriques de la colonne chromatographique nécessaire pour améliorer cette résolution d'un facteur 1,5.

Les concentrations salivaires minimales détectables sont respectivement de 0,010 µg/L et 0,015 µg/L pour le flunitrazepam et le 7-aminoflunitrazepam.

4/ Calculer les concentrations injectées minimales pour les deux composés, sachant que le rendement d'extraction est de 90% pour chacun des composés.

Les droites d'étalonnage  $y = ax+b$ , avec Y = rapport de l'aire du composé sur l'aire de l'étalon interne, et x = concentration injectée du composé en µg/L sont :

- pour le flunitrazepam :  $y = 1,1431 x + 0,0024$

- pour le 7-aminoflunitrazepam :  $y = 0,9918 x + 0,0043$

5/ Calculer les concentrations salivaires des deux molécules dans l'échantillon analysé sachant que l'aire du flunitrazepam est de 213 420 UI, l'aire du 7-aminoflunitrazepam est de 326 366 UI et l'aire de l'étalon interne est de 177 457 UI.

## **EXERCICE 10**

On se propose de doser le métabolite urinaire M d'un médicament à partir d'un échantillon d'urine de patient. Le dosage est effectué par CPG selon le protocole suivant :

	D1	D2	D3
Échantillon d'urine (mL)	0,7	0,7	0,7
Solution d'étalon M à 50 mg/mL (mL)	0	1	2
Solution de X (mL)	1,3	1,3	1,3
Solution de méthanol / eau (mL)	12	11	10

Après injection de 10  $\mu$ L de chaque solution, on obtient une hauteur de pics de M de 290 ; 479,4 et 629,92 et une hauteur de pics de X de 500 ; 510 et 508 respectivement pour les solutions D1, D2 et D3.

Déterminer la concentration en M de l'échantillon d'urine en mg/L.