

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 $\mu L$  de phase mobile et 10 $\mu L$  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 $\mu m$ ) 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  $\mu\text{g/L}$