

ESPCI – 2^{ème} Année - Promotion 134 - 2016-17

J. VIAL , J. DUGAY

SCIENCES ANALYTIQUES

Contrôle des connaissances du mardi 27 Juin 2017

NB : il sera tenu compte dans la notation de la rigueur et de la qualité de la rédaction.

Durée de l'épreuve : 30 min

Aucun document autorisé - Avec calculatrice

Partie A :

Deux exercices proposés, un seul à traiter au choix - (6 points)

Exercice n°1 : Analyse quantitative

On se propose d'étudier de manière quantitative la composition d'un médicament générique constitué d'un principe actif et de ses impuretés. A cet effet une méthode par chromatographie en phase gazeuse et détection à ionisation de flamme a été mise en œuvre. L'injection a été réalisée en mode split (ratio 1:40) en utilisant un volume injecté de 1 μ L. Le chromatogramme type d'un échantillon est fourni figure 1.

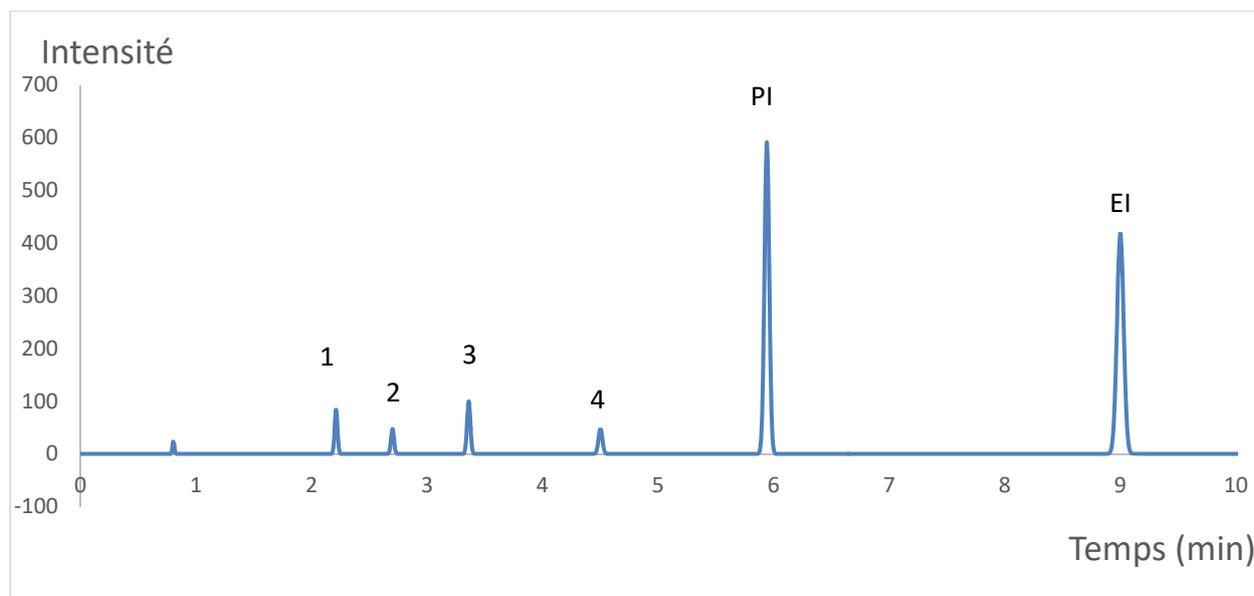


Figure 1 : Séparation type d'un échantillon : 1 : impureté 1, 2 : impureté 2, 3 : impureté 3, 4 : impureté 4, PI : principe actif, EI : étalon interne.

On se propose d'utiliser différentes approches d'analyse quantitative afin de déterminer laquelle est la plus pertinente.

1. Dans un premier temps nous avons injecté un échantillon A du médicament générique et les aires des pics sont fournies dans le tableau 1.

Composé	Echantillon A
Impureté 1	295
Impureté 2	190
Impureté 3	490
Impureté 4	332
PI	6 072
EI	8 570

Tableau 1 : Aires des pics pour l'échantillon A

En ne tenant pas compte de l'étalon interne, donner les pourcentages relatifs des différents composés en utilisant la méthode de la normalisation interne (on donnera les résultats avec 2 chiffres après la virgule). Quelles sont les hypothèses supposées pour cette méthode ? Vous paraissent-elles vraisemblables dans le cas présent ?

2. On cherche ensuite à effectuer une quantification par étalonnage externe. A cet effet on injecte un étalon pour lequel les concentrations sont de 1g/L pour le principe actif et 0.1 g/L pour chacune des impuretés. Les aires des pics mesurées pour cet étalon sont données dans le tableau 2.

Composé	Etalon
Impureté 1	241
Impureté 2	183
Impureté 3	259
Impureté 4	136
PI	7 729
EI	10 183

Tableau 2 : Aires des pics pour l'étalon

Déterminer les concentrations en g/L pour le principe actif et les impuretés (on donnera les résultats avec 2 chiffres après la virgule). Quelle(s) limitation(s) voyez-vous ici à l'étalonnage externe ?

3. Pour pallier cette limitation on utilise un étalon interne, qui a été ajouté à la même concentration dans l'étalon et l'échantillon A. Après avoir expliqué ce que l'on attendait d'un étalon interne, déterminer les concentrations en g/L pour le principe actif et les impuretés (on donnera les résultats avec 2 chiffres après la virgule).
4. Aurait-on pu utiliser un composé deutéré comme étalon interne ici ?
5. A partir des valeurs de concentration obtenues par étalonnage interne, calculer les pourcentages relatifs des différents constituants du médicament. Comparer aux valeurs obtenues en 1). Commenter.
6. Pour l'analyse de ce médicament dans le sang on suspecte la présence d'effets de matrice. Après avoir défini brièvement ce qu'est un effet de matrice, proposer une approche quantitative permettant de le prendre en compte. Cette approche a été appliquée au dosage du principe actif dans un échantillon de sang et les résultats sont fournis dans le tableau 3 :

Concentration PI ajoutée (g/L)	Aire PI	Aire EI
0	5862	8312
0.2	8418	9249
0.4	11328	8914
0.6	14361	9584
0.8	17323	8643

Tableau 3 : Aires des pics de PI et EI pour différentes concentrations PI ajoutées

7. Quel résultat aurait-on obtenu si on avait quantifié cet échantillon de sang par étalonnage interne en utilisant l'étalon dont les valeurs sont indiquées dans le tableau 2 ? Conclure

Exercice n°2 : Séparation d'un mélange organique pour synthèse

L'objectif est ici d'analyser par la chromatographie en phase gazeuse un échantillon liquide, solvant le pentane, contenant 6 composés listés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques principales des solutés à analyser ainsi que du pentane

Nom	Formule	MW (g/mol)	Teb (°C)	log P
<i>Pentane</i>	<i>C₅H₁₂</i>	72,1	36	3,39
Aniline	C ₆ H ₅ -NH ₂	93,1	184	0,94
Diéthyl-carbinol	(C ₂ H ₅) ₂ -CHOH	88,1	116	1,32
3-éthylhexane	(C ₂ H ₅) ₂ -CH-C ₃ H ₇	114,2	119	4,23
Phénol	C ₆ H ₅ -OH	94,1	182	1,46
Toluène	C ₆ H ₅ -CH ₃	92,1	111	2,69
Décane	C ₁₀ H ₂₂	142,3	176	5,98

Vous avez à votre disposition un chromatographe en phase gazeuse (CPG) que vous pouvez équiper avec :

- l'injecteur de votre choix
- une colonne capillaire avec un film de phase stationnaire apolaire (polydiméthylsiloxane) ou une colonne capillaire avec un film de phase stationnaire polaire polyéthylèneglycol)
- le détecteur de votre choix.

En préambule :

- 1). Décrire ce qu'est une colonne capillaire à film de phase stationnaire et donner ses dimensions géométriques classiques. La phase stationnaire est-elle liquide ou solide ? Commenter.
- 2). Rappeler les mécanismes de rétention mis en jeu en CPG avec colonne capillaire à film de phase stationnaire.

L'analyse :

3). A partir des données ci-dessus décrivez le plus précisément possible la méthode globale que vous proposeriez pour répondre à l'objectif fixé. La faisabilité pratique et le coût de réalisation feront partie des critères d'évaluation de la solution proposée.

Pour ce faire :

- **justifiez tous vos choix et conditions opératoires**, notamment : l'injection – nature de la phase stationnaire – nature de la phase mobile – la détection ;

- comment détermineriez-vous expérimentalement le temps de rétention nulle de votre système analytique (expliquer votre choix) ;

- prévoir l'ordre d'élution des solutés du tableau 1 dans vos conditions opératoires en le justifiant ;

- comment détermineriez-vous expérimentalement le facteur de rétention ainsi que l'efficacité du système pour chacun des solutés (donner des expressions littérales).

Perspective :

4). Si on cherche à miniaturiser le système CPG en vue d'un dispositif portable, quelles adaptations proposeriez-vous ? Quelles limitations cela entraînerait-il ?

ESPCI – 2^{ème} Année - Promotion 134 - 2016-17

J. VIAL, J. DUGAY

SCIENCES ANALYTIQUES

Contrôle des connaissances du mardi 27 Juin 2017

NB : il sera tenu compte dans la notation de la rigueur et de la qualité de la rédaction.

Durée de l'épreuve : 1h30. Calculatrices et documents autorisés.

Partie B : Etude du comportement électrophorétique de principes actifs antimalaria

D'après "Analysis of basic antimalarial drugs by CZE and MEKC. Part 1 critical factors affecting separation", R.B. Taylor and R.G. Graig, *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 11 (1993) 1289-1294.

Nous nous proposons d'étudier le comportement de composés pharmaceutiques de type antimalaria selon les différents modes d'électrophorèse capillaire considérés. Nous nous intéresserons aux différents paramètres influents.

Le mode électrocinétique A correspond aux conditions ci-suivant.

Séparation:

- Capillaire: silice fondue non traitée, 65 cm x 50 µm, longueur jusqu'au détecteur 50 cm.
- Electrolyte: solution aqueuse 25 mM tampon phosphate à pH = 2,0.
- Tension : 20 kV.
- Température : 25°C.
- Injection : 10s sous 5 kV.

Détection :

UV à 254 nm.

Echantillon injecté :

-11 principes actifs en solution aqueuse chacun à 15 mg/L + traces d'éthanol.

Le mode électrocinétique B correspond aux conditions ci-suivant.

Séparation:

- Capillaire: silice fondue non traitée, 65 cm x 50 µm, longueur jusqu'au détecteur 50 cm.
- Electrolyte: solution aqueuse 25 mM tampon phosphate à pH = 11,00 + SDS (sodium dodécyl sulfate) à 50 mM.
- Tension : 20 kV.
- Température : 25°C.
- Injection : 10 s sous 5 kV.

Détection :

UV à 254 nm.

Echantillon injecté :

-6 principes actifs en solution aqueuse chacun à 15 mg/L + traces d'éthanol + pentacène (Mw = 278 g/mol et log P = 7,11).

On va s'intéresser en particulier aux 5 principes actifs dont les caractéristiques sont fournies dans le tableau 1 suivant :

Composé	Mw (g/mol)	Teb (°C)	pKa ⁽¹⁾	logP
Primaquine (1)	259	451	2,9 / 4,2 / 9,9	3,15
Pyriméthamine (10)	248	491	7,3	2,69
Chloroquine (3)	320	460	4,0 / 8,4	4,63
Mefloquine (11)	378	416	9,5	3,90
Quinine (5)	324	496	5,1 / 9,1	3,44

⁽¹⁾ Tous les pKa correspondent à des fonctions amines.

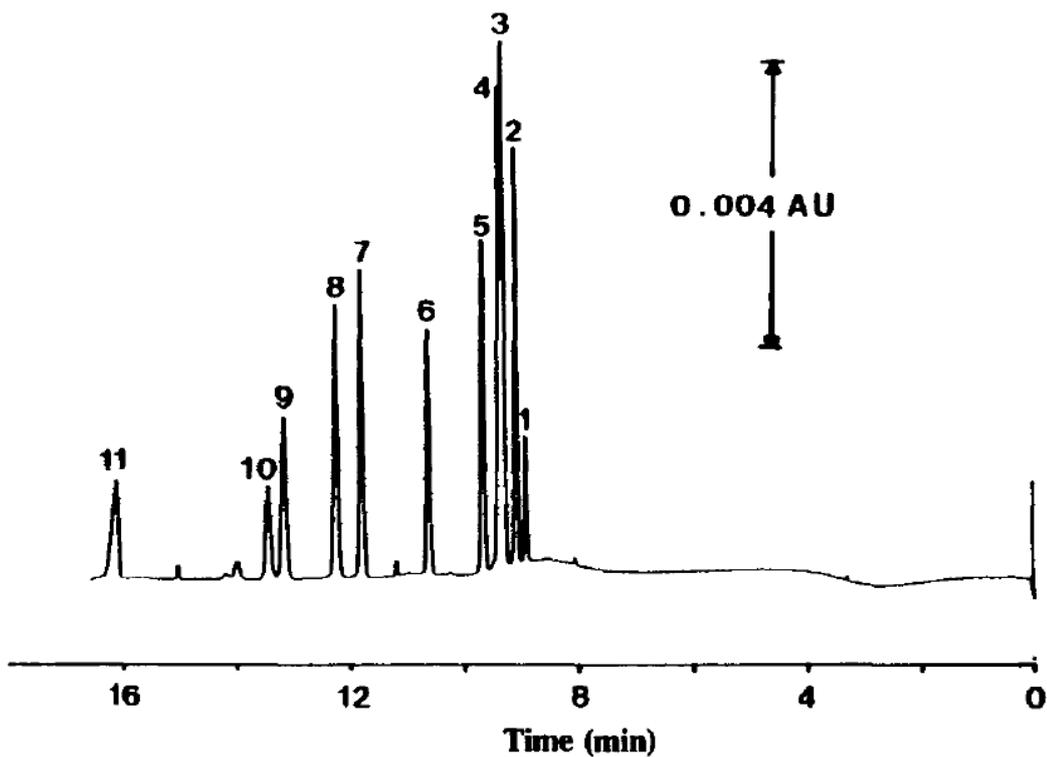


Figure 1 : Electrophorogramme obtenu en mode A.

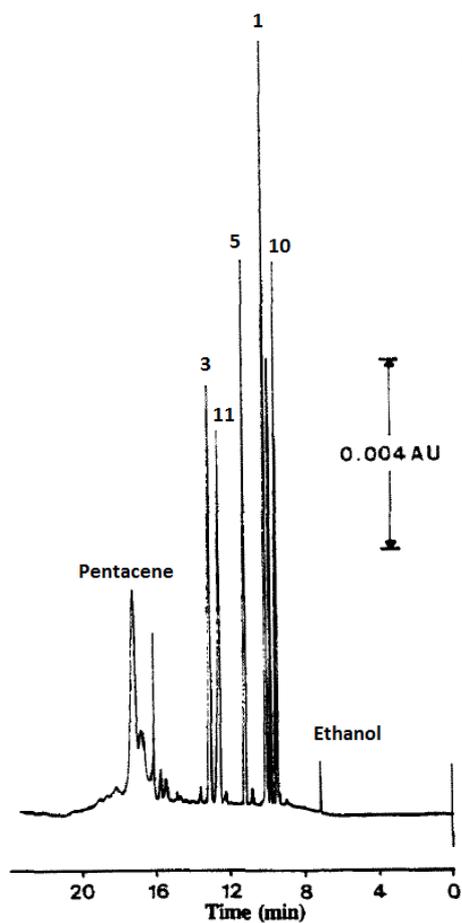


Figure 2 : Electrophorogramme obtenu en mode B.

- 1) Expliquer ce qu'est le flux électroosmotique en électrophorèse capillaire.
- 2) Sachant qu'en mode A le temps de migration de l'éthanol est supérieur à 1 heure, estimez un ordre de grandeur maximum de ce flux électroosmotique (vitesse et mobilité) dans ces conditions. Cela vous paraît-il cohérent avec les conditions expérimentales utilisées.
- 3) Après avoir identifié le mode d'électrophorèse mis en œuvre figure 1, faire un schéma sur lequel sera indiqué : l'anode (+), la cathode (-), l'extrémité d'injection, la fenêtre de détection, la nature de l'écoulement et la direction dans laquelle migre nos différents solutés en tenant compte de tous les phénomènes électrophorétiques.
- 4) Calculer la mobilité apparente des composés (1) et (11) sur la figure 1 et en déduire leur mobilité électrophorétique.
- 5) Sachant que le temps de migration du composé (5) est de 9.72 min et que la largeur à mi-hauteur du pic est de 5,4 s, calculer l'efficacité mesurée. Que pensez-vous de cette valeur par rapport aux efficacités habituelles en CPL ? A quoi est principalement due cette différence ?
- 6) Après avoir rappelé les facteurs dépendant du soluté qui jouent sur la mobilité dans le mode électrocinétique considéré figure 1, justifier l'ordre de migration des composés du tableau 1.
- 7) Quelles sont les modes d'injections possibles en électrophorèse capillaire. Expliquer celui utilisé dans le cas de la figure 1 puis calculer les volumes d'injection des composés 1 et 11, et conclure.
- 8) La même expérience que celle de la figure 1 a été effectuée en augmentant peu à peu uniquement le pH de l'électrolyte. Il a alors été remarqué qu'au-delà d'une certaine valeur de pH, il est observé un seul pic de migration pour l'injection des 5 composés du tableau 1. Quelle(s) explication(s) pouvez-vous proposer à ce phénomène ?
- 9) Quelle(s) solution(s) pourrait-on envisager (figure 1), en conservant le même électrolyte pH fixé, pour réduire le temps de la séparation ? On précisera les limitations des différentes solutions proposées.
- 10) Identifier le mode d'électrophorèse mis en œuvre figure 2.
- 11) Justifier pourquoi l'éthanol peut être considéré comme un marqueur du flux électroosmotique (figure 2) dans ces conditions et calculer vitesse et mobilité de ce flux.
- 12) Dans le cadre de la figure 2, faire un schéma sur lequel sera indiqué : l'anode (+), la cathode (-), l'extrémité d'injection, la fenêtre de détection, la nature de l'écoulement et la direction dans laquelle migre nos différents solutés en tenant compte de tous les phénomènes électrophorétiques. On insistera particulièrement sur le rôle du SDS.
- 13) Figure 2, donner le temps de migration du pentacène et que représente ce temps ? Dans ces conditions est-il possible qu'un soluté neutre présente un temps de migration supérieur à celui du pentacène ? Justifier et préciser la fenêtre des temps migration pour les composés neutres.
- 14) Justifier le choix du pH de l'électrolyte dans la figure 2.
- 15) Justifier l'ordre de migration des composés du tableau 1 dans la figure 2.
- 16) Toujours figure 2, que se passerait-il si on diminuait uniquement le pH à 2 ?