

ESPCI – 2^{ème} Année - Promotion 133 - 2015-16

J. VIAL , J. DUGAY

SCIENCES ANALYTIQUES

Contrôle des connaissances du jeudi 23 Juin 2016

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 : Séparation d'homologues

On se propose d'étudier la séparation d'alkylbenzenes qui diffèrent par la longueur de la chaîne carbonée. A cet effet nous disposons d'une colonne de chromatographie en phase liquide remplie de particules de silice partiellement poreuses (cf. figure 1) greffées par des chaînes à 8 carbones.

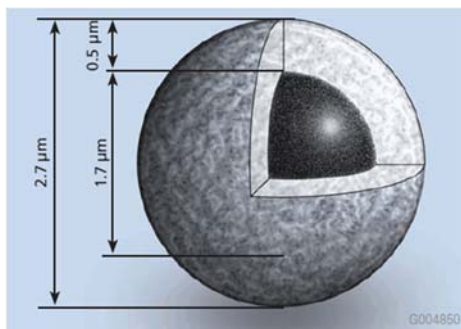


Figure 1 : Schéma d'une particule partiellement poreuse avec un noyau non poreux

1. Rappeler brièvement les avantages et inconvénients de ce type de particules par rapport aux particules totalement poreuses ?
2. Le chromatogramme obtenu en utilisant comme phase mobile un mélange eau / méthanol, 30/70 v : v est fourni figure 2.

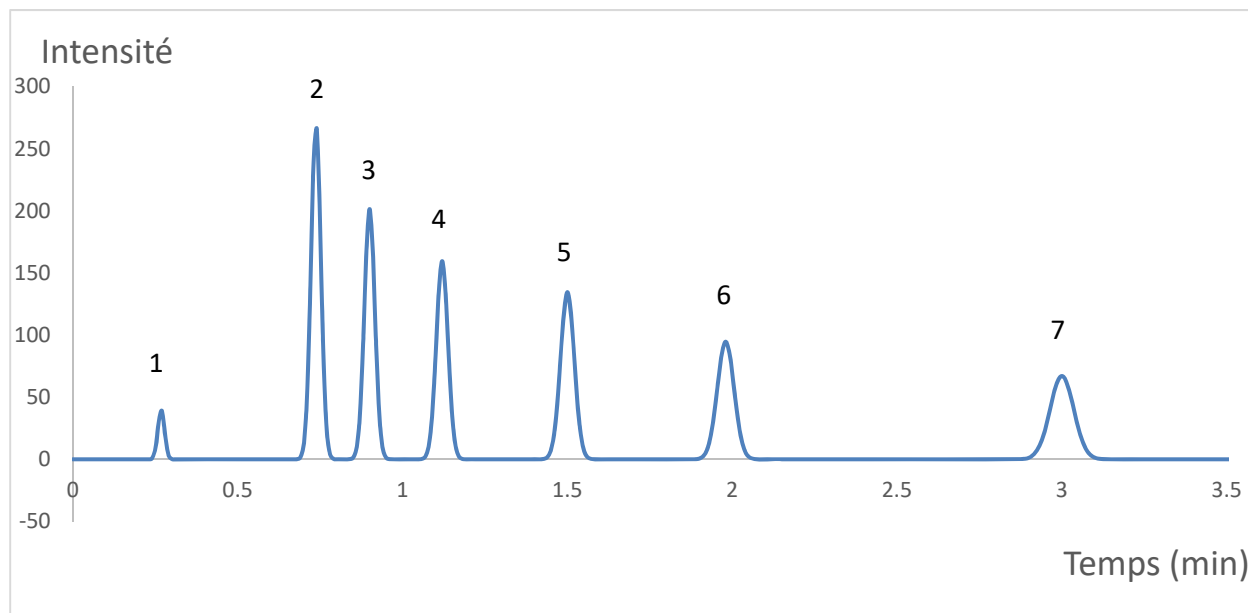


Figure 2 : Séparation des alkylbenzenes. 1 : phloroglucinol, 2 : benzene, 3 : toluene, 4 : ethylbenzene, 5 : propylbenzene, 6 : butylbenzene, 7 : pentylbenzene.

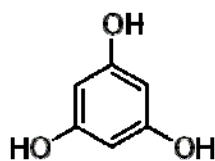


Figure 3 : Phloroglucinol.

Après avoir rappelé brièvement le mécanisme de rétention mis en jeu, justifier qualitativement l'ordre d'élution des composés et pourquoi le phloroglucinol peut être considéré comme marqueur de temps de rétention nulle.

3. Le rapport d'analyse fourni par l'intégrateur avec les temps de rétention (t_r) et les largeurs à mi-hauteur (δ) est donné tableau 1.

Composé	t_r (min)	δ (s)
1	0,27	1,4
2	0,74	2,1
3	0,90	2,2
4	1,12	2,5
5	1,50	2,9
6	1,98	3,6
7	3,00	5,0

Tableau 1 : Rapport d'analyse

Déterminer pour chaque composé le facteur de rétention (k) et l'efficacité exprimée en nombre de plateaux théoriques (N).

4. Qu'observe-t-on en ce qui concerne l'évolution de N en fonction du temps de rétention ? Est-ce logique ? A quoi pouvez-vous attribuer ce phénomène ?
5. Afin de déterminer le nombre de plateaux de la colonne nous nous proposons de tracer la variance du pic (exprimée en s^2) en fonction de t_r^2 . Ces résultats sont fournis figure 4.

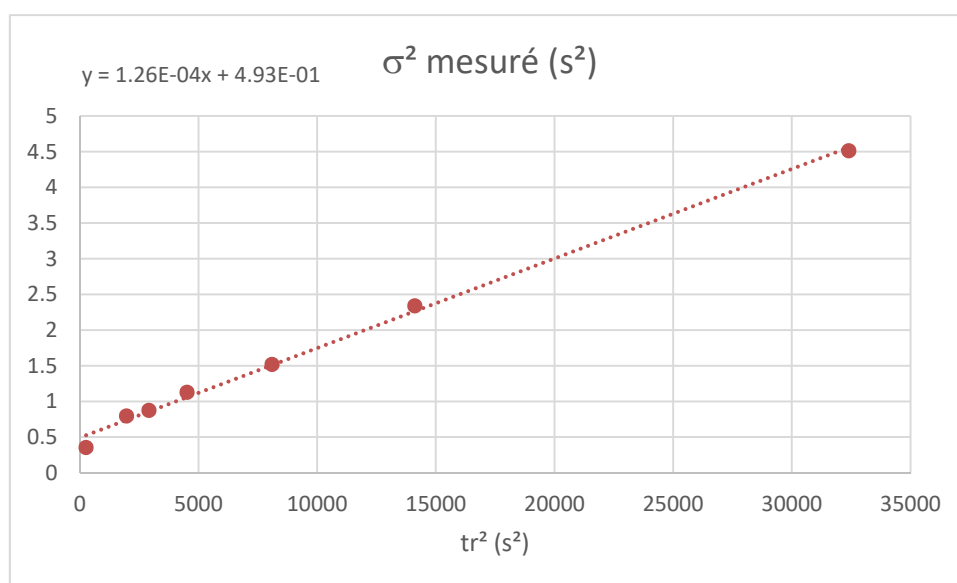


Figure 4 : Evolution de s^2 en fonction de t_r^2 avec ajustement linéaire obtenu par régression moindres carrés.

Après avoir rappelé la relation qui relie la variance d'un pic chromatographique à sa largeur à mi-hauteur, donner à partir des coefficients de la droite, le nombre de plateaux théoriques de la colonne.

6. Que représente l'ordonnée à l'origine de la droite. En pratique comment pourrait-on réduire cette contribution ?

Exercice n°2 : Analyse de médicaments par une méthode HILIC

Une note d'application d'un constructeur propose la séparation de 6 principes actifs de médicaments sur une colonne de type PFP en mode HILIC. Le chromatogramme est donné figure 5.

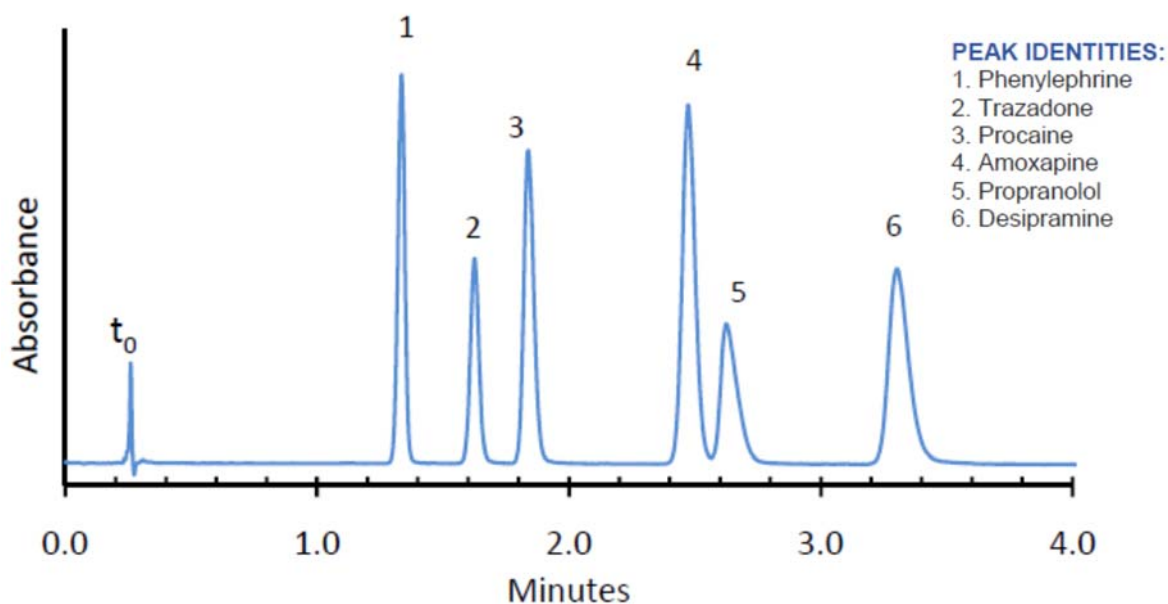
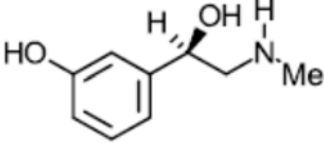
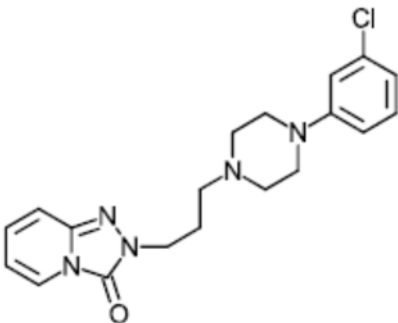


Figure 5 : Séparation des 6 principes actifs. Colonne: 4.6 x 50 mm, HALO PFP, Phase Mobile: 12/88-A/B, A= 0.01 M formiate d'ammonium pH=3.0, B=Acétonitrile, Débit: 2.0 mL/min, Pression: 101 Bar, température: 30 °C, Détection: UV 254 nm, Volume injecté : 1.0 μ L, solvant d'injection: 75/25-eau/méthanol.

Les formules des molécules, ainsi que leurs principales propriétés physico-chimiques sont indiquées dans le tableau 2.

#	Composé	Formule	Masse molaire	pKa	Log P	Point de fusion
1	Phenylephrine		167,20 g/mol	8,97	-0,31	140-145°C
2	Trazadone		371,86 g/mol	7,09	2,9	87°C

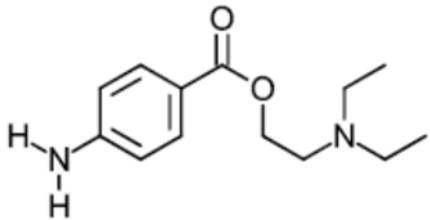
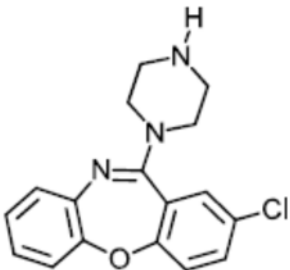
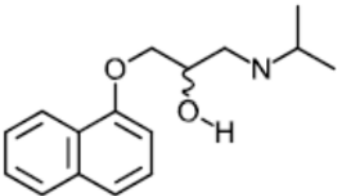
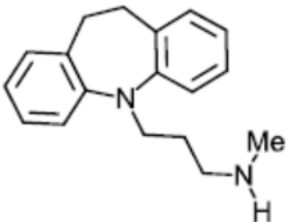
3	Procaine		236,31 g/mol	8,05	2,14	61°C
4	Amoxapine		313,78 g/mol	8,83	3,4	175-176°C
5	Propranolol		259,34 g/mol	9,42	3,48	96°C
6	Desipramine		266,38 g/mol	10,4	4,9	214-218°C

Tableau 2 : Formules et propriétés physicochimiques des analytes

La colonne HALO PFP est une colonne remplie de particules de silice sur lesquelles un groupement perfluoré (cf Figure 6) a été greffé.

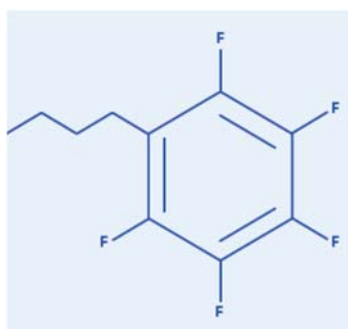


Figure 6 : Structure du greffon de la phase PFP

1. Rappeler brièvement en quoi consiste le mode HILIC. On donnera un exemple de phase stationnaire et de phase mobile caractéristiques de ce mode de séparation. On précisera le(s) facteur(s) qui gouverne l'ordre d'élution.
2. Quel composé peut-on utiliser comme marqueur de temps de rétention nulle ? Pourquoi ?

3. Si l'on fait abstraction du composé 2, que pensez-vous de la relation qui existe entre le logP et les facteurs de rétention. On pourra à cet effet tracer le graphe adapté à partir des données du tableau 3. A quel type de mécanisme cela vous fait-il penser ? Est-ce cohérent avec la nature des greffons.

	tr (min)
t0	0,25
1	1,35
2	1,62
3	1,86
4	2,49
5	2,65
6	3,32

Tableau 3 : Temps de rétention du chromatogramme de la figure 5.

4. Comment procéderiez-vous pour vérifier expérimentalement ce mécanisme ?
5. En considérant les propriétés acido-basiques des solutés et le pH de la phase mobile, quelles interactions complémentaires pourraient expliquer la rétention des solutés.
6. Que pensez-vous de la composition du solvant d'injection. Vous semble-t-elle compatible avec le mode HILIC ? Conclure.

ESPCI – 2^{ème} Année - Promotion 133 - 2015-16

J. VIAL, J. DUGAY

SCIENCES ANALYTIQUES

Contrôle des connaissances du jeudi 23 Juin 2015

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 : Couplage chromatographie en phase liquide – conductométrie – spectrométrie de masse pour l'analyse de composés ionisables

D'après "Determination of low-molecular-mass aliphatic carboxylic acids and inorganic anions from kraft black liquors by...", J.M. KAKOLA et al., *J. Chrom. A*, 1190 (2008) 150-156.

Cette étude consiste à identifier puis quantifier des acides carboxyliques, essentiellement aliphatiques, et d'autres anions inorganiques susceptibles d'être présents dans les « kraft black liquors ». Pour ce faire il est mis en œuvre une séparation par chromatographie en phase liquide couplée à une double détection conductimétrique et spectrométrie de masse. La séparation d'un mélange étalon est donnée à la figure 1 (identification des pics chromatographiques tableau 1). Le tableau 2 fournit quant à lui les propriétés physico-chimiques de quelques-uns des composés étudiés, voir également les tableaux 3 et 4.

Conditions analytiques:

Séparation:

- Colonne: IonPac AS11-HC (PS-DVB greffé triméthyl-ammonium $-N(CH_3)_3^+$),
250 mm x 4,0 mm, 9 μ m.
- Phase mobile: gradient en hydroxyde de potassium KOH dans H₂O suivant :

Time	mM KOH
0.01	1.00
2.00	1.00
10.00	4.00
20.00	35.00
24.00	60.00
27.00	60.0
27.20	1.00
35.00	1.00

(1 mM = 10⁻³ mol/L)

- Débit : 1,0 mL.min⁻¹.
- Volume injecté : 25 μ L.
- Température colonne : 25°C.

Détection :

Deux détecteurs placés en série (détecteur 1 puis détecteur 2) avec en amont un suppresseur chimique (neutralisation de la phase mobile)

Suppresseur : Dionex ASRS Ultra II Self-Regenerating (suppresseur électrochimique à membranes)

Détecteur 1 : Conductimètre (conductivité donnée à 25°C)

Détecteur 2 : Spectromètre de masse simple quadripôle

- source : ESI-
- mode SIM.

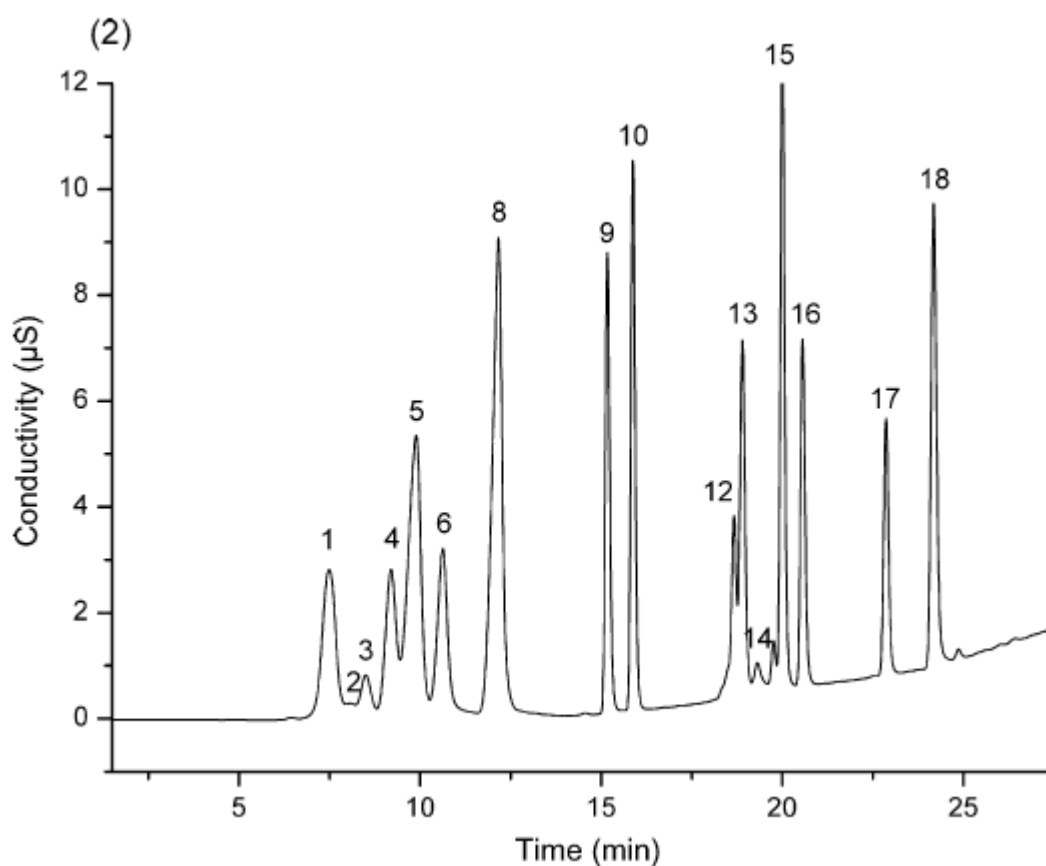


Figure 1 : Chromatogramme correspondant à la séparation d'un mélange d'acides carboxyliques aliphatiques et d'anions inorganiques de concentrations comprises entre 5 et 10 mg/L. Détection conductimétrique après suppression chimique. Voir tableau 1 pour l'identification des pics.

Tableau 1 : Identification des pics chromatographiques de la figure 1 (avec pour chacun le(s) rapport(s) m/z fixé(s) lors de la détection spectrométrique)

Peak number	Compound	m/z
1	α - and β -Glucoisosaccharinate	179
2	Xyloisosaccharinate	149
3	3,4-Dideoxy-pentonate	133
4	Lactate	89
5	Acetate and glycolate	59, 75
6	2-Hydroxybutanoate	103
7	2-Hydroxy-4-pentenoate	115
8	Formate	45
9	Chloroacetate	93.5
10	Chloride	
11	Glucoisosaccharinarate	193
12	Methylsuccinate	131
13	Malate and succinate	133, 117
14	2- and 3-Deoxy-tetronate	119
15	Sulfate	
16	Oxalate	89
17	Phosphate	
18	Thiosulfate	

Tableau 2 : Propriétés physico-chimiques de quelques composés

Nom	Formule	Masse Molaire (g/mol)	pK _A	Log P	Teb (°C)
Acide lactique	CH ₃ CHOHCOOH	90,1	3,86	-0,62	122
Acide acétique	CH ₃ COOH	60,1	4,76	-0,31	118
Acide glycolique	HOCH ₂ COOH	76,1	3,83	-1,11	100
Acide formique	HCOOH	46,0	3,75	-0,54	101
Acide chloroacétique	ClCH ₂ COOH	94,5	2,87	0,34	189
Acide chlorhydrique	HCl	36,4	<0	--	
Acide succinique	HOOC(CH ₂) ₂ COOH	118,1	4,16 – 5,61	-0,59	235
Acide sulfurique	H ₂ SO ₄	98,1	<0 et 1,9	--	
Acide fluorhydrique	HF	20,0	3,20	--	
Acide bromique	HBr	80,9	<0	--	
Phénol	C ₆ H ₅ OH	94,1	9,99	1,46	182

Tableau 3 : Echelle d'affinité de quelques anions communs vis-à-vis du greffon triméthylammonium –N(CH₃)₃⁺**Tableau 4 :** Conductivités équivalentes limites λ° d'ions communs (λ° donné à 25°C dans l'eau en S.cm².mol⁻¹).

Cations	λ° (S.cm ² .mol ⁻¹)	Anions	λ° (S.cm ² .mol ⁻¹)
H ⁺	350	OH ⁻	198
Na ⁺	50,1	Cl ⁻	76,3
K ⁺	73,5	Br ⁻	78,1
Mg ²⁺	53,1	HCOO ⁻	54,6
Ca ²⁺	59,5	CH ₃ COO ⁻	40,9

1) A partir des données concernant la colonne et la phase mobile de quel type de chromatographie s'agit-il ? D'écrire le mécanisme global en donnant les interactions impliquées ? Quel(s) est (sont) le(s) paramètre(s) qui joue(nt) sur la force éluante de la phase mobile ?

2) Compte-tenu du mécanisme de rétention mis en œuvre, quel(s) est (sont) le(s) paramètre(s) physico-chimique(s) des solutés qui va (vont) régir la rétention ?

3) Quel stratégie expérimentale pourriez-vous proposer afin de vérifier le mécanisme de rétention que vous avez proposé en 1) ?

4) Les auteurs donnent un temps de rétention nulle expérimental à 1,7 min pour la figure 1, en déduire la porosité de la colonne.

- 5) Pourquoi utilise-t-on un gradient ? Comment est-il mis œuvre ici ? A quoi correspond la fin du gradient proposé c'est-à-dire le temps compris entre 27 et 35 min ?
- 6) Calculer le pH de la phase mobile au départ du gradient (à 0 min) puis à 24 min. L'évolution du pH vous semble-t-elle cohérente, expliquer ? Sur quoi va jouer la variation du pH ? Comment cela va-t-il se répercuter sur l'élution des solutés ?
- 7) Donner, en la justifiant, l'allure schématique (on ne demande aucun calcul) d'un chromatogramme des solutés listés dans le tableau 2 et présents sur la figure 1 mais avec une phase mobile à pH=2 et en mode isocratique.
- 8) Si l'hydroxyde de potassium KOH était remplacé par du bromure de potassium KBr en phase mobile avec le même gradient de concentration que celui proposé à la figure 1, comment évoluerait la rétention du composé pic 10 présenté à la figure 1 ? Justifiez votre réponse.
- 9) Estimer la résolution entre les pics 4 et 5 à partir de la figure 1 ? Il s'avère que le pic 4 correspond à l'élution de l'acide lactique tandis que sous l'enveloppe du pic 5 il y a coélution des deux composés acides acétique et glycolique. Quelle(s) solution(s) proposeriez-vous pour essayer de séparer ces trois acides avec une résolution suffisante ?
- 10) Est-ce que l'ordre des deux détecteurs placés en série, ici en un le conductimètre puis en deux le spectromètre de masse, est important ? Justifiez votre réponse.
- 11) Les auteurs interposent un suppresseur chimique (neutralisation de la phase mobile) entre la colonne et le détecteur conductimétrique. Expliquez le rôle du suppresseur chimique mis en œuvre ici (il n'est pas demandé son principe de fonctionnement).
- 12) Calculer la conductivité χ en μS de la phase mobile seule au départ du gradient (en absence de soluté) avant et après passage au travers du suppresseur chimique. Quelles sont les conséquences de la présence de ce suppresseur chimique vis-à-vis des performances de la détection en conductimétrie ?
- 13) Expliquer pourquoi le phénol ne serait pas observé dans les conditions de l'analyse de la figure 1.
- 14) Rappeler en 5 lignes maximum le principe de l'ESI.
- 15) Que se passerait-il si on réalisait le même couplage avec la MS mais sans le suppresseur ?
- 16) Justifier les valeurs de m/z du tableau 1. Pourquoi les auteurs n'indiquent qu'un seul m/z par composé ?
- 17) Dans des échantillons réels, on cherche à quantifier les acides 2-hydroxybutanoïque, formique et oxalique. Quelle méthode de détection privilégier ? Pourquoi ?
- 18) Dans des échantillons réels, on cherche à quantifier les acides lactique, acétique et glycolique. Quelle méthode de détection privilégier ? Pourquoi ?
- 19) Dans ce dernier cas (cf question 18) des analyses effectuées en échantillons réels dopés montrent une différence de réponse avec des dopages au même niveau d'une eau pure. Quelle méthode de quantification vous paraît pertinente ?