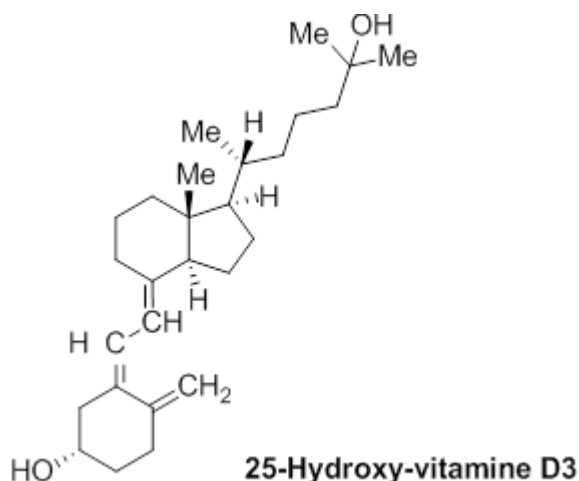


Correction du DST 2 - Analyse (sur 21 points) (1h00)

*Documents non autorisés - Calculatrice autorisée
Justifier les calculs
Séparer calcul littéral et numérique*

Exercice 1 : (extrait du BTS Chimiste 2014) Analyse spectroscopique de la 25-hydroxy-vitamine D₃ (13,5 points)

Dans cette partie, on s'intéresse à la 25-hydroxy-vitamine D₃ dont la structure est donnée ci-dessous :



Données sur la 25-hydroxy-vitamine D₃ :

Formule brute	C ₂₇ H ₄₄ O ₂
Masse molaire	400,64 g.mol ⁻¹
Température de fusion	95-106 °C
Spectre UV	$\lambda_{max} = 265 \text{ nm}$
Spectre Infra-Rouge (KBr) (données utiles)	3500, 3360 cm ⁻¹ 3080, 3030 cm ⁻¹ 1650, 1635 cm ⁻¹ 1050 cm ⁻¹ 900, 880, 860 et 765 cm ⁻¹
Spectre RMN du ¹ H (δ, CDCl ₃ , 100 MHz) (données utiles)	0,54 ppm (3H, s) 0,90 ppm (3H, d, J = 8 Hz) 1,22 ppm (6H, s) 4,80 ppm (1H, s) et 5,00 ppm (1H, s) 5,97 ppm (1H, d, J = 12 Hz) et 6,25 ppm (1H, d, J = 12 Hz)

Source : <http://lipidbank.jp/cgi-bin/detail.cgi?id=VVD0273>

1) Étude du spectre UV

Proposer une interprétation à propos de la longueur d'onde maximale observée, sachant que l'éthène (éthylène) absorbe à 171 nm. Comment appelle-t-on ce phénomène ? **(1,5 points)**

La 25-OH-D₃ possède 3 C=C conjuguées, on observe alors une augmentation de la longueur d'onde maximale absorbée. C'est l'effet bathochrome.

2) Étude du spectre IR

2.1. Identifier la(les) bande(s) de vibration(s) d'élongation mettant en évidence la fonction alcool. **(2 points)**

La fonction alcool peut être mise en évidence grâce aux bandes de vibrations d'élongation des liaisons suivantes :

O-H (alcool) à 3500 cm⁻¹ et 3360 cm⁻¹ ;
C_{tet}-OH à 1050 cm⁻¹

2.2. Quelles sont les bandes de vibrations d'élongation mettant en évidence les différentes liaisons C=C présentes dans la molécule ? **(2 points)**

Les bandes de vibration d'élongation mettant en évidence la présence de liaisons C=C sont :

celles à 3080 et 3030 cm⁻¹ (C_{tri}-H)
celles à 1650 et 1635 cm⁻¹ (C=C)

3) Étude du spectre RMN ¹H

3.1. Que représentent δ et 100 MHz dans les données du spectre RMN ? **(1 point)**

δ = déplacement chimique ;

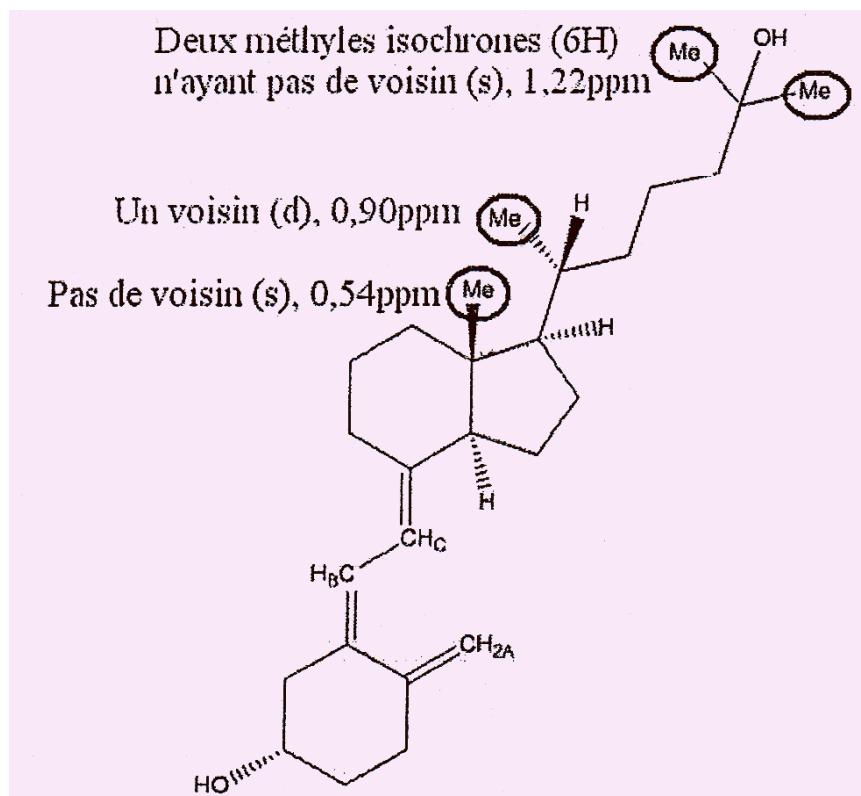
100 MHz = fréquence de l'appareil RMN utilisée pour obtenir le spectre.

3.2. Préciser le rôle du chloroforme deutéré CDCl₃. Pourquoi le chloroforme (trichlorométhane) doit-il être deutéré ? **(1 point)**

CDCl₃ = chloroforme deutéré (les produits analysés sont systématiquement dissous : il joue le rôle de solvant.

Il doit être deutéré car CHCl₃ donne un signal en RMN.

3.3. En analysant la structure de la molécule donnée en **annexe 3**, identifier les protons responsables des signaux à 0,54 ppm, 0,90 ppm et 1,22 ppm, en les repérant clairement sur l'**annexe 3**, à rendre avec la copie. **(3 points)**



3.4. Identifier, de manière générale, quels protons sont responsables des signaux à 4,80 ppm et 5,00 ppm. Justifier avec précision. **(1 point)**

À 4,80 ppm et 5,00 ppm, nous avons un singulet et donc la courbe d'intégration donne 1H. C'est le proton de la fonction alcool -OH.

3.5. En utilisant la table d'incrément fournie en **annexe 4**, calculer le déplacement chimique des protons éthyléniques H_B et H_C. Conclure en attribuant les signaux à 5,97 ppm et 6,25 ppm. **(2 points)**

$$\delta_B = 5,25 + 1,24 - 0,22 - 0,05 = 6,22 \text{ ppm (soit 6,25 ppm expérimentalement) ;}$$

$$\delta_C = 5,25 + 1,24 - 0,22 - 0,28 = 5,99 \text{ ppm (soit 5,97 ppm expérimentalement) ;}$$

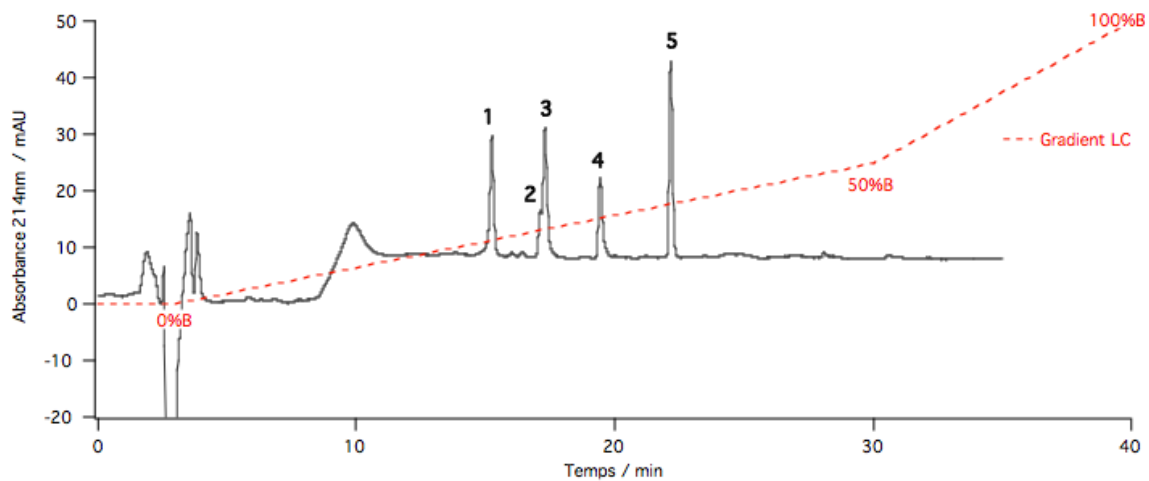
Exercice 2 : Séparation de peptides par capHPLC (7,5 points)

Dans cette expérience, un mélange de 5 peptides est analysé en chromatographie liquide. L'échantillon (1 μ L) est injecté dans une capHPLC avec une colonne capillaire de phase inverse C18 et de longueur L = 15,0 cm.

Le gradient d'éluion est composé de deux solvants A et B :

A: H₂O / Acetonitrile (98:2) - B: Acetonitrile / H₂O (80:20)

Le gradient appliqué durant la chromatographie est représenté en pointillés sur le chromatogramme suivant. Les espèces non retenues sortent à 3,00 min après l'injection.



Les temps de rétention et largeur de pic pour chaque peptide, déterminés à partir du chromatogramme précédent sont indiqués dans le tableau suivant :

Peptide	temps de rétention t_R (min)	largeur à la base du pic w (min)
1	15,242	0,273
2	17,084	-
3	17,300	-
4	19,434	0,296
5	22,167	0,249

1) Répondre aux questions suivantes :

1-1/ Le mode de chromatographie est un mode en phase inverse comme indiqué dans l'énoncé, qu'en conclure sur la polarité des phases stationnaire et mobile ? **(0,5 point)**

La phase stationnaire est plutôt apolaire (ou hydrophobe) (chaîne alkyles C18), et la phase mobile plutôt polaire (ou hydrophile) (solvants d'élution eau et acétonitrile).

1-2/ Le mode de travail utilisé ici est le mode gradient, quel autre mode aurions-nous pu utiliser et quels sont ses avantages par rapport au mode gradient ? À votre avis, pourquoi utilise-t-on le mode gradient ici ? **(1 point)**

L'autre mode de travail que l'on pourrait utiliser est le mode isocratique, qui demande un appareillage moins coûteux, un entretien, une maintenance et une qualification d'appareil moins stricts, une programmation de méthode plus simple et une dérive de ligne de base beaucoup moins importante.

On utilise le mode gradient afin de séparer les peptides en un minimum de temps.

2) Répondre aux questions suivantes :

2-1/ D'après l'énoncé, quel est la valeur du temps mort t_M ? **(0,5 point)**

Le temps mort correspond à la durée que mettent les espèces non retenues le long de la colonne, donc ici $t_M = 3,00$ min.

2-2/ Rappeler la définition du facteur de rétention k' en fonction du temps de rétention t_R et du temps mort t_M . **(0,5 point)**

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

2-3/ Déterminer le facteur de rétention k' de chaque peptide. Commenter les valeurs obtenues. **(1 point)**

Peptide	k'
1	4,08
2	4,69
3	4,77
4	5,48
5	6,39

Les valeurs de k' sont optimales puisqu'elles sont comprises entre 1 et 10.

3) Répondre aux questions suivantes :

3-1/ Rappeler la définition de la résolution R_S en fonction des temps de rétention t_{RA} et t_{RB} et des largeurs à la base des pics correspondants w_A et w_B . **(0,5 point)**

$$R_S = \frac{2(t_{RB} - t_{RA})}{w_A + w_B}$$

3-2/ À partir des pics représentant les peptides 4 et 5, déterminer la résolution R_S de la colonne. **(0,5 point)**

$$R_S = \frac{2(22,167 - 19,434)}{0,296 + 0,249} = 10,0$$

4) Répondre aux questions suivantes :

4-1/ Rappeler les définitions du nombre de plateaux théoriques N en fonction du temps de rétention t_R et de la largeur à la base du pic w , ainsi que celle de la hauteur équivalente de plateaux théoriques H en fonction de L et N . **(1 point)**

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w}\right)^2 \quad \text{et} \quad H = \frac{L}{N}$$

4-2/ Calculer le nombre de plateaux théoriques moyen $\langle N \rangle$ et la hauteur équivalente de plateaux théoriques moyenne $\langle H \rangle$ de la colonne HPLC utilisée. À votre avis, est-ce suffisant pour avoir une séparation convenable ? **(1,5 points)**

Peptide	N
1	49900
2	/
3	/
4	69000
5	126800

$\langle N \rangle = 81900$ et $\langle H \rangle = 1,83 \cdot 10^{-4}$ cm.

La valeur de $\langle N \rangle$ n'est pas assez élevée et la valeur de $\langle H \rangle$ n'est pas assez faible pour que la séparation soit convenable, ce que l'on observe bien sur le chromatogramme !

5) Pourquoi les peptides 2 et 3 sont-ils élués quasiment en même temps ? (raisonner en terme de polarité). **(0,5 point)**

Leur polarité est certainement très proche, c'est la raison pour laquelle ils sont élués quasiment en même temps.

FIN DE L'ÉPREUVE

ANNEXE 1
SPECTROSCOPIE INFRAROUGE
Table des nombres d'onde des vibrations d'élongation et de déformation

C_{tet} : C tétraogonalC_{tri} : C trigonal >C=C_{di} : C digonal -C≡

Liaison	Nature	Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Intensité F : fort ; m : moyen ; f : faible
O-H alcool libre	Élongation	3590-3650	F (fine)
O-H alcool lié	Élongation	3200-3600	F (large)
N-H amine	Élongation	3300-3500	M
N-H amide	Élongation	3100-3500	F
C _{di} -H	Élongation	~ 3300	M ou f
C _{tri} -H	Élongation	3030-3100	M
C _{tri} -H aromatique	Élongation	3000-3100	M
C _{tet} -H	Élongation	2850-2970	F
C _{tri} -H aldéhyde	Élongation	2700-2900	M
O-H acide carboxylique	Élongation	2500-3200	F à m (large)
C≡C	Élongation	2100-2260	F
C≡N nitriles	Élongation	2200-2260	F ou m
C=O anhydride	Élongation	1800-1850 1740-1790	F
C=O chlorure d'acide	Élongation	1790-1815	F
C=O ester	Élongation	1735-1750	F
C=O aldéhyde et cétone	Élongation	1700-1740 abaissement de ~ 20 à 30 cm ⁻¹ si conjugaison	F
C=O acide carboxylique	Élongation	1700-1725	F
C=O amide	Élongation	1650-1700	F
C=C	Élongation	1620-1690	M
C=C aromatique	Élongation	1450-1600	Variable ; 3 ou 4 bandes
N=O (de -NO ₂) Conjugué	Élongation	1500-1550 1290-1360	F
N=N	Élongation	1400-1500	f ; parfois invisible
C=N	Élongation	1640-1690	F ou m
N-H amine ou amide	Déformation	1560-1640	F ou m
C _{tet} -H	Déformation	1430-1470	F
C _{tet} -H (CH ₃)	Déformation	1370-1390	F ; 2 bandes
O-H	Déformation	1260-1410	F
P=O	Élongation	1250-1310	F
C _{tet} -O-C _{tet} (étheroxydes)	Élongation	1070-1150	F
C _{tet} -OH (alcools)	Élongation	1010-1200	
C _{tet} -O-C _{tri} (esters) C _{tri} -O-C _{tri} (anhydrides)	Élongation	1050-1300	F ; 1 ou 2 bandes
C-N	Élongation	1020-1220	M
C-C	Élongation	1000-1250	F
C-F	Élongation	1000-1040	F
C _{tri} -H de -HC=CH- (E) (Z)	Déformation Déformation	960-970 670-730	F M
C _{tri} -H aromatique monosubstitué	Déformation	730-770 et 680-720	F ; 2 bandes
C _{tri} -H aromatique o-disubstitué m-disubstitué p-disubstitué	Déformation Déformation Déformation	735-770 750-800 et 680-720 800-860	F F et m ; 2 bandes F
C _{tri} -H aromatique 1,2,3 trisubstitué 1,2,4 trisubstitué 1,3,5 trisubstitué	Déformation Déformation Déformation	770-800 et 685-720 860-900 et 800-860 810-865 et 675-730	F et m ; 2 bandes F et m ; 2 bandes F et m ; 2 bandes
C _{tet} -Cl	Élongation	600-800	F
C _{tet} -Br	Élongation	500-750	F
C _{tet} -I	Élongation	≈ 500	F

ANNEXE 2
SPECTROSCOPIE DE RMN DU PROTON

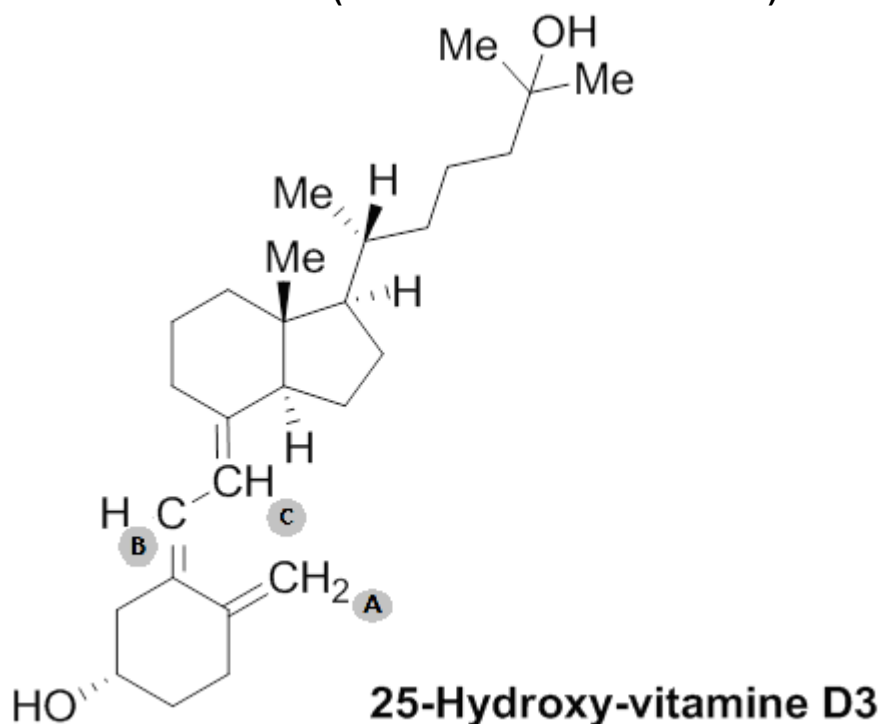
Domaines de déplacements chimiques des protons des groupes M (méthyle CH₃, méthylène CH₂ et méthyne CH) en α ou en β de groupes caractéristiques.

type de proton	δ en ppm	type de proton	δ en ppm
CH ₃ -SiR ₃	0,0-1,0		
M-CH ₂ R	0,8-1,6	M-C-CH ₂ R	0,9-1,6
M-C=C	1,6-2,0	M-C-C=C	1,0-1,8
M-C≡C	1,7-2,8	M-C-C≡C	1,2-1,8
M-Ph	2,2-2,8	M-C-Ph	1,1-1,8
M-F	4,2-4,8	M-C-F	1,5-2,2
M-Cl	3,0-4,0	M-C-Cl	1,5-2,0
M-Br	3,4-4,1	M-C-Br	1,8-1,9
M-I	3,1-4,2	M-C-I	1,7-2,1
M-OH et M-OR	3,2-3,6	M-C-OH et M-C-OR	1,2-1,8
M-OPh	3,8-4,6	M-C-OPh	1,3-2,0
M-O-CO-R	3,6-5,0	M-C-O-CO-R	1,3-1,8
M-O-CO-Ph	3,8-5,0	M-C-O-CO-Ph	1,6-2,0
M-CHO et M-CO-R	2,1-2,6	M-C-CHO	1,1-1,7
M-CO-Ph	3,8-5,0	M-C-CO-R	1,1-1,8
M-CO-OH et M-CO-OR	1,8-2,6	M-C-CO-Ph	1,1-1,9
M-CO-NR ₂	1,8-2,2	M-C-CO-OR	1,1-1,9
M-C≡N	2,2-3,0	M-C-CO-NR ₂	1,1-1,8
M-NH ₂ et M-NR ₂	2,2-3,0	M-C-C≡N	1,2-2,0
M-N ⁺ R ₃	3,0-3,6	M-C-N ⁺ R ₃	1,4-2,0
M-NH-CO-R	3,0-3,8	M-C-NH-CO-R	1,1-1,9
M-NO ₂	4,1-4,4	M-C-NO ₂	1,6-2,5
M-SH et M-SR	2,1-5,1	M-C-SH et M-C-SR	1,3-1,9

Domaines de déplacements chimiques de divers protons

type de proton	δ / ppm	type de proton	δ / ppm
>C(cycle)=CH ₂	4,6	-CO-OH	8,5-13
>C=CH ₂	5,3	>C=C-OH	11-17
-C=CH-	5,1	PhH	7,2
-C=CH- (cyclique)	5,3	R-OH	0,5-5,5
R-C≡C-H	3,1	Ar-OH	4,0-7,5
Ar-H	7,0-9,0	Ar-OH (avec liaison H intramoléculaire)	5,5-12,5
>C=CH-CO-	5,9	R-NH-	0,5-3,0
-CH=C-CO-	6,8	Ar-NH	3,0-5,0
R-CHO	9,9	R-CO-NH-	5,0-8,5
Ar-CHO	9,9	CHCl ₃	7,2
H-CO-O-	8,0	H ₂ O	≈5,0
H-CO-N<	8,0		

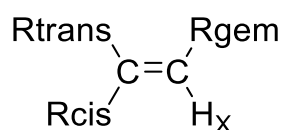
ANNEXE 3 (À RENDRE AVEC LA COPIE)



ANNEXE 4 :

CALCUL DE DÉPLACEMENTS CHIMIQUES DE PROTONS ÉTHYLÉNIQUES

Les protons portés par un atome de carbone éthylénique subissent un déplacement chimique d'environ 4 à 6 ppm, mais qui peut atteindre 7,5 ppm dans le cas des conjugaisons intenses qui accroissent le déblindage. Ces déplacements peuvent être prévus par l'application de la relation empirique suivante :



$$\delta H_x(\text{ppm}) = 5,25 + Z_{\text{gem}} + Z_{\text{cis}} + Z_{\text{trans}}$$

Nature de R	Z		
	Gem	Cis	Trans
H	0	0	0
Alkyle	0,45	-0,22	-0,28
	a. 1,00	-0,09	-0,23
	b. 1,24	0,02	-0,05

** b. Valeur à utiliser lorsque le substituant ou la double liaison est conjugué avec un autre substituant

Source : <http://cbps.fr/12/filemanager/data/Archives%202011/S2/Chimie/tablesL2CBPS.pdf>