

Correction du DST 1bis - Analyse **(sur 20 points)** (1h00)

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

Exercice 1 : Spectrofluorimétrie (9 points)

1/ **Indiquer la relation simple entre l'intensité de fluorescence F et la concentration C d'un analyte. (0,5 point)**

$$F = K.C \quad \text{avec} \quad K = 2,3.K'.P_0.\epsilon.b$$

2/ Les méthodes d'analyse par fluorescence sont 10 à 1000 fois plus sensibles que les méthodes spectrophotométriques. **Indiquer les deux méthodes principales pour augmenter la sensibilité de la spectrofluorimétrie. Expliquer pourquoi cela n'a pas d'effet en spectrophotométrie. (1,5 points)**

1^{ère} méthode : augmenter la puissance du rayonnement d'excitation.

2^{ème} méthode : amplifier le signal du détecteur c'est-à-dire augmenter la sensibilité du spectrofluorimètre.

Aucunes de ces méthodes ne permet d'améliorer la sensibilité des méthodes d'absorption spectrophotométrique car,

$$C = k.A = k.\log \frac{P_0}{P}$$

L'augmentation de P_0 augmente de la même façon P et n'a donc aucun effet sur la sensibilité. De même, le taux d'amplification du signal issu du détecteur affecte les deux quantités mesurées de manière identique, ce qui n'entraîne aucune amélioration.

3/ **Quelle est la méthode directe qui permet de rendre fluorescent un composé chimique organique qui ne l'est pas a priori. (1 point)**

Elle est basée sur la réaction du composé chimique avec un agent chélatant pour former un complexe fluorescent.

D'après MA (J.Y.C), MA (J.K.H), WEBER (K.C), Fluorescence studies of the binding of amphiphilic amines with phospholipides, Journal of Lipid Research, vol. 26, 1985, p.735-744.

Les substances médicamenteuses amphiphiles et cationiques telles que l'imipramine (antidépresseur) et la chlorphentermine (anorexinogène) peuvent causer des désordres au niveau des phospholipides.

Lüllman, Rossen et Seiler démontrèrent en effet que de telles molécules induisaient une lipidose. Le terme lipidose est un terme regroupant un ensemble d'enzymopathies congénitales et héréditaires affectant le métabolisme lipidique et habituellement d'une grande gravité, entraînant l'accumulation anormale de lipides dans les cellules du système nerveux et souvent d'autres organes. Ce phénomène était directement lié à la concentration de la molécule dans les tissus.

Les résultats ont suggéré que la liaison de ces molécules amphiphiles aux tissus et peut-être aux phospholipides serait nécessaire à l'induction de la lipidose. Pour Lüllman, Lüllmann-Rauch et Wassermann, ces molécules interagiraient avec les phospholipides à la fois par des forces électrostatiques et hydrophobes et de telles liaisons pourraient conduire à un métabolisme anormal des phospholipides : ils seraient attaqués par des phospholipases et leur catabolisme serait inhibé. Afin de mieux connaître la nature de ces interactions et leurs conséquences, l'équipe a réalisé des expériences de liaison grâce à une méthode fluorimétrique utilisant l'ANS (1-anilino-8-naphtalène sulfonate) et le DPH (1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène) comme réactifs fluorescents sur des phospholipides commerciaux.

Pour caractériser les interactions hydrophobes, le DPH est utilisé. Le DPH lié aux lipides fluoresce alors que le DPH libre en solution aqueuse ne fluoresce pas. De plus, l'addition d'une substance médicamenteuse provoque une diminution de la fluorescence due à sa fixation sur ou à côté du site de fixation du DPH. Pour caractériser les interactions électrostatiques, la molécule d'ANS est utilisée. Ces caractéristiques de fluorescence sont différentes lorsque la molécule est fixée ou libre, ce qui permet de mesurer assez facilement la fraction liée et la fraction libre.

Ce sujet étudie les interactions avec la chlorphentermine dont la formule est donnée par la figure n° 1 ci-dessous.

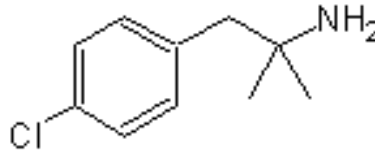


Figure 1 : La chlorphentermine

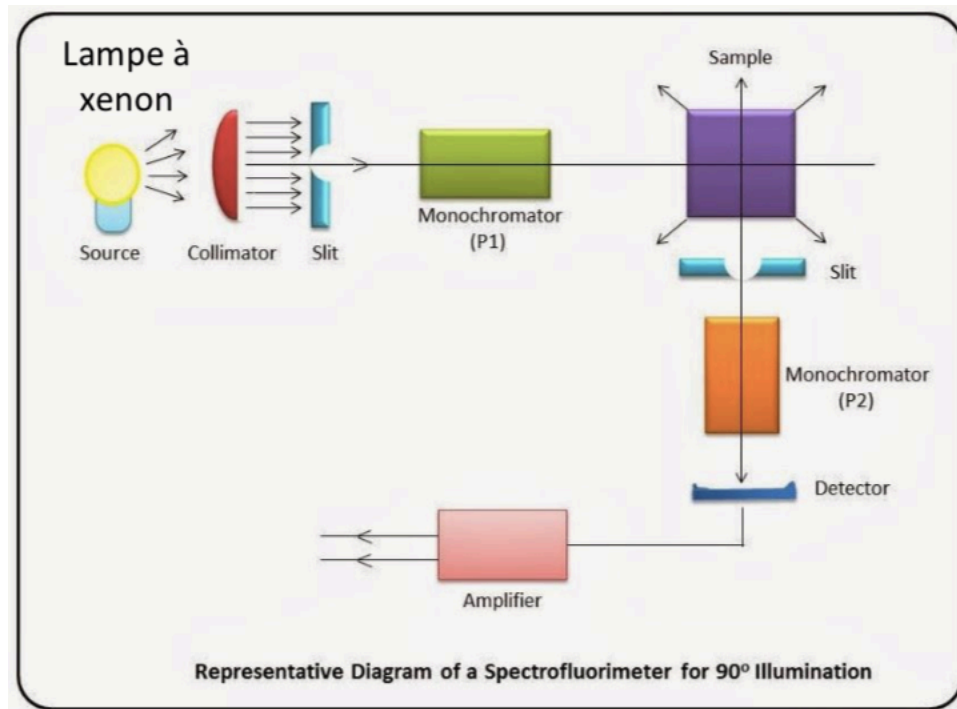
Etude de la fluorescence du DPH

4/ Ne connaissant pas les longueurs d'onde d'excitation et d'émission maximales du DPH, une solution de DPH est préparée dans un solvant organique puis placée dans un spectrofluorimètre. **Quel type de cuve doit-on utiliser et pourquoi ? (1 point)**

On doit utiliser une cuve en quartz car rien ne nous indique la partie du spectre correspondant aux l.o d'excitation et d'émission du DPH.

Il faut 4 faces optiques, car en fluorescence, le signal est détecté perpendiculairement au flux incident.

5/ Faire le synoptique d'un spectrofluorimètre mono-faisceau. Vous expliquerez le rôle de chaque partie. (2,5 points)



6/ L'étude de la fluorescence donne les longueurs d'onde de 386 et 440 nm. Préciser quelle est la longueur d'onde d'émission et quelle est la longueur d'onde d'excitation en justifiant. (2,5 points)

$$E_{em} < E_{exc} \Rightarrow \frac{hc}{\lambda_{em}} < \frac{hc}{\lambda_{exc}} \Rightarrow \lambda_{exc} < \lambda_{em}$$

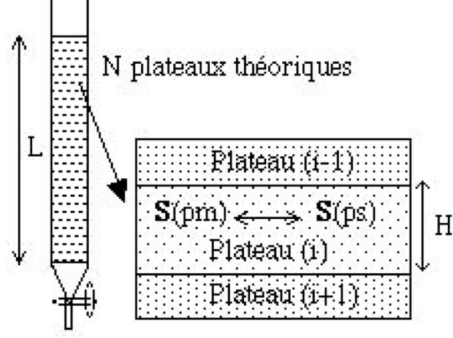
Donc $\lambda_{exc} = 386 \text{ nm}$ et $\lambda_{em} = 440 \text{ nm}$

Exercice 2 : Chromatographie (12,5 points)

1/ Quelles sont les différences entre chromatographie sur colonne et chromatographie planaire ? (2 points)

- En chromatographie sur colonne, la phase stationnaire est maintenue dans un tube étroit et la phase mobile y progresse par gravité ou sous l'action d'une différence de pression.
- En chromatographie planaire, la phase stationnaire est présente à la surface d'un support plat (CCM) ou immobilisée à l'intérieur des pores d'une feuille de cellulose (CP). Dans ce cas, la phase mobile se déplace à travers la phase stationnaire par capillarité ou sous l'effet de la gravité.

2/ En quoi consiste le modèle thermodynamique des plateaux théoriques ? (Faites un schéma et introduisez la notion de nombre de plateaux théoriques N et de hauteur équivalente à un plateau théorique H) (2 points)

<p>⇒ Une colonne de N plateaux théoriques est une colonne divisée en N petits disques cylindriques successifs. On admet que la phase mobile progresse par sauts successifs d'un plateau théorique à l'autre.</p> <p>⇒ Dans chaque plateau théorique, on observe une rétention du soluté S, du fait de l'équilibre de ce produit entre la phase mobile et la phase stationnaire.</p>	
---	---

Pour exprimer l'efficacité d'une colonne de longueur L et de N plateaux théoriques, on définit la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) :

$$H = \frac{L}{N}$$

3/ L'efficacité d'une colonne est liée à la valeur de N donc de H. Pour cela J.J. Van Deemter a élaboré en 1956, l'équation qui porte son nom $H = f(u)$.

- a - Rappeler l'expression de la version modernisée de l'équation de Van Deemter. (0,5 point)

$$H = \frac{B}{u} + C_S \cdot u + C_M \cdot u$$

- b - Soient le faisceau de courbes représenté ci-dessous :

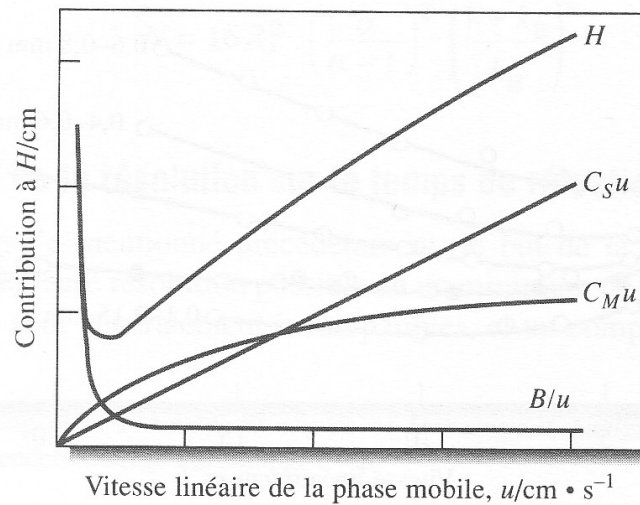


Figure 2 : Courbes contributives à celle de Van Deemter

Quel est le lien entre les différentes courbes ? (0,5 point)

La somme point par point des courbes B/u , $C_{S.u}$ et $C_{M.u}$ donne la représentation graphique de l'équation de Van Deemter.

- c - Indiquer à quoi correspondent chacune des courbes $C_{S.u} = f(u)$, $C_{M.u} = f(u)$ ainsi que $B/u = f(u)$. (1,5 points)

La courbe $C_{S.u}$ résulte de la vitesse de transfert de masse de et vers la phase stationnaire.

La courbe $C_{M.u}$ provient d'une limitation de la vitesse de transfert de masse dans la phase mobile.

La courbe B/u est associée à la diffusion longitudinale.

- d - Dans quel cas l'efficacité de séparation sera optimale ? Comment visualise-t-on, concrètement, l'efficacité d'une séparation, donc d'une colonne, sur un chromatogramme ? (1 point)

La courbe $H = f(u)$ montre qu'il existe une vitesse d'écoulement optimale où H est minimale et l'efficacité de séparation maximale.

Concrètement, sur un chromatogramme, l'efficacité d'une colonne se voit lorsque les pics sont peu élargis.

Deux substances A et B étudiées par chromatographie liquide ont des temps de rétention de 8,32 et 10,75 minutes respectivement, sur une colonne de 30 cm de longueur. Une espèce non retenue passe dans cette colonne en 1,20 minute. La largeur à la base des pics est de 0,53 minute pour la substance A et de 0,68 minute pour la substance B.

4/ Donner la définition de la chromatographie. (0,5 point)

La chromatographie est une méthode analytique utilisée pour la séparation, l'identification ainsi que le dosage de constituants chimiques.

5/ Calculer la résolution R_s de la colonne. (0,5 point)

$$R_s = \frac{2(t_{RB} - t_{RA})}{w_A + w_B} = \frac{2(10,75 - 8,32)}{0,53 + 0,68} = 4,01$$

6/ Calculer le nombre moyen N de plateaux théoriques. (1 point)

$$N_A = 16 \cdot \left(\frac{t_{RA}}{w_A}\right)^2 = 16 \times \left(\frac{8,32}{0,53}\right)^2 = 3940$$

$$N_B = 16 \cdot \left(\frac{t_{RB}}{w_B}\right)^2 = 16 \times \left(\frac{10,75}{0,68}\right)^2 = 4000$$

D'où la valeur moyenne $N = 3970$

7/ En déduire la hauteur équivalente à un plateau théorique H . (0,5 point)

$$H = \frac{L}{N} = 75,6 \mu m$$

8/ Nous désirons réduire le temps de séparation des substances. Pourquoi pouvons-nous nous le permettre ? (0,5 point)

On peut réduire le temps d'analyse car la résolution est nettement supérieure à la valeur limite de 1,5.

9/ Sur quels critères est-il possible à priori de jouer pour réduire ce temps ? Vous préciserez dans quel sens faire varier ces critères. (1 point)

On peut diminuer la longueur L de colonne en gardant la même phase stationnaire.

On peut augmenter le débit.

On peut changer la composition de la phase mobile pour augmenter la force d'élution.

On peut changer le couple Phase mobile/Phase stationnaire.

10/ Calculer la longueur qui permet de séparer correctement les deux substances pour un temps minimum. Nous supposons que les facteurs de rétention k'_B et de sélectivité α ne varient pas lorsque la longueur de la colonne varie. (1 point)

On donne :

$$R_s = \frac{1}{4} \cdot \sqrt{N} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k'_B}{1 + k'_B}$$

Avant changement : $R_{S1} \propto \sqrt{N_{B1}}$

Après changement : $R_{S2} \propto \sqrt{N_{B2}}$

$$\frac{R_{S2}}{R_{S1}} = \sqrt{\frac{N_{B2}}{N_{B1}}} = \sqrt{\frac{\frac{L_2}{H_2}}{\frac{L_1}{H_1}}}$$

Or $H_1 = H_2$, car nous ne changeons pas de colonne, donc :

$$\left(\frac{R_{S2}}{R_{S1}}\right)^2 = \frac{L_2}{L_1} \Rightarrow L_2 = L_1 \cdot \left(\frac{R_{S2}}{R_{S1}}\right)^2 \Rightarrow L_2 = 30 \times \left(\frac{1,5}{4,01}\right)^2 = 4,2 \text{ cm}$$

FIN DE L'ÉPREUVE