

CAN 306

Techniques de séparation

Examen final

Date : Mardi 19 avril 2016

Local : D3-2034

Responsable : Pedro A. Segura

Heure : 9h-12h

Consignes :

- Aucune documentation n'est permise.
 - L'usage de calculatrice programmable est interdit.
 - L'annexe se trouve à la page 6.
 - Écrire vos réponses dans les pages 7-14.
-

1. **(20 points)** Le contenu du métal alcalino-terreux strontium (Sr) dans l'émail des dents est utilisé en archéologie pour étudier les migrations et les déplacements des humains préhistoriques ou historiques. Récemment, l'analyse des isotopes ^{87}Sr et ^{86}Sr a été effectuée sur deux dents d'un squelette découvert en 2012 et qui a été identifié comme celui de Richard III, roi d'Angleterre entre 1483 et 1485 [Lamb et al. (2014) *Journal of Archaeological Science* 50 : 559-565]. Ces analyses ont permis de confirmer que le contenu en Sr présent dans les dents de ce squelette concorde avec celui d'une personne ayant vécu durant son enfance dans l'ouest de l'Angleterre, comme Richard III.

Voici un résumé de la méthode d'analyse de Sr dans l'émail des dents :

La surface de l'émail disponible sur chaque dent a été abrasée à une profondeur de $> 100 \mu\text{m}$ en utilisant une fraise dentaire. Des tranches minces d'émail ont été ensuite coupées puis lavées dans l'acétone de haute pureté pour enlever les lipides et nettoyées par ultrasons dans l'eau de haute pureté. Les échantillons ont été ensuite pesés et placés dans des béchers en Téflon et dissous avec 8 M HNO_3 . Le strontium a été collecté avec des résines Dowex. La concentration de ^{87}Sr et ^{86}Sr a été ensuite déterminée par spectrométrie de masse atomique.

- Identifiez deux techniques de séparation utilisées pour l'analyse des métaux dans ce protocole et expliquez-les brièvement.
- Quel type de résine est Dowex (anionique, cationique) en sachant que le Sr en solution acide forme des ions $\text{Sr}(\text{II})$? Expliquez.
- Expliquez brièvement le fonctionnement d'un instrument de spectrométrie de masse atomique.
- Parmi les grades de HNO_3 suivants, lequel serait le plus adéquat pour cette expérience? Expliquez votre choix.

Tableau 1. Concentrations des métaux dans HNO₃ 70% chez Sigma-Aldrich.

Élément	ACS reagent (µg/kg)	Trace grade (µg/kg)	Ultra-trace grade (µg/kg)
Arsenic	≤ 10	≤ 0.5	≤ 0.1
Fer	≤ 200	≤ 5	≤ 0.1
Mercure	?	≤ 0.5	≤ 0.5
Cadmium	?	≤ 0.5	≤ 0.01
Strontium	?	≤ 0.5	≤ 0.01
Plomb	≤ 200	≤ 0.5	≤ 0.01

2. **(15 points)** La Figure 1 montre le chromatogramme d'un échantillon contenant un mélange de 10 anions obtenu par chromatographie ionique et détection par conductivité avec suppresseur.

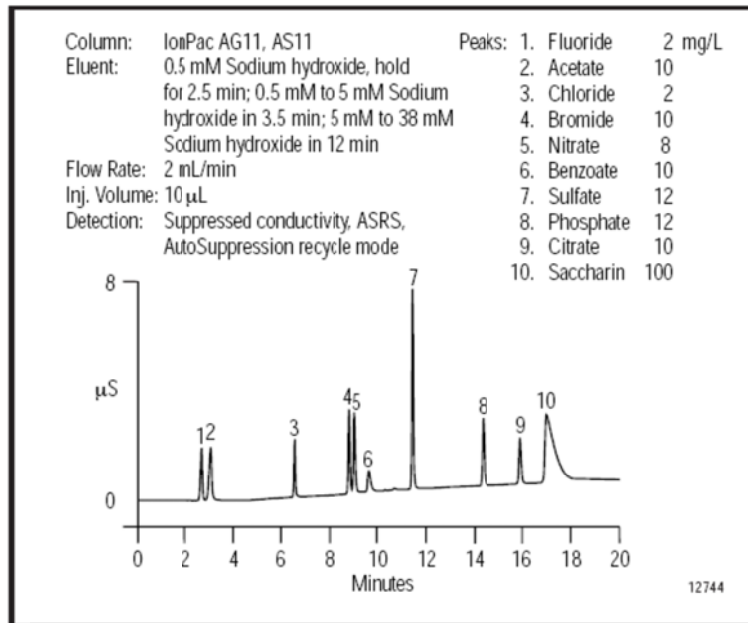
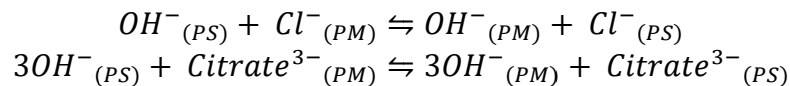


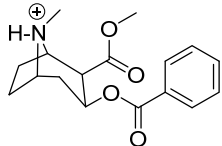
Figure 1. Conditions expérimentales : colonne IonPac AG11; phase mobile : gradient de concentration de NaOH (0.5mM à 38 mM) ; débit : 2 mL/min, volume d'injection : 10 uL. **Dans le suppresseur, Na⁺ est échangé contre H⁺.** Pics : 1) F⁻, 2) CH₃COO⁻, 3) Cl⁻, 4) Br⁻, 5) NO₃⁻, 6) C₆H₅COO⁻, 7) SO₄²⁻, 8) PO₄³⁻, 9) citrate (C₆H₅O₇³⁻) et 10) saccharine (C₇H₄NO₃S⁻).

- La séparation se fait-elle par échange anionique ou cationique? Expliquez.
- D'après la **Figure 1**, pour les deux réactions suivantes qui ont lieu dans la colonne chromatographique, laquelle est la plus déplacée vers la droite? Expliquez.

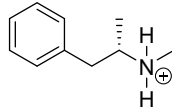


- Quel est l'avantage principal de la détection par conductivité avec suppresseur par rapport à la détection par conductivité directe (sans suppresseur)?

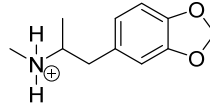
3. (25 points) La présence de faibles concentrations de composés pharmaceutiques dans l'environnement est un phénomène connu depuis plusieurs années. Ce type de contamination est préoccupant puisque les effets chroniques de ces substances sur les espèces aquatiques ne sont pas encore connus. Récemment, certaines drogues illicites (**Figure 2**) ont été détectées dans les eaux usées municipales au Canada à des concentrations de l'ordre du nanogramme par litre [Metcalfé C., *et al.* (2010) *Environmental Pollution* 158(10):3179-3185].



Cocaïne
pK_a=8.85



Méthamphétamine
pK_a=10.14



3,4-méthylènedioxy-
méthamphétamine
pK_a=10.14

Figure 2. Structures des drogues illicites ciblées par l'étude de Metcalfé *et al.* Les composés ont été dessinés sous leur forme protonnée.

Voici un résumé de la méthode utilisée pour extraire et analyser les drogues illicites des échantillons d'eau de rivière :

Extraction des analytes

Les échantillons d'eau de rivière ont été filtrés avec des filtres de fibre de verre de taille de pores de 1.5 µm. Avant l'extraction, le pH des échantillons a été ajusté à 3.0 avec l'acide sulfurique. Les sorbants des cartouches Oasis MCX ont été préparés pour l'extraction avec 6 mL de méthanol et 10 mL d'eau à pH 3.0. Ensuite, les échantillons d'eaux usées ont été introduits dans les cartouches à un débit de 10 mL/min. Une fois l'introduction de l'échantillon a été finie, les cartouches ont été rincées avec 10 mL d'eau et 3 mL de 5% méthanol dans l'eau. L'élution a été faite avec 2 × 3 mL de 5% hydroxyde d'ammonium dans le méthanol. Les échantillons ont été évaporés presque à sec et ensuite redissous avec une solution de 50% méthanol dans l'eau.

Analyse

Les analytes ont été séparés par chromatographie liquide à température de la pièce à un débit de 0.2 mL/min dans une colonne C₁₈. Un gradient d'élution a été utilisé pour séparer les analytes. La phase mobile était constituée de 0.1% d'acide formique dans l'eau (solvant A) et d'acétonitrile (solvant B). Le volume d'injection a été de 20 µL. La détection des analytes a été réalisée par un analyseur de spectrométrie de masse de type triple quadripôle en utilisant une source d'électronébulisation dans le mode positif.

- a. Quelle technique de séparation a été utilisée pour extraire les drogues illicites des eaux usées? Expliquez le principe de fonctionnement de cette technique.
 - b. Les cartouches MCX sont des cartouches polymériques de type échangeurs cationique fort. Justifiez l'utilisation de ce type de cartouche et les conditions d'extraction utilisées (ajustement de pH, solvant d'élution) en fonction des propriétés des analytes ciblés par cette étude.
 - c. Selon ce protocole, quel type de chromatographie liquide (ionique, phase inverse, phase normale, interaction hydrophile) a été utilisée? Justifiez votre réponse.
 - d. Le protocole indique qu'un gradient d'élution a été utilisé pour réaliser la séparation des analytes. Expliquez en quoi consiste ce mode d'élution et quels sont ses principaux avantages.
 - e. Décrivez brièvement le fonctionnement d'une source d'électronébulisation.
4. **(15 points)** En cherchant dans la littérature scientifique les techniques de séparation utilisées pour l'analyse de l'ibuprofène dans le plasma, un de vos collègues en trouve deux: la chromatographie en phase liquide et l'électrophorèse capillaire. En comparant l'électrophérogramme et le chromatogramme de la séparation de l'ibuprofène, il observe des différences importantes de la largeur des pics (dans les deux techniques, les pics ont des facteurs d'asymétrie < 1.2).

Chromatographie en phase liquide

Largeur du pic à la base=0.23 min, longueur de la colonne=15 cm, temps de rétention = 3.1 min.

Électrophorèse capillaire

Largeur du pic à la base=0.09 min, longueur du capillaire au détecteur = 60 cm, temps de migration = 5.8 min.

- a. Calculer la hauteur des plateaux théoriques du pic de l'ibuprofène obtenus avec ces deux techniques.
 - b. Expliquer la différence observée dans les valeurs de la hauteur des plateaux théoriques d'après l'équation de van Deemter.
5. **(25 points)** Le 24 septembre 1988, le sprinter Ben Johnson a gagné la médaille d'or au 100 mètres aux Jeux olympiques de Séoul. Deux jours plus tard, il a été annoncé que les échantillons d'urine du sprinter contenaient du stanozolol, un stéroïde anabolisant synthétique, et Johnson a été disqualifié par le Comité olympique international. La détection de stanozolol dans les échantillons de Johnson a été possible grâce au développement d'une nouvelle méthode d'analyse de ce stéroïde et de ses métabolites [Massé R., et al. (1989) *Journal of Chromatography B* 497:17-37] (**Figure 3**).

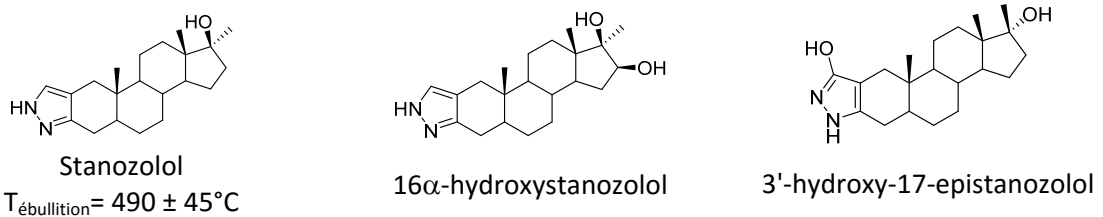


Figure 3. Structures du stanozolol et deux de ses métabolites urinaires

Voici un résumé de la méthode utilisée :

Extraction des stéroïdes

Un volume de 2 mL d'urine a été passé à travers de cartouches C_{18} Sep-Pak, préalablement conditionnées avec du méthanol et de l'eau, à un débit de 20 mL/min. Ensuite, la cartouche a été lavée avec 5 mL d'eau. Les stéroïdes ont été élués avec 5 mL de méthanol. L'éluat a été évaporé à sec sous un jet d'azote à 40 °C. Le résidu après évaporation a été dissout dans 1.0 mL de 0.2 M tampon acétate (pH 5.2) et les stéroïdes ont été extraits avec 5 mL d'éther diéthylique. Après évaporation du solvant, le résidu a été dérivé par silylation [hydrogènes liés à O ou N sont substitués par des groupements $-\text{Si}-(\text{CH}_3)_3$] et finalement 1 μL de la solution a été injecté dans un GC-MS.

Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

L'analyse a été effectuée dans un GC couplé à un spectrométrie de masse de type quadripôle. L'ionisation des analytes a été faite par impact électronique. La séparation chromatographique a été réalisée avec une colonne de type (diphényle) $_{0.05}$ -(diméthyle) $_{0.95}$ polysiloxane de dimensions (25m x 0.2mm diamètre interne, 0.33 μm épaisseur de film). Les injections ont été faites dans le mode sans division (splitless) en utilisant hélium comme gaz vecteur à un débit de 0.8 mL/min. La température de l'injecteur a été de 270 °C. La température du four a été programmée de la façon suivante : 0 min à 100 °C; 1 min à 100 °C; 8.5 min à 220 °C, 29.5 min à 300 °C, 39.5 à 300 °C.

- Quel est le rôle de l'étape de lavage à l'eau sur cette extraction par SPE? Expliquez.
- Pourquoi le méthanol a été utilisé comme solvant d'éluion? Expliquez.
- Pourquoi le stanozolol et ses métabolites ont été dérivés? Expliquez.
- Expliquez en quoi consiste le mode d'injection sans division (*splitless*).
- Pourquoi la programmation de la température a été utilisée dans cette séparation par GC? Expliquez en quoi consiste ce mode d'éluion et quels sont ses principaux avantages.

Annexe

$K' = \frac{[A^{x-}]^y_{résine} [E^{y-}]^x_{solution}}{[E^{y-}]^x_{résine} [A^{x-}]^y_{solution}}$	$\sigma_E^2 = \lambda L d_p$
$K_D = \frac{[A^{x-}]^y_{résine}}{[A^{x-}]^y_{solution}}$	$\sigma_L^2 = \frac{fL}{u}$
$D_{HA} = \frac{K[H^+]}{[H^+] + K_a}$	$\sigma_{TM}^2 = fL d_p^2 u$
$D_B = \frac{K K_a}{[H^+] + K_a}$	$\sigma_{totale}^2 = \sigma_E^2 + \sigma_L^2 + \sigma_{TM}^2$
$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{t'_R}{t_0}$	$H = \frac{(\sigma_E^2 + \sigma_L^2 + \sigma_{TM}^2)}{L}$
$\alpha = \frac{t_{R(2)}}{t_{R(1)}} = \frac{k_2}{k_1}$	$H = A + \frac{B}{u} + Cu$
<i>Note : $\alpha \geq 1$, alors $k_2 \geq k_1$</i>	
$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$	$\log k = \log k_w - S\phi$
$H = \frac{L}{N}$	$\phi_t = \phi_{t=0} + \left(\frac{\Delta\phi}{t_G} \right) t$
$P \approx \frac{2500L\eta F}{d_p^2 d_c^2}$	$pK_a = pH - \log \left(\frac{[A^-]}{[HA]} \right)$
<i>Note : P en psi, L en mm, F en mL/min, η en cP, d_c en mm et d_p en μm</i>	
$A_s = B/A$	$pK_a = pH - \log \left(\frac{[B]}{[BH^+]} \right)$
$N = \frac{41.7 \left(\frac{t_R}{W_{0.1}} \right)^2}{(B/A) + 1.25}$	$k = k^0(1 - F) + k^{\pm}F$
$R_s = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{k_2}{1 + k_2} \right) \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right)$	$\chi = \frac{1}{1 + 10^{(pK_a - pH)}}$
<i>Note : $k_2 = k$ du pic le plus retenu de la paire.</i>	
$R_s = \frac{2[t_{R(2)} - t_{R(1)}]}{W_1 + W_2}$	$\chi = \frac{1}{1 + 10^{(pH - pK_a)}}$
<i>Note : χ pour une base</i>	
$TF = (A + B)/2A$	$\mu_{app} = \mu_{ep} + \mu_{eo}$
<i>Unités de $\mu_{app} = m^2 V^{-1} s^{-1}$</i>	
$u_{eo} = \mu_{eo} E$	$u_{ep} = \mu_{ep} E$
$\mu_{app} = \frac{L_d L_t}{V t_{mig}}$	$\mu_{eo} = \frac{L_d L_t}{V t_{mig}(\text{neutre})}$
$\Delta G = \frac{(\lambda_{S+} - \lambda_{E+})}{10^{-3} K_{cell}} C_S$	$G = \frac{(\lambda_+ + \lambda_-)}{10^{-3} K_{cell}} C$
<i>Pour une séparation de type échange anionique, on utilise λ_{S-} et λ_{E-}.</i>	
$I = \frac{U}{R} = UG$	$\kappa = lG/A$
$\log k = a + \frac{b}{T}$	$N = \frac{\mu_{app} V}{2D}$
Conductances ioniques limites équivalentes des cations et anions (en $S \times cm^2 \times eq^{-1}$) en solution aqueuse à 25 °C : OH ⁻ : 198, Na ⁺ : 50.	

CAN 306
Techniques de séparation
Examen final

Nom, Prénom :

Question 1	/20
Question 2	/15
Question 3	/25
Question 4	/15
Question 5	/25
Total	/100

Réponses aux questions

CAN 306
Techniques de séparation
Examen final

Nom, Prénom :

CAN 306
Techniques de séparation
Examen final

Nom, Prénom :

CAN 306
Techniques de séparation
Examen final

Nom, Prénom :
