

Nom et prénom : _____

Date : Mardi 18 avril 2017

Local : D3-2040

Responsable : Pedro A. Segura

Heure : 9h00-12h00

Consignes :

- Les résumés écrits à la main des notes de cours sont permis.
- L'usage de calculatrice programmable est interdit.
- L'annexe se trouve aux pages 10 et 11
- Écrivez vos réponses dans les cases appropriées.

1. **(24 points)** L'analyse des explosifs dans les sols est importante pour identifier les sites ayant des mines terrestres actives et étudier les actes de terrorisme. Les sols sont des matrices complexes et il est nécessaire d'utiliser une étape d'extraction préparatoire afin de faciliter l'analyse et quantification des explosifs. En 2012, Holmgren *et al.* ont développé une méthode de quantification de TNT, 2,5-DNT et 1,4-DNB (Figure 1) entre autres utilisant l'extraction solide-liquide et l'analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

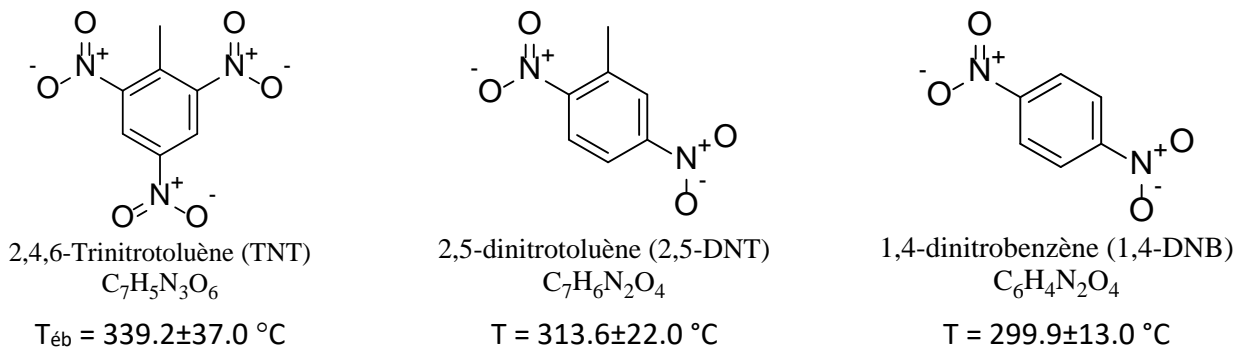


Figure 1. Structures moléculaires et température d'ébullition des explosifs. $T_{éb}$ indique la température d'ébullition estimée. Ces composés sont instables et vont exploser spontanément à des températures élevées.

Voici un résumé de leur méthode de séparation analytique :

Toutes les analyses ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse couplée à un détecteur de spectrométrie de masse. La colonne utilisée était une HP-5MSI (5% diphényle-95% diméthyle polysiloxane), de 30 m de longueur, 0.25 mm de diamètre, et une épaisseur de film de 0.25 μm . L'hélium a été utilisé comme gaz porteur. Des injections dans la colonne (on-column) ont été effectuées. La programmation du four a été la suivante : température initiale de 80 $^\circ\text{C}$ a été gardé constante pendant 3 minutes suivie d'une rampe de température de 5 $^\circ\text{C}$ par minute jusqu'à atteindre 125 $^\circ\text{C}$. Ensuite cette dernière température a été maintenue pendant 8 min et a été suivie d'une rampe de température de 5 $^\circ\text{C}$ par minute jusqu'à 210 $^\circ\text{C}$. Après, une rampe de température de 60 $^\circ\text{C}$ par minute jusqu'à 320 $^\circ\text{C}$ a été utilisée. Finalement cette dernière température a été maintenue durant 4 min. Le débit du gaz porteur a été de 1.3 mL/min.

- a. En sachant que les auteurs avaient H₂, N₂ et He parmi leurs choix de gaz porteur, expliquez l'utilisation de He (utilisez la Figure A1 comme support pour donner votre réponse).

- b. Les analytes sont normalement vaporisés dans l'injecteur chauffé à une haute température (≈350 °C) avant leur introduction dans la colonne. Dans cette méthode, des injections directement dans la colonne (*on-column*) ont été utilisées. Expliquez.

- c. Quel serait l'ordre d'élution des explosifs dans les conditions expérimentales utilisées ? Expliquez.

- d. Expliquez pourquoi il est avantageux d'utiliser la programmation de la température en GC pour éluer les analytes de la colonne ?

Nom et prénom : _____

2. (24 points) Les buckminsterfullerènes (C_{60}) et son dérivé le *N*-méthylfullero-pyrrolidine C_{60} (Figure 2) sont utilisés dans les produits de soin personnel et la synthèse de nouveaux matériaux biologiquement actifs. Leur utilisation dans les produits de consommation humaine est controversée puisque ces substances ont un potentiel de bioaccumulation et de toxicité environnementale. Pour cette raison, il est important de développer des méthodes d'analyse de ces substances dans l'environnement. Farré et al. ont publié en 2014 une méthode d'analyse de trois fullerènes dans la matière en suspension des eaux usées.

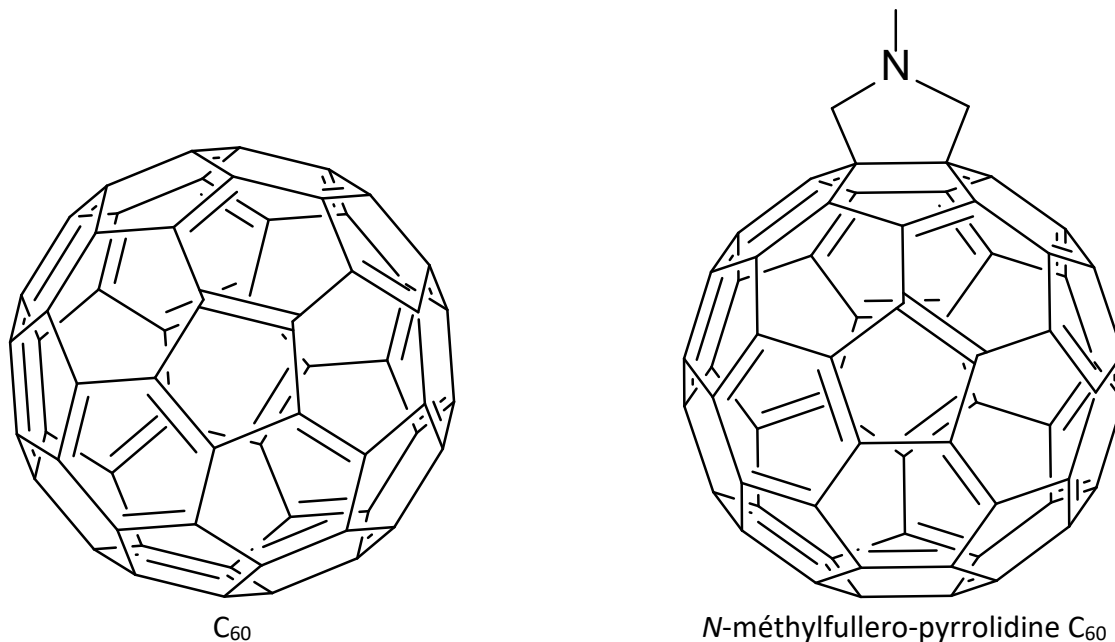


Figure 2. Structures moléculaires des molécules ciblées dans l'étude de Farré *et al.*

Voici un résumé de leur méthode de séparation analytique :

La séparation chromatographique a été réalisée avec une colonne C_{18} Purospher Star RP-18 avec des silanols protégés (endcapped) de 125 de largeur, 2.0 mm de diamètre interne et taille de particules de 5 μm . Les analytes ont été élués de façon isocratique, en utilisant une phase mobile constituée d'un mélange toluène-méthanol (1:1, v/v) avec un débit de 0.4 mL/min. Le volume d'injection était de 150 μL .

La méthode d'analyse développée a été appliquée à l'analyse des fullerènes dans les effluents de 22 stations d'épuration en Catalogne (Espagne). 50% des échantillons analysés contenaient des fullerènes, dont neuf dans la gamme de concentration du microgramme par litre (1 à 66 $\mu\text{g/L}$).

- a. Les auteurs n'ont pas utilisé une phase mobile classique de chromatographie en phase inverse (eau et acétonitrile ou méthanol) pour séparer ces analytes. Expliquez ce choix.

- b. Supposez que vous voulez aussi séparer le C_{70} . Dans ces conditions expérimentales, le temps de rétention du *N*-méthylfullero-pyrrolidine C_{60} était de 2.62 min et celle de C_{60} 2.94 min. Le temps de rétention de C_{70} devrait être inférieur ou supérieur à ces valeurs ? Expliquez.

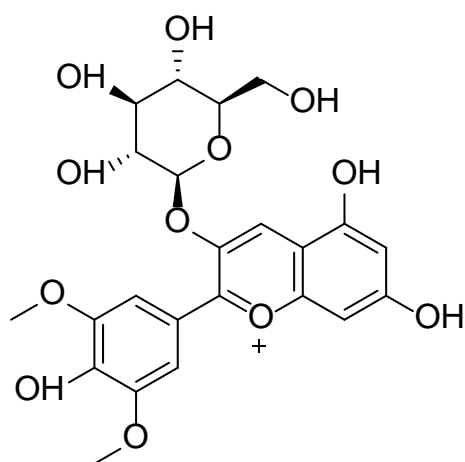
- c. Calculez la résolution et le nombre de plateaux théoriques de deux pics de la question b, en sachant que la largeur du pic de *N*-méthylfullero-pyrrolidine C_{60} était de 0.18 min et celle de C_{60} de 0.17 min. Les pics étaient approximativement gaussiens.

- d. Vous aimeriez optimiser cette méthode de séparation avec une colonne plus courte. La résolution entre les pics de C_{60} et *N*-méthylfullero-pyrrolidine C_{60} serait-elle adéquate avec une colonne de 50 mm de longueur, 2.0 mm de diamètre interne et taille de particules de 5 μm et en utilisant les mêmes conditions expérimentales ? Expliquez.

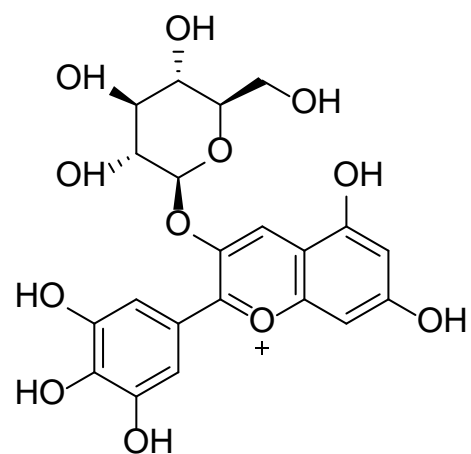
Nom et prénom : _____

3. (24 points) La couleur du vin rouge jeune est due majoritairement à la présence des anthocyanines des raisins. On croit que durant l'étape de maturation et le processus de vieillissement, les anthocyanines (Figure 3), les catéchines, proanthocyanidines et autres composantes organiques du vin réagissent ensemble pour former des pigments polymériques polyphénoliques. Ce processus pourrait être responsable de la stabilisation de la couleur et réduction de l'amertume du vin. Saenz-Lopez *et al.* ont publié en 2004 un article sur l'analyse de pigments des vins rouges par électrophorèse capillaire de zone (CZE). Voici un résumé de la méthode utilisée :

Avant l'injection, le capillaire a été lavé avec une solution de 0.1 M NaOH, H₂O ultra-pure et ensuite avec une solution tampon de 50 mM Na₂B₄O₇ et 15% MeOH (v/v) à pH 8.4 [Cette dernière solution est le tampon de la séparation]. Le capillaire utilisé avait une longueur de 46 cm et un diamètre interne de 75 μm. Le voltage appliqué était de 25 kV et la température a été contrôlée à 10 °C.



Malvidine-3-O-glucoside
pK_a (phénol) : 6.38, 7.42, 8.06



Delphinidine-3-O-glucoside
pK_a (phénol) : 6.37, 7.14, 7.77, 11.23, 11.97

Figure 3. Structures moléculaires de deux anthocyanines libres identifiées dans les échantillons.

Les auteurs ont observé une diminution des anthocyanines libres dans les vins vieilliss. Par contre des composés ayant des temps de migration plus élevés que ceux des anthocyanines libres ont été observés dans les vins vieilliss. Par exemple dans un vin jeune, la malvidine-o-glucoside et la delphinidine-o-glucoside (Figure 3) ont donné des pics de signal élevé ayant des temps de migration de 9.9 et 12.0 min, respectivement. Dans le vin *Gran Reserva*, 11 ans plus vieux que le vin précédant, ces anthocyanines libres n'étaient pas détectables, mais des pics importants étaient présents entre 18 et 20 min de temps de migration.

Ces résultats ont suggéré la formation pigments polymériques polyphénoliques causée par le vieillissement des vins. Une corrélation forte ($R^2=0.74$) entre la somme des aires des pics des pigments polymériques et l'âge des vins a été calculée par les auteurs.

- a. Expliquez pourquoi il est important de laver le capillaire avec NaOH, H₂O et le tampon avant l'injection.

- b. Quel serait l'effet sur la séparation de l'utilisation d'un tampon de pH=4.0 ?

- c. Expliquez la différence observée entre les temps de migration de la malvioldine-o-glucoside et la delphinidine-o-glucoside.

- d. Pourquoi l'apparition des pics ayant des temps de migration entre 18 et 20 min suggère la formation des composés polymériques polyphénoliques ?

Nom et prénom : _____

4. (20 points) Les vitamines solubles dans l'eau sont un ensemble de composés ayant une gamme de polarité assez large (Figure 4). À cause de leur importance en nutrition et leur instabilité, il est important d'utiliser des méthodes d'analyse fiables, rapides et sensibles. Karatapanis et al. ont publié en 2009 une méthode d'analyse de 6 vitamines hydrosolubles par HILIC couplé à la détection par UV. Voici un extrait de la méthode utilisée :

L'analyse par chromatographie liquide a été réalisée avec une colonne de phase stationnaire diol (150 × 4.6 mm, 5 μm). La détection a été réalisée par absorption UV avec un détecteur à barrette de diodes. La phase mobile était constituée d'un mélange du solvant A (acétonitrile) et B (acétate d'ammonium 10 mM à pH=5 dans H₂O). Le débit de la phase mobile était de 0.6 mL/min.

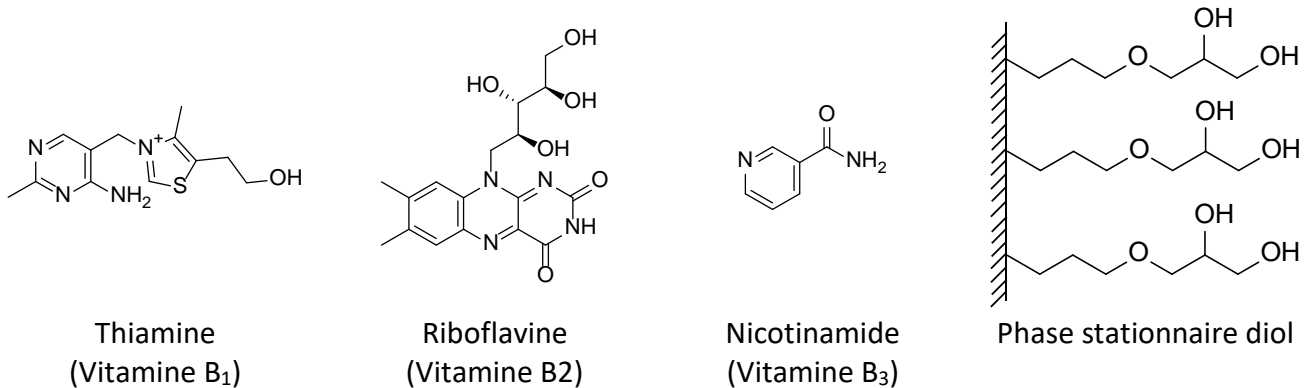


Figure 4. Structures moléculaires de 3 vitamines hydrosolubles ciblées dans l'étude de Karatapanis *et al.* et représentation de la phase stationnaire diol greffée sur la paroi d'une particule de silice.

Durant l'optimisation de la méthode, les auteurs ont observé les chromatogrammes suivants (Figure 5):

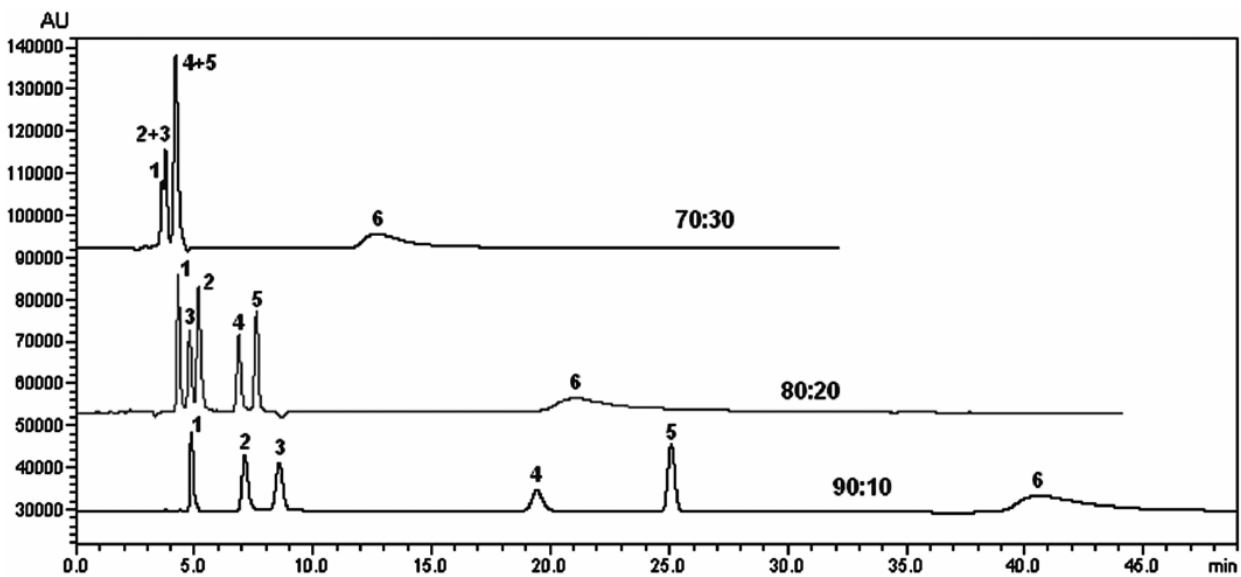


Figure 5. Effet de la composition de la phase mobile (solvant A : solvant B) sur la rétention des vitamines hydrosolubles. Identification des pics : nicotinamide (1), riboflavine (3), thiamine (6).

- a. Les auteurs ont testé différents solvants organiques (acétonitrile, méthanol, isopropanol et tétrahydrofurane) et ont observé que la rétention des analytes avec des phases mobiles constituées de 10% (v/v) du solvant B et 90% (v/v) de méthanol ou isopropanol était faible par rapport à la rétention obtenue avec 10 % (v/v) du solvant B et 90 % (v/v) d'acétonitrile ou tétrahydrofurane. Expliquez cette observation.

- b. Expliquez l'effet du changement de la composition de la phase mobile sur la rétention des analytes (Figure 5).

- c. Les auteurs ont observé qu'une phase mobile composée de 90 % (v/v) du solvant A et 10% (v/v) du solvant B donnait des pics ayant des facteurs d'asymétrie entre 1 et 1.7 pour tous les analytes sauf thiamine qui avait un facteur d'asymétrie supérieur à 2.5. Ces valeurs sont-elles acceptables ? Expliquez.

- d. Proposez une approche pour diminuer le temps et augmenter la sensibilité de cette analyse. Expliquez votre choix.

Nom et prénom : _____

5. (8 points) Encerchez la lettre qui correspond à la réponse correcte :

1. Pourquoi le CO₂ est-il souvent utilisé comme phase mobile (PM) en chromatographie en phase supercritique :

- a) Point critique faible b) Absorbe dans l'UV c) Fluide polaire d) Toutes ces réponses

2. D'après la figure suivante, quelle technique parmi la HPLC et la chromatographie en phase supercritique (SFC) permet de réaliser des séparations plus rapides avec une efficacité supérieure ?

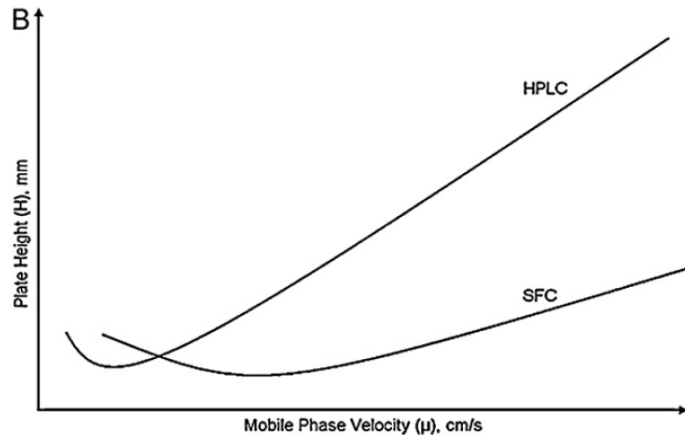


Figure 6. Graphique de van Deemter montrant la variation d'h en fonction de la vitesse linéaire de la phase mobile.

- a) LC b) SFC c) Même rapidité et efficacité pour les deux

3. Quel facteur peut expliquer les différences observées entre HPLC et SFC illustrées à la Figure 6 ?

- a) Nature de la phase stationnaire b) Diminution de la diffusion d'Eddy c) Amélioration de la rétention d) Amélioration du transfert de masse

4. Les pressions en SFC sont plus faibles que celles observées en HPLC pour des débits et colonnes identiques. Comment peut-on expliquer cela ?

- a) Différences de viscosité de la phase mobile b) Différences de diffusion d'Eddy c) Différences de transfert de masse d) Toutes ces réponses

5. Les gradients de pression de la PM sont utilisés en SFC de façon similaire aux gradients de composition de la phase mobile en HPLC. Pourquoi ?

- a) La masse volumique d'un fluide supercritique augmente avec la pression. b) L'augmentation de la masse volumique de la PM diminue le facteur de rétention. c) La diminution de la pression diminue le pouvoir d'élution de la PM d) Toutes ces réponses

Annexe

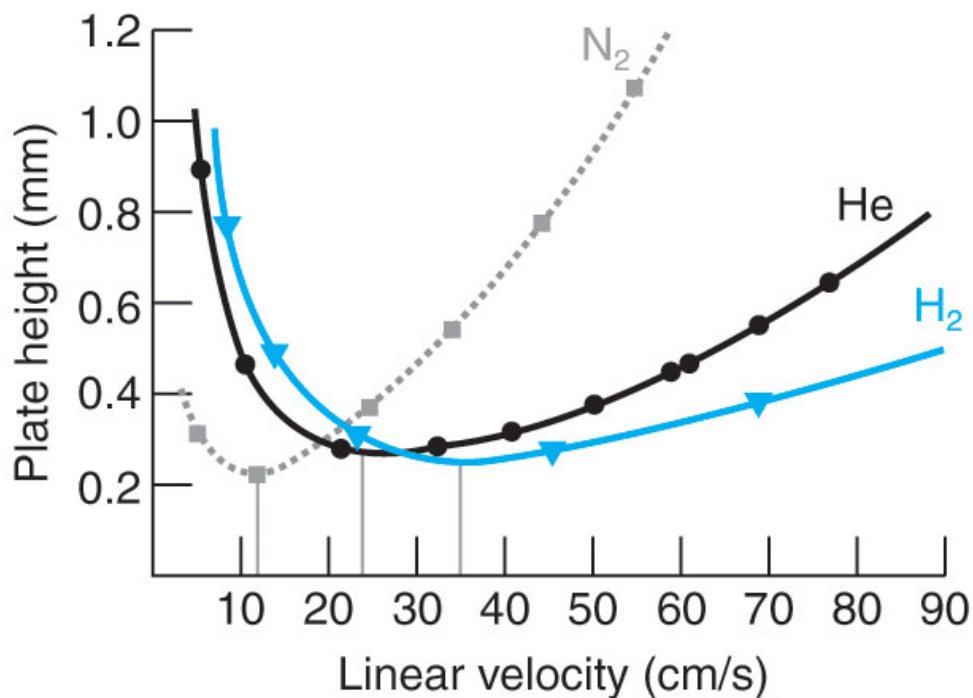


Figure A1. Graphique de van Deemter montrant l'effet du type de gaz porteur sur H.
 Référence : Harris D. C. (1999) Quantitative Chemical Analysis. New York, USA: W. H. Freeman & Co., 900 p.

Table A1. Solubilité de C₆₀ dans plusieurs solvants

Solvant	Solubilité (g/L)
Acétone	0.001
Chlorobenzène	7.0
Eau	7.96×10^{-9}
Éthanol	0.001
Hexane	0.043
Toluène	2.8

Référence : R. S. Ruoff et al. (1993) *J. Phys. Chem.*, 97 : 3379-3383; C. T. Jafvert, P. P. Kulkarni (2008) *Environ. Sci. Technol.*, 42 : 5945-5950.

Nom et prénom :

$\frac{[A^{x-}]^y_{résine} [E^{y-}]^x_{solution}}{[E^{y-}]^x_{résine} [A^{x-}]^y_{solution}}$	$\sigma_E^2 = \lambda L d_p$
$K_D = \frac{[A^{x-}]^y_{résine}}{[A^{x-}]^y_{solution}}$	$\sigma_L^2 = \frac{fL}{u}$
$D_{HA} = \frac{K[H^+]}{[H^+] + K_a}$	$\sigma_{TM}^2 = fL d_p^2 u$
$D_B = \frac{K K_a}{[H^+] + K_a}$	$\sigma_{totale}^2 = \sigma_E^2 + \sigma_L^2 + \sigma_{TM}^2$
$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{t_R}{t_0}$	$H = \frac{(\sigma_E^2 + \sigma_L^2 + \sigma_{TM}^2)}{L}$
$\alpha = \frac{t_{R(2)}}{t_{R(1)}} = \frac{k_2}{k_1}$ <i>Note : $\alpha \geq 1$, alors $k_2 \geq k_1$</i>	$H = A + \frac{B}{u} + Cu$
$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$	$\log k = \log k_w - S\phi$
$H = \frac{L}{N}$	$\phi_t = \phi_{t=0} + \left(\frac{\Delta\phi}{t_G} \right) t$
$P \approx \frac{2500L\eta F}{d_p^2 d_c^2}$ <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>	$pK_a = pH - \log \left(\frac{[A^-]}{[HA]} \right)$
$A_s = B/A$	$pK_a = pH - \log \left(\frac{[B]}{[BH^+]} \right)$
$N = \frac{41.7 \left(\frac{t_R}{W_{0.1}} \right)^2}{(B/A) + 1.25}$	$k = k^0(1 - F) + k^\pm F$
$R_s = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{k_2}{1 + k_2} \right) \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right)$ <i>Note : $k_2 = k$ du pic le plus retenu de la paire.</i>	$\chi = \frac{1}{1 + 10^{(pK_a - pH)}}$ <i>Note : χ pour un acide</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>
$m = \frac{K_{fs} V_f V_s}{K_{fs} V_f + V_s} C_0$	$\mu_{app} = \mu_{ep} + \mu_{eo}$ <i>Unités de $\mu_{app} = m^2 V^{-1} s^{-1}$</i>
$u_{eo} = \mu_{eo} E$	$u_{ep} = \mu_{ep} E$
$\mu_{app} = \frac{L_d L_t}{V t_{mig}}$	$\mu_{eo} = \frac{L_d L_t}{V t_{mig}(\text{neutre})}$
$\Delta G = \frac{(\lambda_{S+} - \lambda_{E+})}{10^{-3} K_{cell}} C_S$ <i>Pour une séparation de type échange anionique, on utilise λ_{S-} et λ_{E-}.</i>	$G = \frac{(\lambda_+ + \lambda_-)}{10^{-3} K_{cell}} C$
$V_0 \approx 5 \times 10^{-4} L d_c^2$ <i>L: longueur de la colonne (en mm), d_c: diamètre interne de la colonne (en mm). V_0: volume mort en mL.</i>	$V_0 = F t_0$
$\log k = a + \frac{b}{T}$	$N = \frac{\mu_{app} V}{2D}$