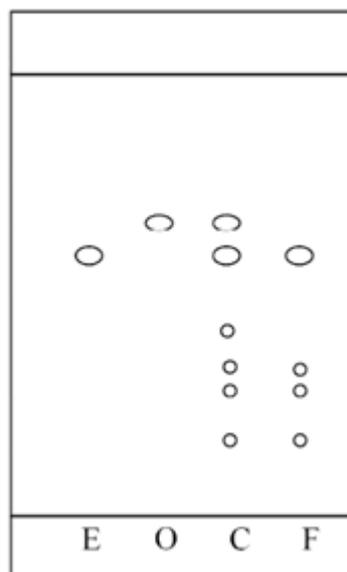


Fiche TD 1 « Chromatographie »
CCM – Exclusion - CPG - HPLC

Exercice 1 : Chromatographie sur couche mince

Sur une plaque CCM en silice, nous effectuons les dépôts de quatre solutions dans le dichlorométhane : l'eugénol (E), l'acétate d'eugényle (O), l'essence de girofle (C) et l'essence de giroflier (F). L'éluant est le toluène. Après révélation, nous obtenons le chromatogramme donné par la figure ci-après.

- 1- Discuter la composition des deux essences (C) et (F).
- 2- Indiquer, parmi les deux composés (E) et (O), celui qui est le plus polaire dans l'éluant utilisé. Justifier votre réponse. Calculer son rapport frontal.
- 3- Que devient ce R_F si on utilise un éluant plus polaire ?



Exercice 2 : Chromatographie d'exclusion

A- On détermine les temps de rétention (t_r) de quelques protéines, dont on connaît les masses moléculaires (MM), par une chromatographie d'exclusion. Le débit est de **5 ml / min**.

	Dextran	Fibrinogène	Catalase	Lactoglobuline
MM (Da)	2000000	340000	230000	19000
t_r (min)	7	12	15	26,4
V_e (ml)				

- 1 - Rappeler à quoi correspond le Dalton et donner un autre nom à cette chromatographie.
- 2- Porter le $\log(MM)$ en fonction du volume d'élution V_e . Discuter.
- 3- L'élution d'une protéine P donne un volume d'élution $V_e = 113$ ml. Déterminer sa MM.
- 4- Comment se manifeste un composé exclu sur la courbe $\log(MM) = f(V_e)$.

Exercice 3 : Chromatographie CPG

Les mycotoxines sont des molécules toxiques libérées par les moisissures. L'analyse par CPG des deux mycotoxines, nivalénol et déoxynivalénol, conduit à :

Colonne capillaire : 10 m x 0.53 mm	Température : 260°C
Débit : 1.2 ml/min, Vitesse linéaire : $\mu = 544.2$ cm/min	Gaz vecteur N_2 , Détecteur FID
ω (nivalénol) = 0.167 min	ω (deoxynivalénol) = 0.176
t_r (nivalénol) = 3.9 min	t_r (deoxynivalénol) = 4.1 min

- 1- Calculez le temps mort (min) et le volume mort (mL).
- 2- Calculez le facteur de sélectivité α entre les deux solutés analysés.
- 3- Calculez le facteur de résolution R_s dans ces conditions d'analyse. Discuter.
- 4-Quelle colonne, de même diamètre et même phase stationnaire, faudrait-il-utiliser pour obtenir la séparation du nivalénol et du déoxynivalénol avec une résolution de 1,5. R_s est proportionnel à la racine de L (L étant la longueur de la colonne). Question pour étudiant.

Exercice 4 : Chromatographie HPLC

Les conditions opératoires pour une analyse HPLC sont les suivantes :

Longueur de la colonne 10cm	Température : 20°C
Débit : 1ml/mn	Teneur en méthanol : 35%
Pression en tête de la colonne : 69 10 ⁵ Pa	Temps mort : 41s

Le tableau des résultats est le suivant :

Nom du soluté	Largeur à mi-hauteur (s)	Temps de rétention (s)
Uracile (a)	10,9	69
Phénol(b)	13,1	182

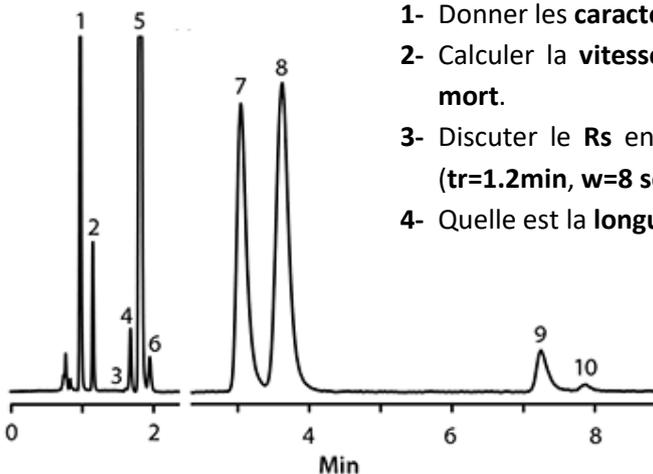
Déterminer :

- 1- Les temps de rétention réduit t_r' et les facteurs de capacité (facteur de rétention) k' .
- 2- Le nombre de plateaux théoriques N_{th} (efficacité).
- 3- La hauteur équivalente à un plateau théorique **Hept**.
- 4- Le facteur de séparation (facteur de sélectivité) α , le facteur de résolution **Rs**.

Exercice 5 : Chromatographie HPLC

Une boisson énergétique est analysée par **chromatographie liquide haute performance**, utilisant une colonne type Ascentis HILIC, **10 cm x 2,5 mm** avec une phase mobile acétate ammonium – eau – acétonitrile. La quantité injectée est 2 μ L, le **débit** utilisé est de **0,6 mL/min**, la température du four est de 35°C et le détecteur est de type UV à 254 nm.

Le chromatogramme révèle **10 pics** traduisant la présence de la **caféine**, des **sucres**, des **conservateurs** et des **vitamines** inclus dans la boisson énergétique.



- | | |
|---|---|
| 1. Caffeine | 6. Riboflavin (vitamin B ₂) |
| 2. Niacinamide (vitamin B ₃) | 7. Fructose |
| 3. Pyridoxine hydrochloride (vitamin B ₆) | 8. Glucose |
| 4. Benzoic acid | 9. Sucrose |
| 5. Sorbic acid | 10. Taurine |

1- Donner les **caractéristiques** des détecteurs FID et TDC.

2- Calculer la **vitesse linéaire** de la phase mobile et en déduire le **temps mort**.

3- Discuter le **Rs** entre la **Caféine** ($t_r=1\text{min}$, $w=10\text{ sec}$) et la **Niacinamide** ($t_r=1.2\text{min}$, $w=8\text{ sec}$).

4- Quelle est la **longueur de la colonne** qu'il faut utiliser pour atteindre une

5- Calculer le **facteur de sélectivité** entre les trois sucres **Fructose** (3.1min), **Glucose** (3.75min) et **Sucrose** (7.3min). **Discuter**.

6- Donner le **nombre de plateaux théoriques** de la colonne estimée par le pic de la **Caféine**.

Applications pour étudiant

Exercice 1

Nous étudions la séparation de trois composés par chromatographie haute performance. L'expérience a lieu à **20 °C** avec une pression en tête de colonne de **49.105 Pa**. Le débit de la phase mobile est de **1 mL.min⁻¹** et la longueur de la colonne est de **15 cm**. La phase mobile traverse la colonne dans **41 s**. La séparation chromatographique a donné les résultats présentés dans le tableau ci-dessous: Résultats de la séparation par **HPLC** de trois composés.

Composés	t _R (min)	w (min)
Toluène	1,83	0,14
Diéthylphtalate	2,62	0,34
Diméthylphtalate	3,23	0,42

- 1- Quel est le **principe** de la chromatographie ?
- 2- Calculer la **vitesse linéaire moyenne** de la phase mobile.
- 3- Calculez le **facteur de rétention** et le **nombre de plateaux théoriques**.
- 4- Calculez les **facteurs de sélectivité** et de **résolution**.

Exercice 2

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse de deux composants **A** et **B** conduit à la détermination des temps de rétention : **A : 3,9 min ; B : 4,1 min**.

La colonne utilisée présente la même efficacité vis-à-vis des deux solutés **N_{th} = 8671**.

Conditions : - Colonne **capillaire** OPTIMA 1701, e_f 0,35µm, **10m x 0,53mm** ; - Injection : 1µL ; - Gaz vecteur : N₂, débit **1.2mL/min** ; - Température : 260°C ; - Détecteur : **FID**.

- 1- Donner le **principe** et la **différence** entre les détecteurs **FID** et **TDC**.
- 2- Calculez le **temps mort (min)** et le **volume mort (mL)**.
- 3- Calculez le **facteur de sélectivité** entre les deux solutés analysés.
- 4- Calculez le **facteur de résolution** dans ces conditions d'analyse. **Discuter**.
- 5- Quelle colonne, de même diamètre et même phase stationnaire, faudrait-il-utiliser pour obtenir la séparation du Composé **A** et **B** avec une **résolution de 1,5** et un temps d'analyse minimal.