

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

Exercice 01 :

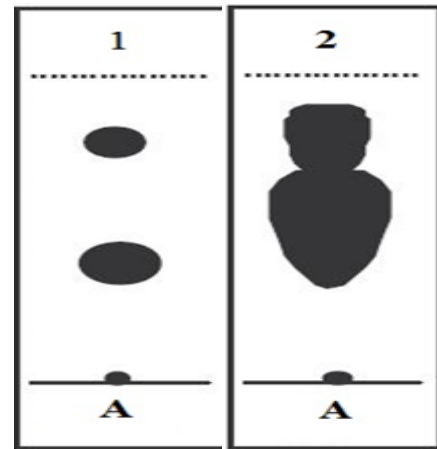
A) On a réalisé la chromatographie de deux échantillons (A et B) et d'une référence (M). L'exploitation du chromatogramme a donné les résultats suivants :

- Front du solvant H= 8,0cm

- échantillon A : deux taches situées à 3,0 cm et 4,0 cm de la ligne de base, échantillon B une tache située à 5,0 cm de la ligne de base et la référence M (menthol): $R_f = 0,5$.

- Faire le schéma du chromatogramme.
- La chromatographie a-t-elle mis en évidence des espèces chimiques pures.
- Les échantillons A et B renferme-t-il du menthol ?

B) Sur deux plaques **CCM** en **silice**, nous effectuons les dépôts du produit (A). Dans la 1^{ère} plaque, le dépôt du produit (A) est dilué dans un solvant par contre le dépôt dans la 2^{ème} plaque est non dilué (concentré). Les CCM obtenues après éluions sont représentées ci-après.



- Quelle est la meilleure plaque ? Pourquoi ?
- Discuter la composition du produit (A) ?
- Calculer le rapport frontal pour les deux plaques. Conclure ?

Exercice 02 :

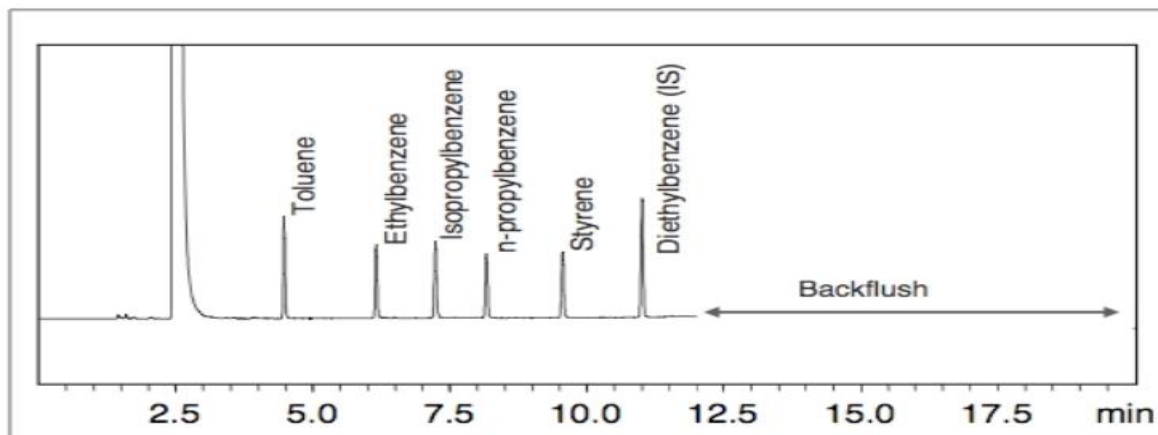
On détermine les temps de rétention (t_r) au cours d'une chromatographie sur colonne, des protéines suivantes dont on connaît la masse moléculaire (MM) (Le débit de la colonne est de 5 ml / min) :

Protéines	MM	t_r (min)
Aldolase	145000	10,4
Lactate déshydrogénase	135000	11,4
Phosphatase alcaline	80000	18,4
Ovalbumine	45000	26,2
Lactoglobuline	37100	28,6

- Calculer les volumes d'éluion (V_e) correspondants. Porter le log de MM en fonction de V_e - Que remarquez-vous ?
- Pour la glucokinase, $t_r = 21$ min. Déterminer sa masse moléculaire ?

Exercice 03 :

Un mélange de produits est analysé par chromatographie sur une Colonne de type (RTX-Wax (30mx0.25mm ID, df=0.5um), le résultat obtenu est donné par le chromatogramme suivant :



- À quoi correspondent les abréviations données entre parenthèses, à côté du nom commercial de la colonne ?
- À quoi correspond le pic situé à un temps de rétention de 2,5 min ?
- Calculer les facteurs de capacité de chaque composé.
- Calculer les facteurs de sélectivité des composés et commenter.

Exercice 04 :

Nous étudions la séparation de trois composés sur une phase stationnaire en silice greffée NH₂. 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. Le temps mort est de 41 s. La séparation chromatographique a donné les résultats présentés dans le tableau ci-dessous :

Nom du soluté	Temps de rétention tr (min)	Largeur à mi-hauteur w _{1/2} (min)
toluène	1,83	0,08
diéthylphtalate	2,62	0,20
diméthylphtalate	3,23	0,25

- Quel est le mode de séparation chromatographique utilisé ?
- Calculer la vitesse linéaire moyenne de la phase mobile.
- Calculer pour chaque composé : Le facteur de rétention k' et le nombre de plateaux théoriques.
- Calculer le facteur de sélectivité.
- Les composés sont-ils correctement séparés ? Justifiez votre réponse.

Exercice 05 : Pour étudiant

Plusieurs injections du même mélange de composés sont effectuées en isotherme, à des températures différentes sur la même colonne.

- A 120°C le composé **X** qui nous intéresse sort à 15,2 min, le t_m est de 0,2 min et à 150°C, ce même composé sort à 10,1 min, le t_m est de 0,17 min.
- Suite à l'interprétation de plusieurs chromatogrammes, il semble que la température de travail la plus adaptée pour séparer les composés qui nous intéressent soit de 132°C.
- A quel temps de rétention (t_r) devrait sortir le composé X, si $t_m = 0,19$ min ?

$$\ln(t'_r) = \frac{A}{T} + B$$

Exercice 6 : Pour étudiant

- L'analyse des sucres (**saccharose, glucose et fructose**) présents dans un jus d'orange est réalisée au moyen d'une chromatographie équipée d'une colonne de **15 cm** de longueur. La phase stationnaire est une phase apolaire de porosité de 0,5 et diamètre de particule d_p de 5 μ m. La phase mobile est composée d'un mélange acétonitrile/eau, son débit est de **1 mL.min⁻¹**. Le volume injecté est 100 μ L.
- Le chromatogramme obtenu est schématisé sur la **figure 1 (A)**.

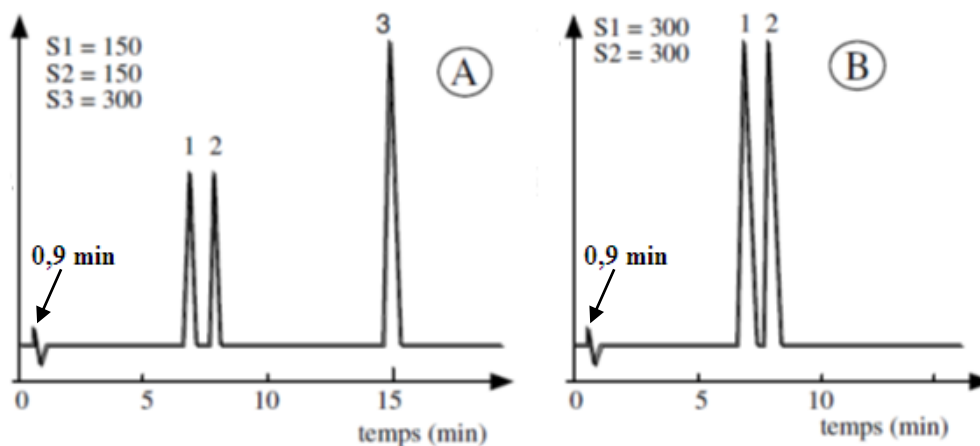


Figure 1 : Chromatogrammes de : (A) jus d'orange et (B) jus d'orange traité à l'invertase.

- Après une action de l'**invertase** sur le jus d'orange, le saccharose s'hydrolyse et se transforme en glucose et fructose. Le chromatogramme correspondant, obtenu dans les mêmes conditions analytiques, est représenté sur la **figure 1 (B)**. (**S** est la surface relative des pics).
- Quelle est le **type** de chromatographie et la **nature** de la phase utilisée ?
- Déterminer la nature du composé indiqué par le **pic 3** sur la **figure 1 (A)**. Donner sa **masse relative** par rapport aux deux autres composés. **Justifier** votre réponse.
- Sachant que le fructose est plus polaire que le glucose, donner l'**ordre d'élution** des trois composés **1, 2** et **3**. **Justifier** votre réponse.
- Déterminer la **vitesse linéaire**. En déduire le **diamètre interne** de la colonne.
- Quelle est la valeur du **facteur de capacité** du composé (**3**).