



TD N°1 (Généralité)

Exo1

On s'oriente vers l'utilisation d'une colonne capillaire de 20 mètres de long et de 0,25 mm de diamètre intérieur dont l'efficacité d'imprégnation est telle que la HEPT est égale à 3,2 fois le rayon de la colonne, la vitesse de phase mobile étant de $40 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$.

Quelle devra être la sélectivité de la colonne si l'on veut avoir une bonne séparation entre A et B, avec un temps de rétention de 5,0 mn pour le composé le plus retenu (B) ?

Exo2

La méthode la plus connue d'estimation du temps mort t_M consiste à mesurer le temps de rétention d'un composé non retenu (couramment le méthane en CPG). On propose ici une autre méthode faisant appel à la relation utilisée dans l'établissement des indices de rétention, à savoir que dans une série homologue de composés organiques on peut écrire, si la température de la colonne ne varie pas :

$$\log(t_r - t_M) = a \cdot n + b$$

t_r représente le temps de rétention du composé à n atomes de carbone, a et b sont des constantes qui dépendent de la classe des solutés et de la phase stationnaire choisie.

Calculer t_M à partir de l'expérience suivante : on injecte un mélange d'alcane linéaires à 6, 7 et 8 atomes de carbone. Les temps de rétention sont respectivement 271, 311 et 399 s en régime isotherme à 80°C .

Exo3

Une colonne tubulaire ouverte utilisée pour la séparation d'un mélange a un diamètre intérieur de 0,25 mm. On utilise une vitesse d'écoulement volumétrique de 1,0 mL/min. Calculer la vitesse d'écoulement linéaire en cm/s à la sortie de la colonne.

Exo4

Les coefficients de l'équation de Van Deemter sont déterminés à :

$$A = 10^{-3} \text{ cm}, B = 0,144 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}, C = 10^{-3} \text{ s}$$

- Quelle est la vitesse linéaire moyenne de la phase mobile qui minimise la hauteur d'un plateau théorique ?
- Quel serait la hauteur minimale équivalente à un plateau théorique de la colonne ?



TD N°2 (CPG)

Exo1

Deux espèces chimiques, A et B sont séparées par chromatographie gazeuse isotherme, à l'aide d'une colonne de 2,00 m ayant 5000 plateaux théoriques au débit de 15,0 ml/min.

Le pic de l'air non absorbé apparaît au bout de 30 s ; le pic de A apparaît au bout de 5 min et celui de B au bout de 12 min.

- Calculer le volume mort V_M de la colonne, et les volumes de rétention V_A et V_B ?
- Calculer les volumes réduits V'_A et V'_B ?
- Calculer les coefficients de rétention k'_A et k'_B ?
- Quelles sont les largeurs à la base des pics A et B ?
- Quelle est la valeur de H pour cette colonne ?
- Déterminer la valeur de la sélectivité de cette séparation ?
- Calculer la résolution R de la séparation ?
- Commenter brièvement les valeurs de k' et de R ?

Exo2

Un mélange de trois composés volatils A, B et C est analysé par CPG sur une colonne de 50 m de longueur. Les données concernant les temps de rétention, les largeurs des pics à leur base ainsi que les aires sont indiqués dans le tableau ci-dessous. Dans les mêmes conditions, un composé non retenu par la phase stationnaire est élué avec un temps de 2,3 min.

Produit	tr (min)	l (min)	Aire
A	9,55	0,81	21060
B	10,20	1,05	29940
C	12,45	1,15	35850

- Calculez la vitesse linéaire de la phase mobile.
- Calculez le facteur de rétention pour chacun des trois produits.
- Calculez l'efficacité de la colonne dans les trois cas.
- Calculez la hauteur équivalente à un plateau théorique pour les trois composés.
- Déterminez les facteurs de résolution.
- Calculez le pourcentage de chacun des composés dans le mélange.



TD N°3 (HPLC)

Exo1

Les temps de rétention de 2 produits naturels A et B d'un mélange à séparer sont respectivement égaux à 16,40 et 17,63 min sur une colonne de 30,0 cm. Une espèce non retenue passe sur la colonne en 1,30 min. Les largeurs (à la base) des pics de A et B sont respectivement égales à 1,11 et 1,21 min. Calculer

1. La résolution de la colonne
2. Le nombre moyen de plateaux théoriques dans la colonne
3. La hauteuréquivalente à un plateau théorique
4. La longueur de la colonne nécessaire pour obtenir une résolution de 1,5
5. Le temps requis pour éluer la substance B sur cette colonne.

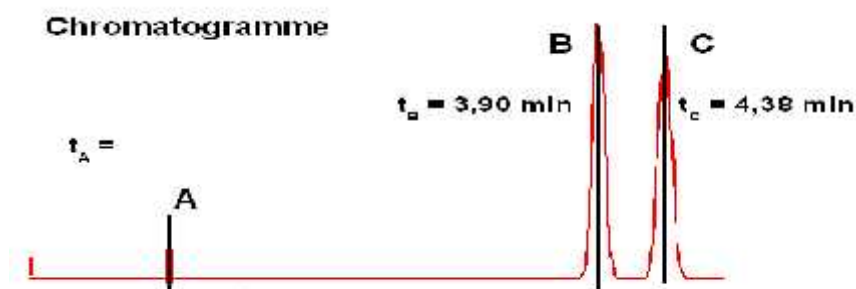
Exo2

Le chromatogramme ci-dessous a été obtenu dans les conditions suivantes:

Colonne : longueur : $L = 15$ cm - diamètre interne: $d = 0,5$ cm. Phase stationnaire : Silice greffée C18.

Phase mobile : Eau/Méthanol (50/50), Débit: $D = 0,6$ mL/min. Le composé A est un composé non retenu sur la colonne utilisée. A partir de ce chromatogramme déterminer :

- 1) L'efficacité pour les deux composés B et C
- 2) L'efficacité moyenne de la colonne
- 3) Le volume mort V_m de la colonne
- 4) Le volume de la phase stationnaire V_s
- 5) Les facteurs de rétention k_B et k_C des deux composés B et C.
- 7) La sélectivité de la séparation.
- 8) La résolution R de la séparation.
- 9) La résolution de Purnel RP de la séparation.





TD N°4 (d'échange d'ions)

Exo1

On veut séparer 3 acides-aminés : l'acide L-glutamique, la L-leucine et la L-lysine par chromatographie sur une résine polystyrénique substituée par des groupements sulfonate ($-\text{SO}_3^-$). Les pH isoélectriques de l'acide L-glutamique, de la L-leucine et de la L-lysine sont respectivement : 3,22 ; 5,98 ; 9,74 à 25°C. On dépose ces 3 acides aminés sur la colonne, à pH 2, puis on élue en amenant progressivement le pH à 7.

1 - Quels acides aminés sont élués et dans quel ordre ? (On considérera que les interactions acide aminé-résine sont uniquement d'ordre électrostatiques).

Exo2

La carboxyméthylcellulose (CM-cellulose) est un support échangeur de cations. Elle est obtenue en substituant la cellulose par des groupements carboxyméthyls ($-\text{CH}_2-\text{COOH}$).

1 - Quelle est la proportion des groupements carboxyméthyls chargés négativement aux pH suivants : 1 ; 4,76 ; 7 et 9 (on considérera que le pKa du groupement carboxyl des radicaux carboxyméthyls est 4,76).

2 - Parmi les protéines suivantes : Ovalbumine (pHi = 4,6), Cytochrome c (pHi = 10,65) et Lysozyme (pHi = 11), quelles sont celles qui sont retenues par la CM-cellulose à pH 7 ? (On considérera que les interactions protéine-CM-cellulose sont uniquement d'ordre électrostatiques).