

HPLC

Exercice n°1

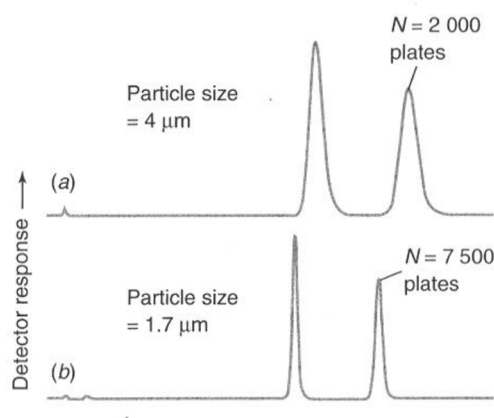
Quels paramètres pourrait-on varier pour changer la résolution de deux pics trop proches ?

Les paramètres qui influenceront la résolution entre deux pics sont : la force de l'éluant, le pH de la phase mobile, la température de la colonne, la nature de la phase stationnaire.

Après optimisation d'une élution isocratique avec différents solvants, la résolution de deux pics successifs est de 1,2. Comment peut-on améliorer la résolution sans changer les solvants d'élution ni le type de phase stationnaire ?

Pour améliorer la résolution on peut : diminuer le débit, changer la température de la colonne, augmenter la longueur de colonne, utiliser une phase stationnaire identique dont le diamètre des particules est plus petit.

Un échantillon est chromatographié en HPLC avec deux colonnes en phase inverse C₁₈ de 5 cm de longueur. Les deux colonnes diffèrent, uniquement par la taille des particules constituant la phase stationnaire : 4 µm (figure a) et 1,7 µm (figure b) :



Comment évolue l'efficacité de la colonne lorsque la taille des particules diminue ? Justifier votre réponse.

L'efficacité d'une colonne HPLC augmente avec la diminution de la taille des particules. On diminue les facteurs A et C de l'équation de Van Deemter, on a une HEPT H plus petite et donc un nombre de plateaux plus important.

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_{M(j)}}{\bar{u}} + \left(\frac{k'_{(j)}{}^2}{96(1+k'_{(j)})^2} \times \frac{d_p^2}{D_{M(j)}} + \frac{(qk'_{(j)})}{(1+k'_{(j)})^2} \frac{d_f^2}{D_{S(j)}} \right) \bar{u}$$

Exercice n°2

On étudie deux colonnes de longueurs identiques dont le diamètre des particules de la phase stationnaire est de 5 µm. Pour ces deux colonnes, les particules de la phase stationnaire occupent 40% du volume de la colonne et l'éluant 60%. La colonne **A** a un diamètre interne de 4,6 mm. Elle est utilisée avec un débit de 3 mL·min⁻¹. Le volume d'échantillon injecté dans la colonne **A** est de 20 µL. La colonne **B** a un diamètre interne de 2,1 mm.

Quel débit doit être utilisé dans la colonne **B** pour obtenir la même vitesse linéaire d'écoulement moyenne que dans la colonne **A** ?

La vitesse linéaire d'écoulement moyenne \bar{u} est reliée au débit F_V par le biais du temps mort et de la longueur de la colonne et comme $V_M \approx V_{mo}$ alors :

$$t_M = \frac{L}{\bar{u}} \Rightarrow \bar{u} = \frac{L}{t_M} = \frac{L}{V_M / F_V} = \frac{LF_V}{V_M} = \frac{LF_V}{V_{mo}}$$

Il faut à présent évaluer le volume de phase mobile physique V_{mo} . On sait que le volume de phase mobile physique occupe 60% du volume de la colonne soit $V_{mo} = 0.6 V_c$. Ceci correspond à une colonne de porosité $\varepsilon = 0,6$ car : $\varepsilon = \frac{V_{mo}}{V_c}$.

$$\bar{u} = \frac{LF_V}{V_{mo}} = \frac{LF_V}{\varepsilon V_c} = \frac{LF_V}{\varepsilon \pi r^2 L} = \frac{F_V}{\varepsilon \pi r^2} = \frac{3}{0,6\pi(0,23)^2} = 30 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$$

Dans cette expression, le rayon de la colonne est exprimée en cm et le débit volumique en $\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ ($1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} = 1 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$). En conservant la vitesse linéaire d'écoulement moyenne \bar{u} , on obtient donc :

$$F_V = \bar{u} \varepsilon \pi r^2 = 30 \times 0,6 \pi (0,105)^2 = 0,62 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$$

Quel volume d'échantillon devra être injecté dans la colonne B ?

Les colonnes A et B ont la même longueur L. La colonne A a un volume de $V_A = \pi (0,46 / 2)^2 L = 0,166 \text{ L cm}^3$ et la colonne B a un volume $V_B = \pi (0,21 / 2)^2 L = 0,035 \text{ L cm}^3$ soit un rapport de volume de $0,166 \text{ L} / 0,035 \text{ L} = 4,743$. Attendu qu'entre ces deux colonnes, le rapport de phase β est le même et en admettant que la capacité disponible des deux phases stationnaires est identique alors pour la colonne B on devra injecter 4,743 fois moins, c'est-à-dire $4,22 \mu\text{L}$ d'échantillon.

Exercice n°3

Vous essayez de séparer un mélange inconnu par chromatographie en phase inverse en mode isocratique avec l'éluant suivant : 50% acétonitrile / 50% H_2O . Les pics obtenus sur le chromatogramme se chevauchent et sont élués dans le domaine $k' = 2-6$.

Pour améliorer la chromatographie de ce mélange, utiliseriez-vous une plus forte ou plus faible fraction volumique d'acétonitrile ? (vous pouvez calculer l'indice de polarité de l'éluant)

L'indice de polarité P'_E d'un éluant est le suivant :

$$P'_E = \sum_{i=1}^N \Phi_i P'_i$$

Dans cette équation, Φ_i et P'_i représentent la fraction volumique et la polarité du solvant i composant l'éluant E.

Pour un éluant à 50% acétonitrile / 50% H_2O (V/V) on aura alors :

$$P'_E = (0,5 \times 5,8) + (0,5 \times 10,2) = 8$$

On doit augmenter les k' car ils sont trop petits. Comme on est en phase inverse, il faut que l'éluant ait moins d'affinité pour la phase stationnaire. On doit augmenter la polarité de l'éluant en diminuant la quantité d'acétonitrile.

Vous essayez de séparer de nouveau un mélange inconnu sur phase normale en mode isocratique avec l'éluant suivant : 50% hexane / 50% isopropyléther. Les pics se chevauchent et sont élués dans le domaine $k' = 2-6$.

Pour améliorer la chromatographie de ce mélange, utiliseriez-vous une plus forte ou plus faible fraction volumique d'hexane ? (vous pouvez calculer l'indice de polarité de l'éluant)

Pour un éluant à 50% hexane / 50% isopropyléther (V/V) on aura alors :

$$P'_E = (0,5 \times 0,1) + (0,5 \times 2,4) = 1,3$$

On doit augmenter les k' car ils sont trop petits. Comme on est en phase normale, il faut que l'éluant ait moins d'affinité pour la phase stationnaire. On doit diminuer la polarité de l'éluant en augmentant la quantité d'hexane.

Des composés aromatiques non polaires sont séparés par HPLC en mode isocratique. La phase stationnaire est une phase inverse C_{18} . L'éluant utilisé est le suivant : 65% méthanol / 35% H_2O .

Comment les temps de rétention seraient-ils modifiés si on utilisait un mélange constitué à 90% de méthanol ?

Si on augmente la quantité de méthanol, on passe d'un indice de polarité de 6,9 à 5,6. Comme on diminue la polarité de l'éluant, il aura une plus forte affinité pour la phase stationnaire C_{18} . Les solutés auront moins d'affinité pour la phase stationnaire et de ce fait, les temps de rétention seront plus petits.

Exercice n°4

Deux composés, l'acide octanoïque ($CH_3-(CH_2)_6-COOH$) et le 1-amino-octane ($CH_3-(CH_2)_7-NH_2$), sont chromatographiés sur une colonne C_{18} en mode isocratique. L'éluant est le suivant : 20% méthanol / 80% tampon à pH = 3.

Lequel de ces deux composés sera élué en premier ? Pourquoi ?

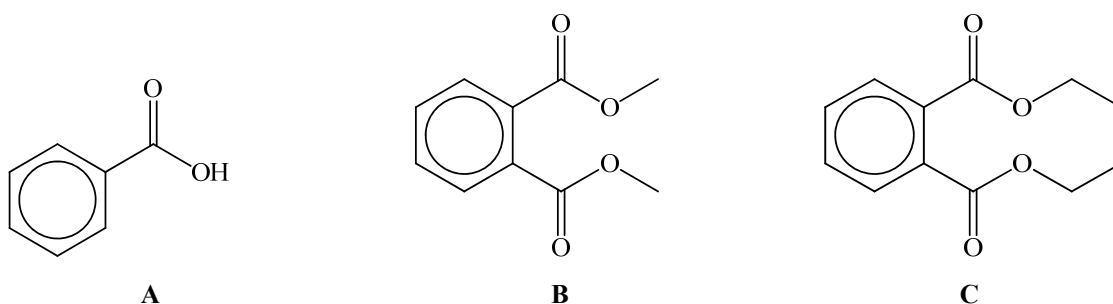
A pH = 3 l'acide sera neutre alors que l'amine qui est une base sera sous la forme $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_7\text{-NH}_3^+$, elle est donc plus polaire et aura peu d'interactions avec la phase stationnaire. L'amine sera éluée en premier.

On sépare les acides suivants : acide linoléique ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$), acide arachidique ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}_2\text{H}$), acide oléique ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$) sur une colonne en mode isocratique en utilisant comme phase mobile un éluant à base de tampon à pH = 9.

Quel sera l'ordre d'éluion de ces acides ?

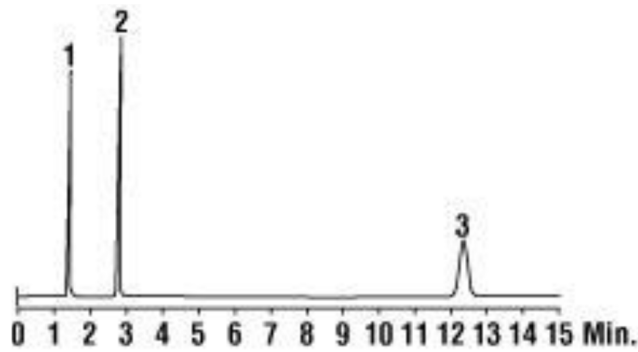
A pH = 9, tous les acides sont déprotonnés, sous forme COO^- . L'interaction avec la phase stationnaire se fera avec la partie hydrophobe des acides. L'acide linoléique avec ses 2 doubles liaisons est plus polaire que l'acide oléique et l'acide arachidique est le plus apolaire, sur phase inverse on aura : acide linoléique < acide oléique < acide arachidique.

L'éluion des solutés **A**, **B** et **C**, est réalisée en mode isocratique sur une colonne C_{18} .



L'éluant est le suivant : méthanol (58%) / H_2O (42%) avec 1% d'acide acétique.

Attribuer les pics chromatographiques à chaque soluté.



C est le plus apolaire et A est le plus polaire. Sur colonne C₁₈, A est le moins retenu et C est le plus retenu. On aura donc 1, 2, 3 = A, B, C.

Exercice n°5

On étudie la séparation de deux composés *A* et *B* en HPLC sur colonne C₁₈ (porosité = 0,5 ; dp = 5 μm ; longueur = 20 cm, ID = 4,6 mm). L'élution est réalisée à un débit de 1 mL·min⁻¹ avec un éluant binaire constitué d'acétonitrile (MeCN) et d'eau (H₂O). Les facteurs de rétention $k'_{(A)}$ et $k'_{(B)}$ des composés *A* et *B* dépendent de la fraction volumique en acétonitrile :

$$\log k'_{(A)} = -6,075 \times 10^{-3} (\% \text{MeCN}) + 1,3283$$

$$\log k'_{(B)} = -0,0107 (\% \text{MeCN}) + 1,5235$$

Trouver la composition de l'éluant MeCN / H₂O qui conduirait à un facteur de sélectivité $\alpha_{(A,B)} = 1$.

Pour trouver la composition en MeCN, on aura :

$$\alpha_{(A,B)} = t_{R'(B)}/t_{R'(A)} = k'_{(B)}/k'_{(A)} = 1$$

$$k'_{(A)} = k'_{(B)} \rightarrow \log(k'_{(A)}) = \log(k'_{(B)})$$

$$-6,075 \times 10^{-3} (\% \text{ MeCN}) + 1,3283 = -0,0107 (\% \text{ MeCN}) + 1,5235$$

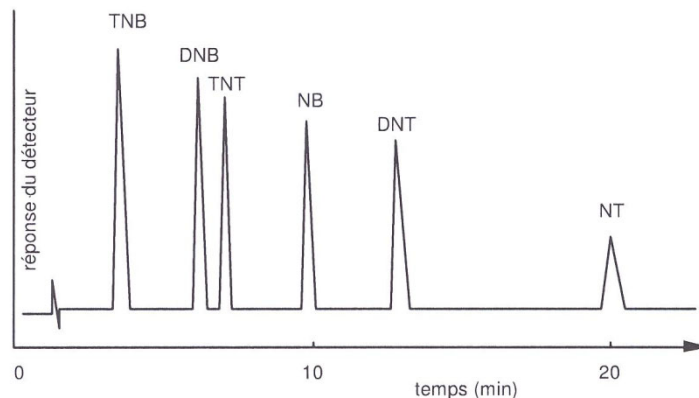
$$(\% \text{ MeCN}) = 42,2\% \approx 42\%$$

Pour augmenter le facteur de sélectivité doit-on augmenter ou diminuer le pourcentage d'acétonitrile ?

Pour augmenter la sélectivité, on doit avoir $\alpha_{(A,B)} > 1$ d'où $t_{R'(B)}/t_{R'(A)} > 1$ donc (% MeCN) < 42%.

Exercice n°6

Un mélange d'explosifs est analysé par HPLC avec une colonne C₈ (porosité = 0,5 ; dp = 5 µm ; longueur = 15 cm, ID = 3,9 mm). Le débit de la phase mobile, constituée d'un mélange eau / isopropanol, est de 1 mL·min⁻¹. Le mélange est constitué de nitrobenzène (NB), 1,3-dinitrobenzène (DNB), 1,3,5-trinitrobenzène (TNB), 3-nitrotoluène (NT), 2,4-dinitrotoluène (DNT) et de 2,4,6-trinitrotoluène (TNT). Le chromatogramme obtenu est le suivant :



Expliquer le mécanisme de rétention et interpréter l'ordre d'élution de ces solutés.

Le composé le plus polaire sort en tête de colonne car on est en phase inverse. Il s'agit du dérivé trinitré (-NO₂) le plus polaire, trinitrobenzène (TNB). L'autre dérivé trinitré est à base de toluène (TNT), moins polaire, et sera élué plus tard. S'intercale entre TNB et TNT le DNB dont la polarité est intermédiaire. Ensuite on observera l'élution du nitrobenzène (NB) comme suite logique du DNB et ensuite les dérivés di- et mono-nitrés du toluène DNT et NT.

Calculer le temps mort de la colonne vous basant sur la porosité de cette dernière.

Le volume de la colonne doit être exprimé en cm^3 car $1 mL = 1 cm^3$.

$$t_M = \frac{\varepsilon V_c}{F_V} = \frac{0,5 \times (\pi (0,39 / 2)^2 \times 15)}{1} = 0,9 \text{ min}$$

Sachant que le temps de rétention de NB est de 10 min, calculer son facteur de rétention $k'_{(NB)}$.

$$k'_{(NB)} = \frac{t_{R(NB)} - t_M}{t_M} = \frac{10 - 0,9}{0,9} = 10,1$$

Attendu que $k'_{(NB)}$ varie selon : $\ln k'_{(NB)} = \ln k'_{(NB)w} - b\Phi_0 = 5,02 - 0,15 (\% \text{ isopropanol})$, calculer le % d'isopropanol contenu dans la phase mobile.

$$\ln k'_{(NB)} = 5,02 - 0,15 (\% \text{ isopropanol}) \Rightarrow (\% \text{ isopropanol}) = \frac{(5,02 - \ln 10,1)}{0,15} = 18\%$$

La variation de k' en fonction de la température (K) de la colonne suit la loi : $\ln k' = (6,25 \times 10^3)/T - 18,80$.

Calculer la température de la colonne en vous basant sur $k'_{(NB)}$.

$$\ln k'_{(NB)} = \frac{6,25 \times 10^3}{T} - 18,80 \Rightarrow T = \frac{6,25 \times 10^3}{\ln 10,1 + 18,80} = 296,03 \text{ K} \approx 23^\circ \text{C}$$

A cette température, la viscosité de la phase mobile vaut 1 cP ($1 \times 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$).

Calculer la perte de charge de la colonne utilisée ($\Phi = 500$).

$$\Delta P = \frac{\Phi \eta L \bar{u}}{d_p^2}$$

Il faut calculer \bar{u} ($cm \cdot s^{-1}$) à partir de t_M (min) :

$$t_M = \frac{L}{\bar{u}} \Rightarrow \bar{u} = \frac{L}{t_M} = \frac{15}{0,9 \times 60} = 0,28 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$\Delta P = \frac{\Phi \eta L \bar{u}}{d_p^2} = \frac{500 \times 1 \times 10^{-3} \times 15 \times 0,28}{(5 \times 10^{-4})^2} = 8,4 \times 10^6 \text{ Pa} = 84 \text{ Bars}$$

Exercice n°7

Les différents sucres contenus dans un jus d'orange sont séparés par HPLC. L'analyse est conduite en mode isocratique (1 mL·min⁻¹) avec un éluant constitué par un mélange eau / acétonitrile.

Sachant que les sucres de la famille des hexoses possèdent des temps de rétention plus grands que ceux de la famille des pentoses et que l'on observe aussi que : $\ln k' = A + B \times (\% \text{ acétonitrile})$ avec A et B des constantes positives, la phase stationnaire utilisée est-elle polaire ou apolaire ?

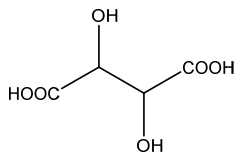
Plus on a de fonction OH, plus le temps de rétention est grand, la phase stationnaire doit être une phase normale. On observe que plus le pourcentage d'acétonitrile augmente, plus le temps de rétention augmente. Comme l'autre composant de l'éluant est de l'eau, cela veut dire que plus la polarité de l'éluant diminue, plus le temps de rétention augmente. Il y a donc moins d'interactions entre la phase stationnaire et la phase mobile. Ceci confirme qu'il s'agit d'une phase stationnaire normale.

Exercice 8

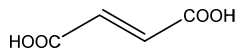
L'analyse des acides d'un jus de pomme est réalisée par HPLC en mode isocratique avec une colonne phényle (support PS-DVB ; porosité $\varepsilon = 0,5$; $d_p = 5 \mu\text{m}$; longueur = 15 cm, ID = 4,6 mm) à 40°C en utilisant du KNO₃ comme marqueur de temps mort. Le débit de la phase mobile, constituée d'un mélange phase aqueuse / acétonitrile (98/2) est de 1 mL·min⁻¹. La phase aqueuse est constituée d'acide phosphorique à 0,15 M de pH ≈ 1 . Le chromatogramme et les données sont les suivants :

pic	temps de rétention brut / min	base / min
1	1,27	0,20
2	7,40	0,35
3	9,30	0,40
4	10,20	0,45
5	15,80	0,60

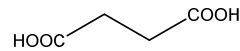
Les acides identifiés sont les suivants :



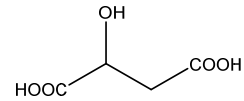
A



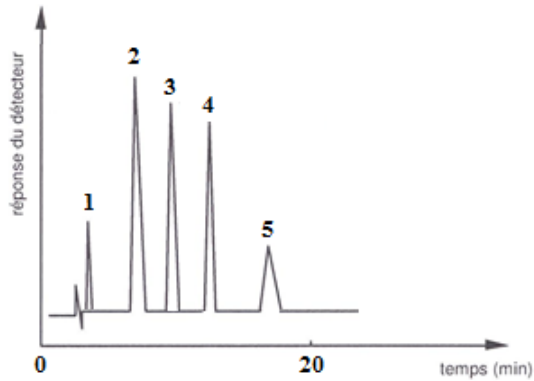
B



C



D



Répondez aux affirmations suivantes :

- La phase stationnaire est une phase normale
- La phase stationnaire est une phase inverse
- Le solvant de base est la phase aqueuse
- Le solvant de base est l'acétonitrile
- La phase stationnaire à base de PS-DVB est stable à $\text{pH} \approx 1$

Vrai **Faux**

Sachant que le plus petit pK_a de ces acides est de 3,0 et que la phase mobile est à $\text{pH} \approx 1$, l'ordre d'élution (t_R croissants) sera:

- KNO_3 , A, C, D, B
- KNO_3 , A, D, C, B
- KNO_3 , C, A, D, B

Pourquoi le soluté le plus retenu est B ?

B est le soluté le plus retenu car il présente des interactions π - π avec la phase stationnaire à base de groupes phényles.

Calculer les facteurs de rétention k' (à deux chiffres après la virgule) pour les pics 2 et 5. Les conditions chromatographiques sont-elles optimales ? Justifier votre réponse.

$$k'_{(2)} = \frac{t_{R(2)} - t_M}{t_M} = \frac{7,40 - 1,27}{1,27} = 4,83$$

$$k'_{(5)} = \frac{t_{R(5)} - t_M}{t_M} = \frac{15,80 - 1,27}{1,27} = 11,44$$

Pour une chromatographie idéale on doit avoir pour l'ensemble des solutés : $2 < k' < 10$ or dans notre cas, on observe $k' > 10$ pour le soluté 5. Les conditions chromatographiques ne sont pas idéales.

Répondez aux affirmations suivantes :

	Vrai	Faux
▪ Pour diminuer k' , on doit augmenter la quantité d'acétonitrile	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▪ Si on augmente la quantité d'acétonitrile, on augmente la résolution	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
▪ Pour diminuer k' on diminue la température de la colonne	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

Exercice 9

On désire mettre au point une méthode de séparation HPLC pour analyser les parabènes contenus dans des produits cosmétiques. Pour ce faire, on sélectionne une colonne C₁₈ (porosité $\varepsilon = 0,5$; $d_p = 5 \mu\text{m}$; longueur = 15 cm, ID = 4,6 mm). Le chromatographe est équipé d'un détecteur UV-Visible. La phase mobile est constituée de deux solvants miscibles entre eux dénommés solvant de base et solvant sélectif. On développe la méthode HPLC en essayant différents solvants de base et sélectifs en mode gradient à $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

Concernant le couple phase stationnaire / phase mobile, entourer la réponse qui convient :

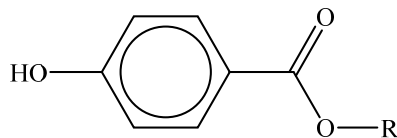
La colonne C₁₈ est : polaire / *apolaire*

Le solvant de base est une phase : *aqueuse* / organique

Le solvant sélectif est une phase : aqueuse / *organique*

Le solvant majoritaire au départ du gradient est le solvant : *de base* / sélectif

La structure des parabènes étudiés est la suivante :



Les parabènes étudiés sont-ils des acides, des bases ou des espèces neutres ?

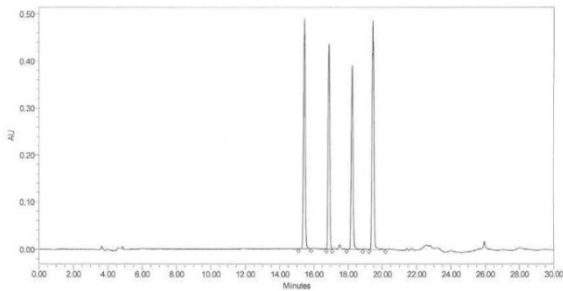
Les parabènes étudiés sont des acides à travers la fonction phénol déprotonnable en phase aqueuse.

Le pH de la phase mobile a-t-elle une influence sur les temps de rétention des parabènes étudiés ? Justifier votre réponse.

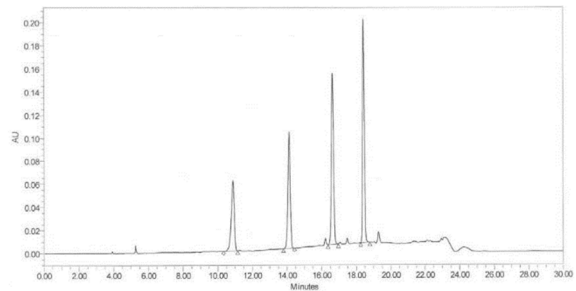
Oui, le pH de la phase mobile a une influence sur les temps de rétention des parabènes étudiés car s'ils sont sous forme déprotonnée, ils seront moins retenus par la phase stationnaire apolaire.

On se propose de développer la méthode de séparation en utilisant quatre solvants : méthanol, acétonitrile, tampon acide formique/ formiate d'ammonium à pH = 3, tampon hydrogénate d'ammonium / carbonate d'ammonium à pH = 10. Le pK_a moyen des parabènes étudiés est de 8,25.

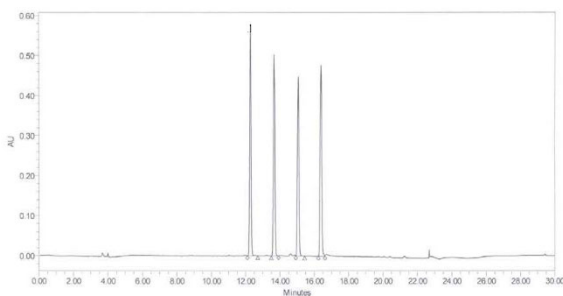
Les chromatogrammes d'un mélange de méthyl-, éthyl-, propyl- et butylparabène sont les suivants :



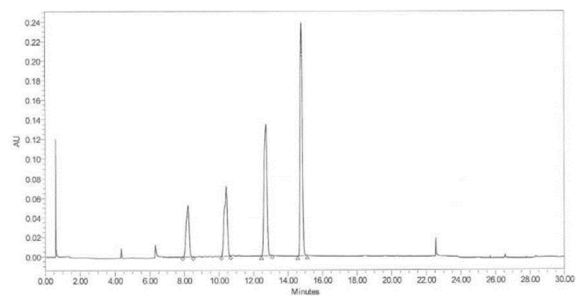
1 : phase aqueuse pH =3 / méthanol



2 : phase aqueuse pH=10 / méthanol



3 : phase aqueuse pH =3 / acétonitrile



4 : phase aqueuse pH=10 / acétonitrile

En vous basant sur la relation de Henderson-Hasselbach, et sur un pK_a moyen de 8,25, calculer la valeur de pH à ne pas dépasser pour obtenir une séparation correcte. On notera HA le parabène sous sa forme acide et A^- celui sous sa forme basique.

$$pH = pK_a + \log\left(\frac{[A^-]}{[HA]}\right) \Rightarrow [A^-] \ll [HA]$$

en prenant comme cas limite $[HA] = 100 [A^-]$, on aura :

$$pH \leq pK_a + \log\left(\frac{[A^-]}{100[A^-]}\right) \Rightarrow pH \leq pK_a + \log(10^{-2}) \Rightarrow pH \leq pK_a - 2$$

La condition entraîne donc que $pH \leq 6,25$.

La méthode retenue est celle qui combine un tampon acide formique/formiate d'ammonium à $pH = 5$ et du méthanol (T/M). L'élution est réalisée en mode isocratique à différents

pourcentages de méthanol à $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ sur un mélange contenant du KNO_3 , du méthylparabène (MP), de l'éthylparabène (EP), du propyl (PP) et du butylparabène (BP).

Le choix de pH du tampon est-il correct ? Justifier votre réponse en vous basant sur les calculs effectués au point précédent.

Oui car le pH doit être inférieur ou égal à 6,25 pour avoir 100 fois plus de forme HA que de forme A⁻. Si l'on est à pH =5 alors on aura 1778 fois plus de forme HA que de forme A⁻.

En vous basant sur la nature du détecteur de notre système HPLC, justifier le choix méthanol comme autre solvant.

Basé sur les essais préliminaires, on ne voit que peu de différence, hormis une élution plus rapide avec l'acétonitrile. Sachant que le détecteur est un détecteur UV-Vis et que l'acétonitrile absorbe dans l'UV-visible dû à ses électrons π , alors notre choix s'est porté sur le méthanol qui est transparent en UV-Visible.

Pour quelle raison a-t-on introduit du KNO_3 dans le mélange à séparer ?

KNO_3 étant un sel inorganique, il n'interagira pas avec la phase stationnaire et peut donc servir de marqueur de temps mort. Son utilisation est possible dans notre cas car notre détecteur est un détecteur UV-Visible et que c'est un sel actif en UV-Visible grâce à ses électrons π .

Compléter le tableau suivant :

pic	T/M : 40/60 t_R / min	T/M : 35/65 t_R / min	T/M : 30/70 t_R / min	composé
1	0,814	0,814	0,814	<i>KNO_3</i>
2	1,453	1,276	1,159	<i>MP</i>
3	1,948	1,588	1,363	<i>EP</i>
4	2,944	2,183	1,729	<i>PP</i>
5	4,844	3,251	2,351	<i>BP</i>

Pourquoi le temps de rétention du pic n° 1 ne varie pas en fonction de la composition de phase mobile ?

Il s'agit du marqueur de temps dont le temps de résidence est de 100% en phase mobile car il est minéral et totalement dissocié en K^+ et NO_3^- quel que soit le pH de cette dernière. Si la composition de l'éluant n'engendre pas sa précipitation, alors, pour une colonne donnée, son temps de rétention ne dépend que du flux volumique de la phase mobile.

Pourquoi les temps de rétention des pics n° 2 à 5 diminuent lorsque le pourcentage de tampon diminue ?

Lorsque le pourcentage de tampon diminue, alors la phase mobile devient moins polaire et donc interagit de façon plus intense avec la phase stationnaire et ceci au détriment de l'interaction des solutés avec la phase stationnaire. De ce fait, les solutés verront leur temps de résidence dans la phase mobile augmenter et leur temps de rétention diminuer.

Les chromatographies dont les résultats qualitatifs sont reportés dans le tableau précédent fournissent pour chaque composition d'éluant une résolution optimale (voir chromatogrammes). Pour choisir la nature idéale de l'éluant, on se propose de déterminer le domaine du facteur de rétention k' pour chaque composition.

En vous basant sur les temps de rétentions donnés, compléter le tableau suivant en donnant les valeurs de k' arrondies à trois chiffres après la virgule.

k'	T/M : 40/60	T/M : 35/65	T/M : 30/70	composé
k'_{min}	0,785	0,568	0,424	MP
k'_{max}	4,951	2,994	1,888	BP

Sachant que pour chaque éluant la résolution est optimale, peut-on choisir l'éluant adéquat grâce aux valeurs de k' calculées ? Justifier votre réponse.

Non il n'est pas possible de choisir sur les valeurs de k' car k'_{max} est très inférieur à 10 quel que soit l'éluant et k'_{min} est inférieur à 2. Le domaine de k' optimum devrait s'étendre entre 2 et 10.

L'analyse d'un échantillon cosmétique réel révèle la présence d'hexylparabène (HP) dont le temps de rétention peut être estimé sur phase stationnaire C₁₈ à travers son $\log(P)$. Le $\log(P)$ caractérise l'hydrophobicité d'un composé. Les courbes $\log(k') = f(\log(P))$ ont été tracées pour chaque éluant en utilisant MP, EP, PP et BP comme standards. Il s'agit de droites dont les équations varient en fonction de la quantité de méthanol dans l'éluant :

composition	T/M : 40/60	T/M : 35/65	T/M : 30/70
$\log(k') =$	$0,503 \log(P) - 1,051$	$0,454 \log(P) - 1,100$	$0,408 \log(P) - 1,140$

Attendu que le $\log(P)$ de HP est de 4,520, compléter le tableau suivant en donnant les valeurs de k' arrondies à trois chiffres après la virgule.

composition	T/M : 40/60	T/M : 35/65	T/M : 30/70
$k'_{(HP)}$	16,694	8,955	5,060

Sachant que pour toutes les compositions étudiées la résolution est optimale, en vous basant sur ces valeurs et celles déterminées précédemment, donner la composition de l'éluant adéquat pour séparer les parabènes comportant une chaîne alkyle de C₁ à C₆ en mode isocratique.

Pour séparer les parabènes comportant une chaîne alkyle de C₁ à C₆ en mode isocratique, il faut une composition d'éluant T/M : 35/65 car dans ces cas, même si k'_{\min} est inférieur à 2 (0,568) la résolution est optimale. De plus, k'_{\max} sera inférieur à 10, ce qui est le plus important pour obtenir une chromatographie rapide.