

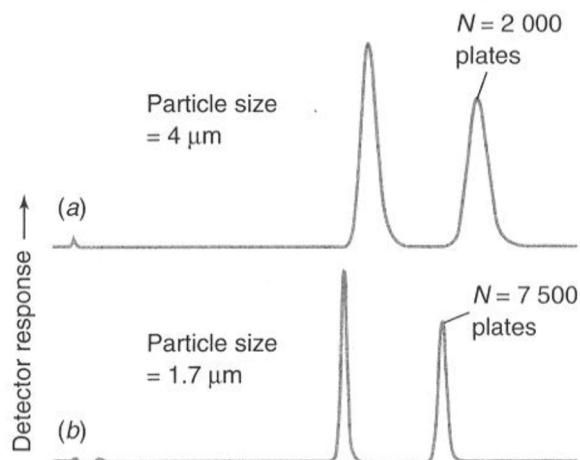
# HPLC

## Exercice n°1

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

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 ?

Un échantillon est chromatographié en HPLC avec deux colonnes en phase inverse C<sub>18</sub> 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.

## **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  $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . 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** ?

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

## **Exercice n°3**

Vous essayez de séparer un mélange inconnu par chromatographie en phase inverse en mode isocratique avec l'éluant suivant : 50% acetonitrile / 50% H<sub>2</sub>O. 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)

Vous essayez de séparer 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)

Des composés aromatiques non polaires sont séparés par HPLC en mode isocratique. La phase stationnaire est une phase inverse C<sub>18</sub>. L'éluant utilisé est le suivant : 65% méthanol / 35% H<sub>2</sub>O.

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

### **Exercice n°4**

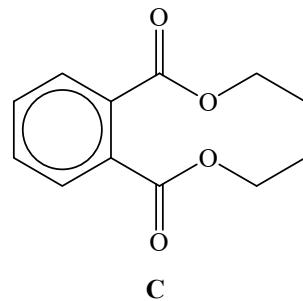
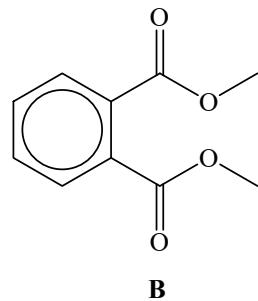
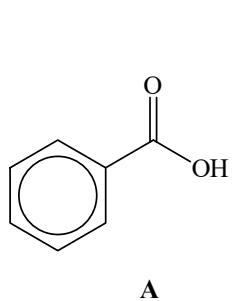
Deux composés, l'acide octanoïque ( $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-COOH}$ ) et le 1-aminoctane ( $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_7\text{-NH}_2$ ), sont chromatographiés sur une colonne C<sub>18</sub> en mode isocratique. L'éluant est le suivant : 20% méthanol / 80% tampon à pH = 3.

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

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

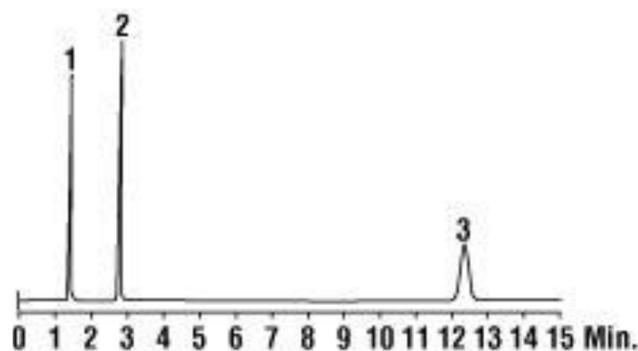
Quel sera l'ordre d'élution de ces acides ?

L'élution des solutés **A**, **B** et **C**, est réalisée en mode isocratique sur une colonne C<sub>18</sub>.



L'éluant est le suivant : méthanol (58%) / H<sub>2</sub>O (42%) avec 1% d'acide acétique.

Attribuer les pics chromatographiques à chaque soluté.



### Exercice n°5

On étudie la séparation de deux composés *A* et *B* en HPLC sur colonne C<sub>18</sub> (porosité  $\varepsilon = 0,5$  ;  $d_p = 5 \mu\text{m}$  ; longueur = 20 cm, ID = 4,6 mm). L'élution est réalisée à un débit de 1 mL·min<sup>-1</sup> avec un éluant binaire constitué d'acétonitrile (MeCN) et d'eau (H<sub>2</sub>O). Les facteurs de rétention  $k'_{(A)}$  et  $k'_{(B)}$  des composés *A* et *B* dépendent de la fraction volumique en acétonitrile :

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

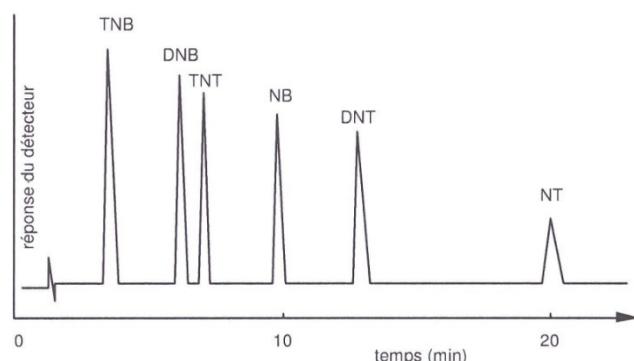
$$\log k'_{(B)} = -0,0107 (\% \text{MeCN}) + 1,5235$$

Trouver la composition de l'éluant MeCN / H<sub>2</sub>O qui conduirait à un facteur de sélectivité  $\alpha_{(A,B)} = 1$ .

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

### Exercice n°6

Un mélange d'explosifs est analysé par HPLC avec une colonne C<sub>8</sub> (porosité  $\varepsilon = 0,5$  ;  $d_p = 5 \mu\text{m}$  ; longueur = 15 cm, ID = 3,9 mm). Le débit de la phase mobile, constituée d'un mélange eau / isopropanol, est de 1 mL·min<sup>-1</sup>. 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.

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

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

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

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  $k'_{(NB)}$ .

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

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

### ***Exercice n°7***

Les différents sucres contenus dans un jus d'orange sont séparés par HPLC. L'analyse est conduite en mode isocratique ( $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) avec un éluant constitué par un mélange eau / acétonitrile.

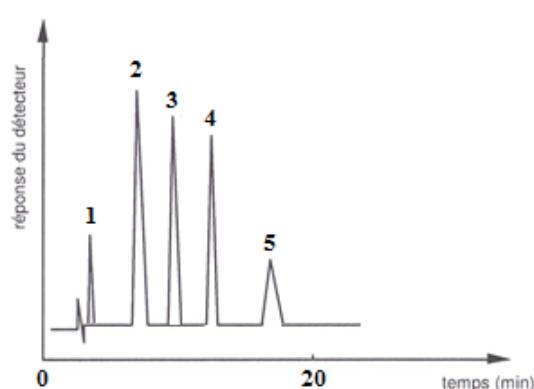
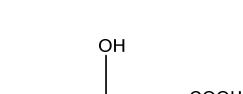
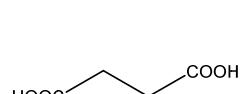
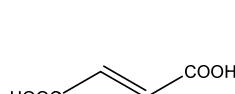
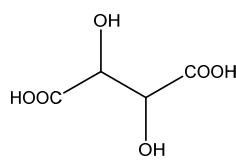
Sachant que les sucres de la famille des hexoses possèdent des temps de rétention plus grands que ceux de la famille des pentoses et que l'on observe aussi que :  $\ln k' = A + B \times (\% \text{ acétonitrile})$  avec  $A$  et  $B$  des constantes positives, la phase stationnaire utilisée est-elle polaire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

### Exercice n°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 KNO<sub>3</sub> 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<sup>-1</sup>. 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 :



Répondez aux affirmations suivantes :

	Vrai	Faux
▪ La phase stationnaire est une phase normale	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▪ La phase stationnaire est une phase inverse	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▪ Le solvant de base est la phase aqueuse	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▪ Le solvant de base est l'acétonitrile	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▪ La phase stationnaire à base de PS-DVB est stable à pH $\approx$ 1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Sachant que le plus petit pK<sub>a</sub> de ces acides est de 3,0 et que la phase mobile est à pH  $\approx$  1, l'ordre d'élution (*t<sub>R</sub>* croissants) sera:

- KNO<sub>3</sub>, A, C, D, B
- KNO<sub>3</sub>, A, D, C, B
- KNO<sub>3</sub>, C, A, D, B

Pourquoi le soluté le plus retenu est B ?

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.

Répondez aux affirmations suivantes :

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

### **Exercice n°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 C<sub>18</sub> (porosité  $\epsilon = 0,5$  ;  $d_p = 5 \mu\text{m}$  ; 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 mL·min<sup>-1</sup>.

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

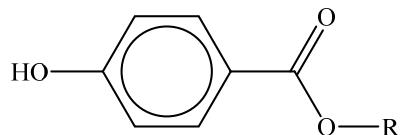
La colonne C<sub>18</sub> est : polaire / apolaire

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 :

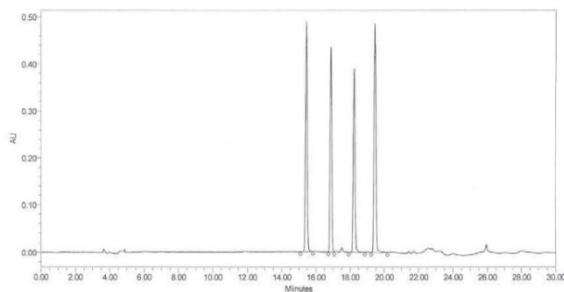


Les parabènes étudiés sont-ils des acides, des bases ou des espèces neutres ?

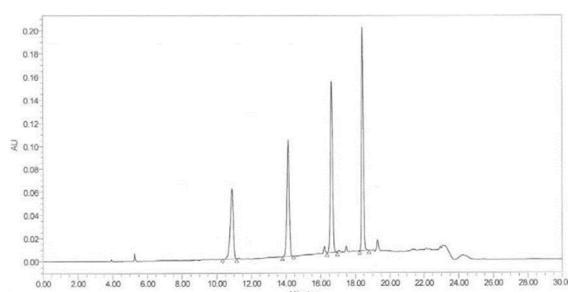
Le pH de la phase mobile a-t-elle une influence sur les temps de rétention des parabènes étudiés ? Justifier votre réponse.

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<sub>a</sub> moyen des parabènes étudiés est de 8,25.

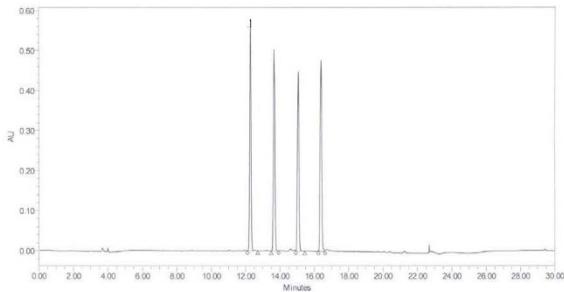
Les chromatogrammes d'un mélange de méthyl-, éthyl-, propyl- et butylparabène sont les suivants :



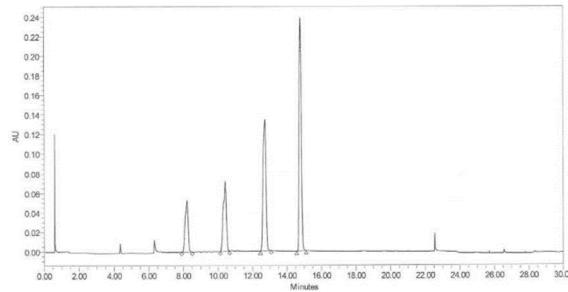
1 : phase aqueuse pH =3 / méthanol



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.

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  $\text{KNO}_3$ , 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.

En vous basant sur la nature du détecteur de notre système HPLC, justifier le choix méthanol comme solvant. Pour quelle raison a-t-on introduit du  $\text{KNO}_3$  dans le mélange à séparer ?

Compléter le tableau suivant :

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

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

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

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.

<b><math>k'</math></b>	<b>T/M : 40/60</b>	<b>T/M : 35/65</b>	<b>T/M : 30/70</b>	<b>composé</b>
<b><math>k' \text{ min}</math></b>				
<b><math>k' \text{ max}</math></b>				

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

L'analyse d'un échantillon cosmétique réel révèle la présence d'hexylparabène (HP) dont le temps de rétention peut être estimé sur phase stationnaire C<sub>18</sub> 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
$k'_{(HP)}$			

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 C<sub>1</sub> à C<sub>6</sub> en mode isocratique.