

# SEC

## *Exercice n°1*

Quel est le volume de la phase mobile nécessaire pour transporter une grosse molécule supposée exclue des pores de la phase stationnaire ? Comment appelle-t-on ce volume ?

Quel est le volume de la phase mobile nécessaire pour transporter une petite molécule pouvant rentrer dans tous les pores de la phase stationnaire ? Comment appelle-t-on ce volume ?

Définir le volume de rétention d'une macromolécule  $M$  de taille intermédiaire.

Donner les valeurs limites de  $K_{D(M)}$ .

Soit une colonne SEC de rayon  $r = 0,80 \text{ cm}$  et de longueur  $L = 20 \text{ cm}$ .

Calculer le volume de la colonne.

Le volume  $V_i$  de la phase mobile en dehors des particules du gel est de 18,1 mL et le volume de phase mobile physique est de 35,8 mL.

Déterminer le coefficient  $K_D$  pour un soluté dont le volume de rétention est de 27,4 mL.

Calculer les volumes de phase stationnaire physique et apparent.

Une colonne SEC en résine polystyrène a un diamètre de 7,8 mm et une longueur de 30 cm. Les particules solides du gel occupent 20%, les pores occupent 40% et le volume entre les particules occupe 40% du volume de la colonne.

A quel volume de rétention les molécules totalement exclues sortiraient de la colonne ?

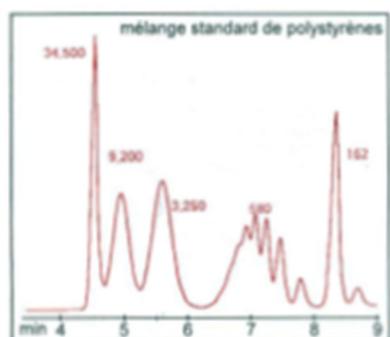
A quel volume de rétention sortiraient les plus petites molécules ?

Un mélange de polyéthylène glycols de masses moléculaires différentes est élué entre 23 et 27 mL.

Quel est le mécanisme de rétention de ces solutés ?

### Exercice n°2

On chromatographie un mélange de polystyrènes (PS) de masses moléculaires connues sur une colonne SEC (ID = 7,5 mm, L = 300 mm) dont le domaine de perméation s'étend de 400 à 30 000 daltons. La séparation est réalisée avec du tétrahydrofurane (THF) à 1  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . La détection UV est effectuée à 254 nm. Le chromatogramme ainsi que les données des pics résolus sont donnés ci-après :



$t_R$ (min)	Masse moléculaire (Da)
4,5	34500
4,9	9200
5,2	3250
8,3	162

A partir du chromatogramme obtenu reproduit ci-après, calculer le volume d'exclusion totale et le volume des pores de la colonne utilisée.

Calculer le  $K_D$  d'un soluté dont la masse moléculaire est de 3250 Da.

On observe quelquefois en chromatographie d'exclusion stérique des valeurs de  $K_D$  supérieures à 1. Interpréter ce phénomène.

Les composés suivants sont séparés avec les conditions chromatographique décrite ci-dessus dans le domaine où l'on peut déterminer la masse molaire d'une macromolécule inconnue :

Composés	$t_R$ (min)	Masse moléculaire (Da)
PS standard 1	4,5	34500
PS standard 2	4,9	9200
PS standard 3	5,2	3250
Inconnu	4,7	?

Par quelle méthode peut-on évaluer la masse moléculaire de composés inconnus ?

Estimer la masse moléculaire du soluté inconnu.

### Exercice n°3

L'équation fondamentale de la chromatographie pour une macromolécule  $M$  quelconque est :

$$V_{R(M)} = V_M + K_{D(M)} V_S.$$

En effectuant une identification entre les grandeurs effectives et physiques, donner l'équation qui décrit la chromatographie d'exclusion stérique. Justifier votre réponse.

Répondre aux affirmations suivantes :

- |  | Vrai                     | Faux                     |
|--|--------------------------|--------------------------|
| ▪ Pour une exclusion stérique pure, on a : $0 < K_{D(M)} < 1$  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ▪ Pour des molécules de petite taille, on observe : $K_{D(M)} = 0$   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ▪ Les grosses macromolécules circulent entre les billes du gel et sont éluées en premier                                 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ▪ Le volume mort est obtenu à l'aide du volume de rétention d'une très petite molécule telle que D <sub>2</sub> O        | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ▪ Le volume mort est obtenu à l'aide du volume de rétention d'une très grosse macromolécule telle que le bleu de dextran | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ▪ La chromatographie d'exclusion stérique est une technique qui offre une excellente résolution                          | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Une colonne SEC constituée d'une phase stationnaire en agarose a un diamètre de 8 mm et une longueur de 30 cm. Les particules solides du gel occupent 10%, les pores occupent 40% et le volume entre les particules occupe 50% du volume de la colonne. Un mélange de polyéthylènes glycols de masses moléculaires différentes est élué entre 10 mL et 17 mL.

Concernant le volume des pores :

- Le volume des pores est de 7,54 mL
- Le volume des pores est de 6,03 mL

Concernant le volume interstitiel :

- Le volume interstitiel est de 15,08 mL
- Le volume interstitiel est de 7,54 mL

Répondre aux affirmations suivantes :

	Vrai	Faux
▪ D <sub>2</sub> O peut être utilisé comme marqueur de volume de perméation totale	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▪ $V_{R(D_2O)}$ est de 15,08 mL	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▪ Le bleu de dextran est élué en dernier	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▪ $V_{R(M)}$ des macromolécules doit se trouver entre 7,54 mL et 13,57 mL pour satisfaire à un phénomène d'exclusion pure	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▪ Pour les macromolécules éluées entre 10 mL et 13 mL, $K_{D(M)} > 1$	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▪ Pour les macromolécules éluées entre 14 mL et 17 mL, $K_{D(M)} > 1$	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▪ La phase stationnaire sélectionnée est adéquate	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▪ Des interactions secondaires parasites sont observées pour les macromolécules dont le volume de rétention est supérieur à 14 mL	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>