

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 ?

Le volume de phase mobile nécessaire pour transporter une grosse molécule supposée exclue des pores correspond au volume interstitiel : le volume compris entre les particules de la phase stationnaire.

Il s'agit du volume d'exclusion totale encore appelé volume mort de la colonne V_M . $V_M = V_i$

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 ?

Le volume de phase mobile nécessaire pour transporter une petite molécule pouvant rentrer dans tous les pores correspond à la somme des volumes de phase mobile interstitielle et de phase mobile contenue dans les pores.

Il s'agit du volume de perméation totale V_t . $V_t \approx V_{mo}$. $V_{mo} = V_i + V_p$.

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

Le volume de rétention d'une molécule de taille intermédiaire sera compris entre le volume interstitiel et le volume de perméation totale : $V_i < V_{R(M)} < V_t$

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

On aura en exclusion pure : $0 \leq K_{D(M)} \leq 1$

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

Calculer le volume de la colonne.

$$V_c = \pi r^2 l = \pi \times (0,8)^2 \times 20 = 40,2 \text{ cm}^3 = 40,2 \text{ mL}$$

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.

$$K_{D(M)} = \frac{V_{R(M)} - V_i}{V_p}$$

$$V_{mo} = V_i + V_p \Rightarrow V_p = V_{mo} - V_i = 35,8 - 18,1 = 17,7 \text{ mL}$$

$$K_{D(M)} = \frac{V_{R(M)} - V_i}{V_p} = \frac{27,4 - 18,1}{17,7} = 0,53$$

Calculer les volumes de phase stationnaire physique et apparent.

$$V_c = V_i + V_p + V_{st} \Rightarrow V_{st} = V_c - V_i - V_p$$

$$V_{st} = 40,2 - 18,1 - 17,7 = 4,4 \text{ mL}$$

Le volume de la phase stationnaire représente 11% du volume de la colonne. Le volume de phase stationnaire apparent V_{st}' est :

$$V_{st}' = V_{st} + V_p$$

$$V_{st}' = 4,4 + 17,7 = 22,1 \text{ mL}$$

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 ?

On doit calculer le volume de la colonne : $V_c = \pi r^2 l = \pi (0,39)^2 30 = 14,3 \text{ cm}^3 = 14,3 \text{ mL}$

Les molécules seront totalement exclues pour un volume égal à V_i soit 40% de V_c . $V_i = 5,7 \text{ mL}$.

A quel volume de rétention sortiraient les plus petites molécules ?

On doit calculer le volume des pores qui est égal au volume interstitiel (40%) soit 5,7 mL. Les plus petites molécules sortiront pour un volume $V_i + V_p = 5,7 + 5,7 = 11,4 \text{ mL}$.

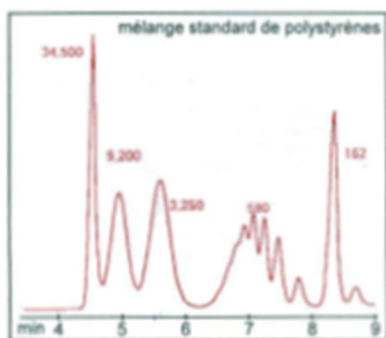
Un mélange de polyéthylène glycols de masses moléculaires différentes est élué entre 23 et 27 mL.

Quel est le mécanisme de rétention de ces solutés ?

Les volumes de rétention de ces deux macromolécules sont supérieurs au volume interstitiel et au volume de perméation totale. Il ne s'agit pas d'exclusion pure, d'autres phénomènes d'adsorption, de partage... entrent en jeu.

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.

Le domaine de perméation est de 400 à 30000 Da. On utilise le composé à 34500 Da comme marqueur de volume mort, c'est à dire le volume interstitiel V_i . Pour ce composé on a $t_R = 4,5$ min soit $V_R = t_R \times F_V = 4,5 \times 1 = 4,5$ mL. $V_i = 4,5$ mL.

Pour déterminer le volume de perméation totale, on utilise la plus petite molécule dont la masse molaire est 162 Da. Cette dernière est éluée à 8,3 min soit pour un volume de 8,3 mL. Son volume de rétention est donc : $V_R = V_i + V_p$. Le volume des pores est :

$$V_p = V_R - V_i = 8,3 - 4,5 = 3,8 \text{ mL}$$

On peut à présent calculer le volume de phase stationnaire en calculant le volume de la colonne :

$$V_c = \pi r^2 l \Rightarrow V_c = \pi (0,375)^2 30 = 13,3 \text{ cm}^3 = 13,3 \text{ mL}$$

Le volume de la phase stationnaire est :

$$V_c = V_i + V_p + V_{st} \Rightarrow V_{st} = V_c - V_i - V_p = 13,3 - 4,5 - 3,8 = 5 \text{ mL}$$

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

Sachant que la molécule est éluée en 5,2 min, c'est-à-dire à 5,2 mL, on aura :

$$K_{D(M)} = \frac{V_{R(M)} - V_i}{V_p} = \frac{5,2 - 4,5}{3,8} = 0,18$$

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

Dans ce cas, il se superpose d'autres interactions comme des interactions d'adsorption, de partage... au phénomène d'exclusion simple.

Les composés suivants sont séparés avec les conditions chromatographiques décrites 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 ?

Le volume de rétention d'une macromolécule varie en fonction de son rayon de giration qui lui-même est lié à la masse molaire de cette dernière. On observe une relation linéaire entre le volume de rétention et le logarithme de la masse molaire d'une macromolécule. En traçant $V_R = f(\log(M))$ ou $\log(M) = f(V_R)$, on pourra alors estimer la masse molaire de la macromolécule inconnue.

Estimer la masse moléculaire du soluté inconnu.

En se basant sur le tableau suivant, on trace $\log(M) = f(V_R)$.

Composés	t_R (min)	V_R (mL)	Masse moléculaire (Da)	$\log(M)$
PS standard 1	4,5	4,5	34500	4,54
PS standard 2	4,9	4,9	9200	3,96
PS standard 3	5,2	5,2	3250	3,51
Inconnu	4,7	4,7	?	

L'équation de la droite de régression est :

$$\log(M) = -1,47027(\pm 0,01404)V_{R(M)} + 11,15865(\pm 0,06846)$$

Le soluté inconnu dont le volume de rétention est de 4,7 mL a une masse molaire de :

$$\log(M) = -1,47027 \times 4,7 + 11,15865 = 4,25 \Rightarrow M = 10^{4,25} = 17717 \text{ Da}$$

On peut aussi calculer simplement la pente ainsi que l'ordonnée à l'origine :

$$m = \frac{\Delta y}{\Delta x} = \frac{3,51 - 4,54}{5,2 - 4,5} = -1,47143$$

$$\bar{b} = \bar{y} - m\bar{x} = 4,00333 - (-1,47143 \times 4,8667) = 11,16433$$

L'équation de droite est la suivante :

$$\log(M) = -1,47143V_{R(M)} + 11,16433$$

Pour $x = 4,7 \text{ mL}$ on a donc :

$$\log(M) = -1,47143 \times 4,7 + 11,16433 = 4,25 \Rightarrow M = 10^{4,25} = 17717 \text{ Da}$$

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.

Pour la chromatographie SEC, une partie du volume de phase mobile physique V_{mo} est immobilisé dans les pores du gel et constitue la phase stationnaire. Le volume des pores V_p correspond alors au volume de phase stationnaire effective : $V_S = V_p$. Comme $V_{mo} = V_i + V_p$ alors le volume de phase mobile effective est $V_M = V_i$.

On a donc :

$$V_{R(M)} = V_M + K_{D(M)} V_S \Rightarrow V_{R(M)} = V_i + K_{D(M)} V_p$$

Répondre aux affirmations suivantes :

	Vrai	Faux
▪ Pour une exclusion stérique pure, on a : $0 < K_{D(M)} < 1$	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▪ Pour des molécules de petite taille, on observe : $K_{D(M)} = 0$	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
▪ Les grosses macromolécules circulent entre les billes du gel et sont éluées en premier	<input checked="" 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 ₂ O	<input type="checkbox"/>	<input checked="" 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 checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▪ La chromatographie d'exclusion stérique est une technique qui offre une excellente résolution	<input type="checkbox"/>	<input checked="" 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	<input type="checkbox"/>
▪ Le volume des pores est de 6,03 mL	<input checked="" type="checkbox"/>

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 ₂ O peut être utilisé comme marqueur de volume de perméation totale | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ▪ $V_{R(D_2O)}$ est de 15,08 mL | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> |
| ▪ Le bleu de dextran est élué en dernier | <input type="checkbox"/> | <input checked="" 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 checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ▪ Pour les macromolécules éluées entre 10 mL et 13 mL, $K_{D(M)} > 1$ | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> |
| ▪ Pour les macromolécules éluées entre 14 mL et 17 mL, $K_{D(M)} > 1$ | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ▪ La phase stationnaire sélectionnée est adéquate | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> |
| ▪ Des interactions secondaires parasites sont observées pour les macromolécules dont le volume de rétention est supérieur à 14 mL | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |