

Nom :

Prénom :

Section :

Salle d'examen :

Numéro de place :

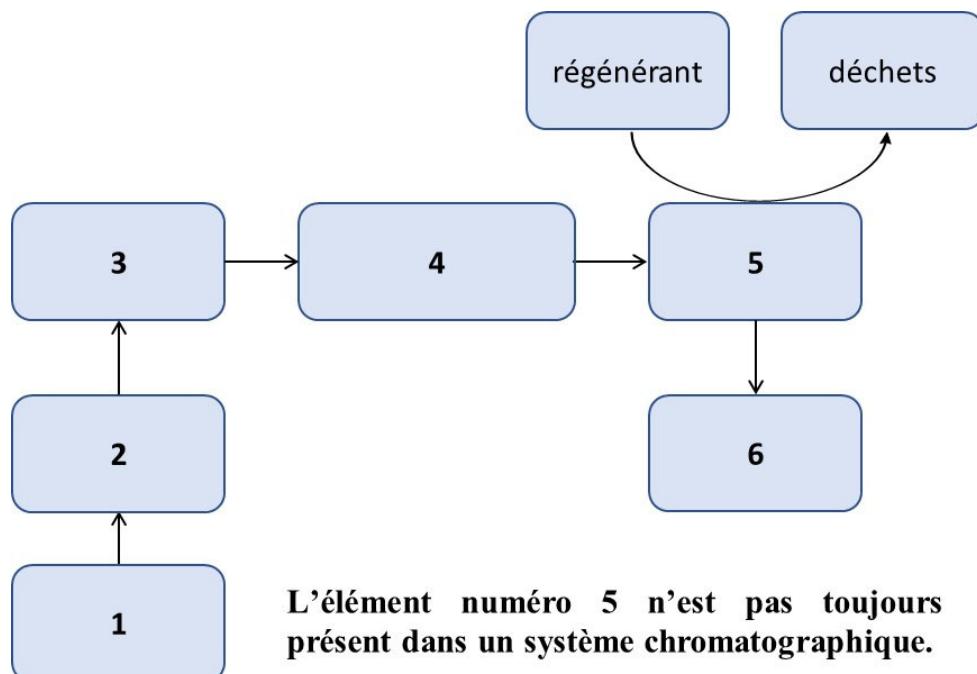
## Examen de méthodes de séparation analytiques Juin 2024

Durée de l'épreuve : 3 heures

### I. Principe de la chromatographie

#### I.1. Généralités

La chromatographie instrumentale peut être schématisée comme suit :



Dans le cas de la chromatographie d'élution, nommer les éléments **1** à **6** présents sur le schéma.

**1 : Fluide**

**2 : Unité de distribution du fluide ou distribution**

**3 : Injecteur**

**4 : Colonne(s) chromatographique(s) ou unité(s) de séparation(s)**

**5 : Unité de suppression ou suppresseur**

**6 : Déetecteur(s)**

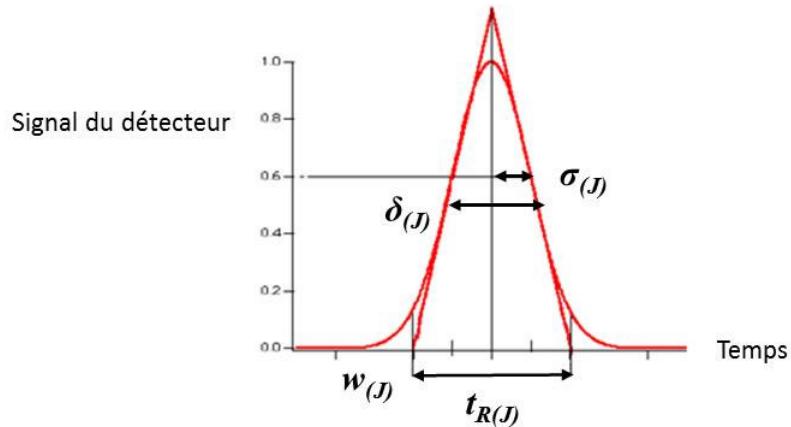
Dans quel(s) type(s) de chromatographie peut-on trouver plusieurs fois l'élément **4** en série ?

- GC
- HPLC
- IC
- SEC
- SFC

Dans quel(s) type(s) de chromatographie peut-on trouver l'élément **5** ?

- GC
- HPLC
- IC
- SEC
- SFC

Dans le cas d'une chromatographie idéale, les pics chromatographiques suivent une loi de Gauss. Ci-dessous, un pic chromatographique Gaussien :



Exprimer la variance  $\text{Var}(J)$  observée pour le soluté **J** en fonction de  $\sigma(J)$ .

$$\text{Var}(J) = (\sigma(J))^2$$

En vous basant sur la représentation schématique de la chromatographie instrumentale incluant les éléments 1 à 6, donner l'expression de la variance  $\text{Var}(J)$  observée sur le pic chromatographique détecté.

$$\text{Var}(J) = \text{Var}(3) + \text{Var}(4) + \text{Var}(5) + \text{Var}(6)$$

Parmi les variances qui contribuent à  $\text{Var}(J)$ , quelle est celle qui doit être prédominante ?

*La variance prédominante, celle qui doit être la plus grande est  $\text{Var}(4)$ , celle qui correspond à la colonne chromatographique.*

Exprimer le nombre de plateaux théoriques du soluté **J** en fonction de la variance prédominante.

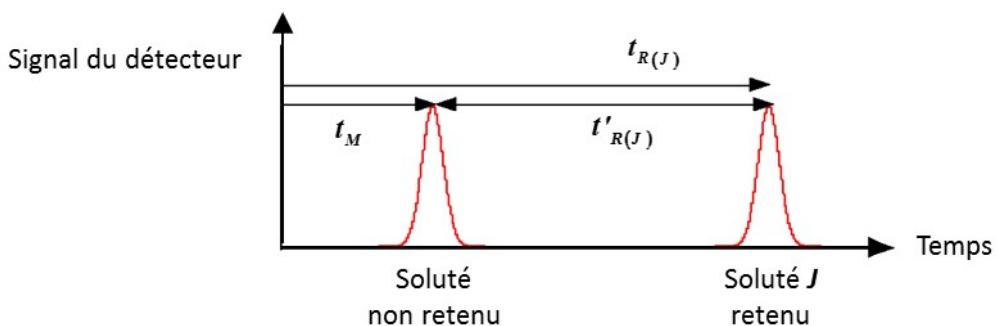
*Le nombre de plateaux théoriques  $N_{(J)}$  est donné par :*

$$N_{(J)} = \left( \frac{t_{R(J)}}{\sigma_{(J)}} \right)^2 = \frac{\left( t_{R(J)} \right)^2}{\left( \sigma_{(J)} \right)^2} = \frac{\left( t_{R(J)} \right)^2}{\text{Var}(4)}$$

Pour que le nombre de plateaux théoriques soit maximal, cette variance doit être :

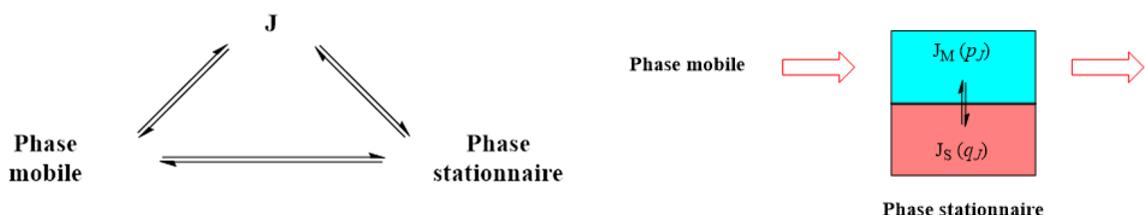
- maximale
- minimale
- peu importe

En chromatographie d'élution, la détection des différents solutés séparés génère un chromatogramme. Sur le chromatogramme ci-dessous, dessinez les pics d'un soluté retenu **J** et d'un soluté non retenu **I** par la phase stationnaire. La forme de ces deux pics obéit à une loi de Gauss. Faire figurer sur ce schéma le temps mort et les temps de rétention bruts et nets.

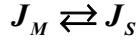


## I.2. Aspects thermodynamiques de la chromatographie

Le principe de la chromatographie repose sur une interaction à trois corps : soluté, phase stationnaire et phase mobile. Pour un soluté **J** on observe le schéma d'interaction suivant (schéma de gauche) :



D'un point de vue thermodynamique, on peut simplifier cette interaction à trois corps en la représentant comme le partage du soluté **J** entre la phase stationnaire **S** et la phase mobile **M** non miscibles entre-elles (schéma de droite). Ce partage est défini par la constante de distribution  $K_{D(J)}$ . L'équilibre à considérer est le suivant :



Un facteur important de la chromatographie est le facteur de rétention  $k'$  d'un soluté donné. Pour un soluté **J** donné, exprimer le facteur de rétention  $k'_{(J)}$  en fonction de  $t'_{R(J)}$  et  $t_M$ .

$$k'_{(J)} = \frac{t'_{R(J)} - t_M}{t_M} = \frac{t'_{R(J)}}{t_M}$$

Pour un rapport de phase effectif  $\Phi_{SM} = 1$  et pour l'équilibre considéré, démontrer que :

$$\ln t'_{R(J)} = \ln t_M + \frac{(\mu_{M(J)}^0 - \mu_{S(J)}^0)}{RT}$$

**On doit pour ce faire, donner l'expression de  $k'_{(J)}$  en fonction de  $K_{D(J)}$ :**

$$k'_{(J)} = \frac{t'_{R(J)}}{t_M} = K_{D(J)} \Phi_{SM} = K_{D(J)}$$

$$\frac{t'_{R(J)}}{t_M} = e^{-\frac{\Delta_D G_{(J)}^0}{RT}} = e^{-\frac{(\mu_{S(J)}^0 - \mu_{M(J)}^0)}{RT}} = e^{-\frac{(\mu_{M(J)}^0 - \mu_{S(J)}^0)}{RT}}$$

$$\ln\left(\frac{t'_{R(J)}}{t_M}\right) = \frac{(\mu_{M(J)}^0 - \mu_{S(J)}^0)}{RT}$$

$$\ln t'_{R(J)} - \ln t_M = \frac{(\mu_{M(J)}^0 - \mu_{S(J)}^0)}{RT}$$

$$\ln t'_{R(J)} = \ln t_M + \frac{(\mu_{M(J)}^0 - \mu_{S(J)}^0)}{RT}$$

Quels sont les paramètres qui influencent fortement le temps de rétention d'un soluté donné ?

Pour répondre à cette question, veuillez compléter le tableau suivant en cochant la ou les case(s) qui convient/convienent.

	GC	HPLC	IC	SEC	SFC
<b>Propriétés chimiques de la phase mobile</b>		✓	✓		✓
<b>Propriétés physiques de la phase mobile</b>					✓
<b>Propriétés chimiques de la phase stationnaire</b>	✓	✓	✓	✓	✓
<b>Propriétés physiques de la phase stationnaire</b>				✓	
<b>Température</b>	✓	✓			✓

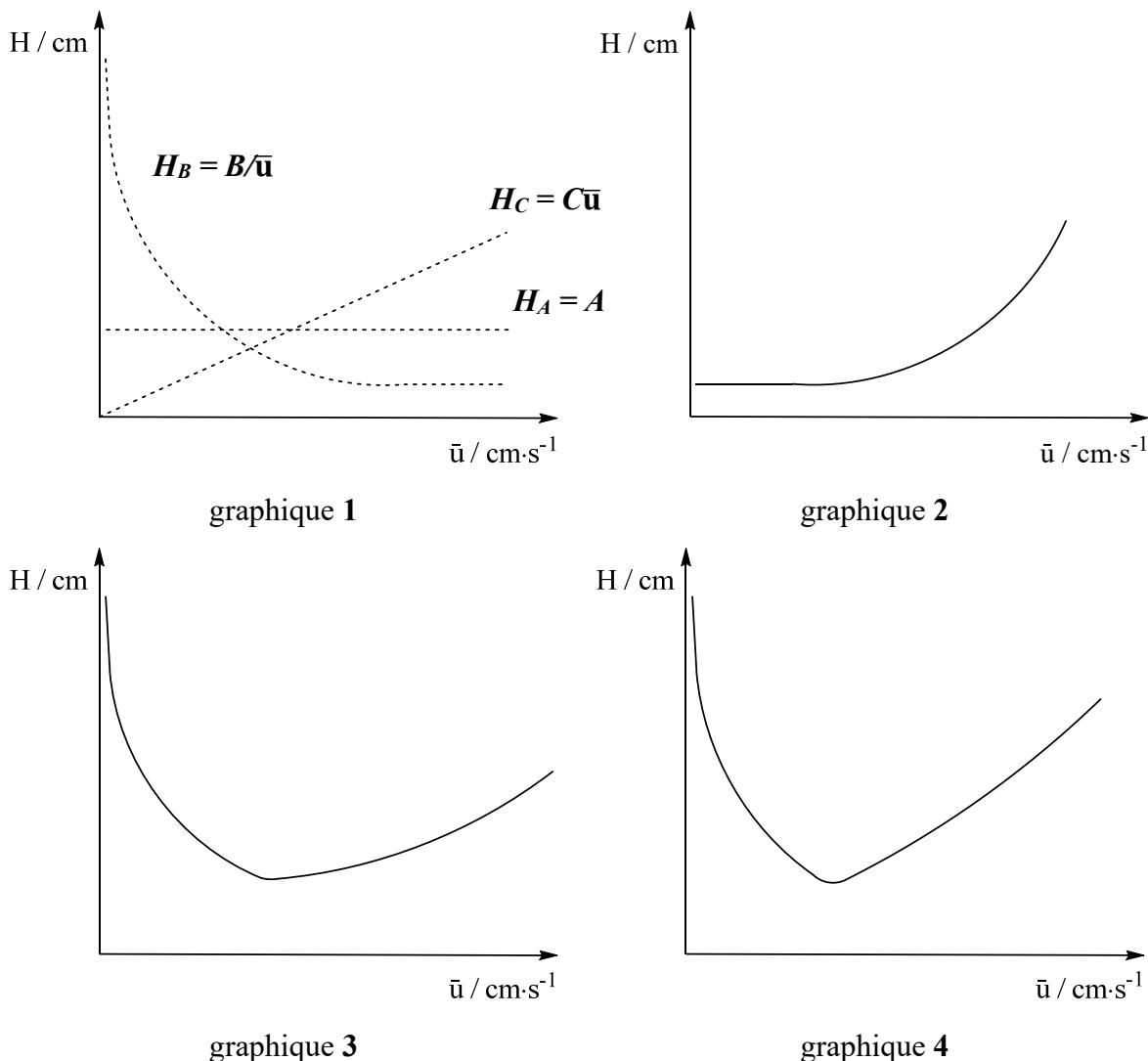
### I.3. Aspects cinétiques de la chromatographie

D'un point de vue cinétique, la séparation d'un mélange de solutés est régie par l'équation de Van Deemter. Elle représente la variation de la hauteur équivalente à un plateau théorique **H** en fonction la vitesse linéaire d'écoulement moyenne de la phase mobile  $\bar{u}$  à travers la phase stationnaire.

Ecrire l'équation de Van Deemter  $H = f(\bar{u})$  en fonction des constantes **A**, **B** et **C** qui décrivent le comportement du couple soluté/colonne chromatographique.

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C\bar{u}$$

L'équation de Van Deemter peut se décomposer en trois termes **H<sub>A</sub>**, **H<sub>B</sub>** et **H<sub>C</sub>**. Sur le graphique 1, dessiner l'allure de **H<sub>A</sub>**, **H<sub>B</sub>** et **H<sub>C</sub>** en donnant leurs expressions en fonction de **A**, **B**, **C** et  $\bar{u}$ .



Les graphiques 2, 3 et 4 représentent les courbes de Van Deemter de diverses colonnes chromatographiques. Les caractéristiques de ces courbes sont données ci-dessous :

	$\bar{u}_{opt} / \text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$	$H_{min} / \text{cm}$
<b>Graphique 2</b>	le plus petit possible	non clairement défini
<b>Graphique 3</b>	$\sqrt{\frac{B}{C}}$	$2\sqrt{BC}$
<b>Graphique 4</b>	$\sqrt{\frac{B}{C}}$	$A + 2\sqrt{BC}$

Associer chaque graphique 2 à 4 à la colonne chromatographique correspondante en entourant la ou les réponse(s) qui convient/conviennent :

graphique 2 : colonne GC capillaire / colonne HPLC / colonne IC / **colonne SEC**

graphique 3 : **colonne GC capillaire** / colonne HPLC / colonne IC / colonne SEC

graphique 4 : colonne GC capillaire / **colonne HPLC** / **colonne IC** / colonne SEC

Répondre aux affirmations suivantes :

	Vrai	Faux
▪ En chromatographie GC sur colonne capillaire, le minimum de la courbe de Van Deemter est fixé par le point de concours des courbes représentant <b>H<sub>B</sub></b> et <b>H<sub>C</sub></b> .	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▪ En chromatographie HPLC le minimum de la courbe de Van Deemter est fixé par la constante représentant la diffusion d'Eddy.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▪ La chromatographie IC est la chromatographie en phase liquide qui présente la constante <b>C</b> la plus petite.	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
▪ En chromatographie SEC, pour séparer correctement de grosses macromolécules, il faut appliquer un débit de phase mobile le plus grand possible.	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
▪ La chromatographie SFC sur colonne HPLC est moins performante, en termes de nombre de plateaux théoriques, que la chromatographie HPLC classique.	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

## II. Analyse de résidus d'explosifs d'une zone d'entraînement militaire par chromatographies GC et HPLC

Dans le cadre de l'analyse de la pollution d'une zone d'entraînement militaire, on s'intéresse à la détermination de la teneur en explosifs nitrés contenus dans le sol de l'exploitation. Les produits nitrés d'intérêts sont présentés dans le tableau suivant :

Substance	TNT	RDX	MNX	DNX	TNX
Structure					
<b>M (g·mol<sup>-1</sup>)</b>	227,13	222,12	206,12	190,12	174,12
<b>T<sub>eb</sub> (°C)</b>	240	320	279	237	194
<b>Log (P)<sup>#</sup></b>	1,587	-2,044	-1,221	-0,368	0,515

<sup>#</sup>  $\log(P_J) = \log ([J]_{\text{oil}}/[J]_{\text{water}})$  caractérise la polarité de J

Les explosifs comme le SEMTEX par exemple sont à base de TNT et de RDX. Le MNX, DNX et TNX sont les produits issus de la biodégradation du RDX. Bien que tous ces composés soient très polaires, ils sont analysés par GC puis ensuite, pour comparaison, par HPLC. Pour ces deux types d'analyse, les substances organiques sont d'abord extraites par de l'acétonitrile puis cette phase, préalablement filtrée, est engagée en chromatographie GC et HPLC.

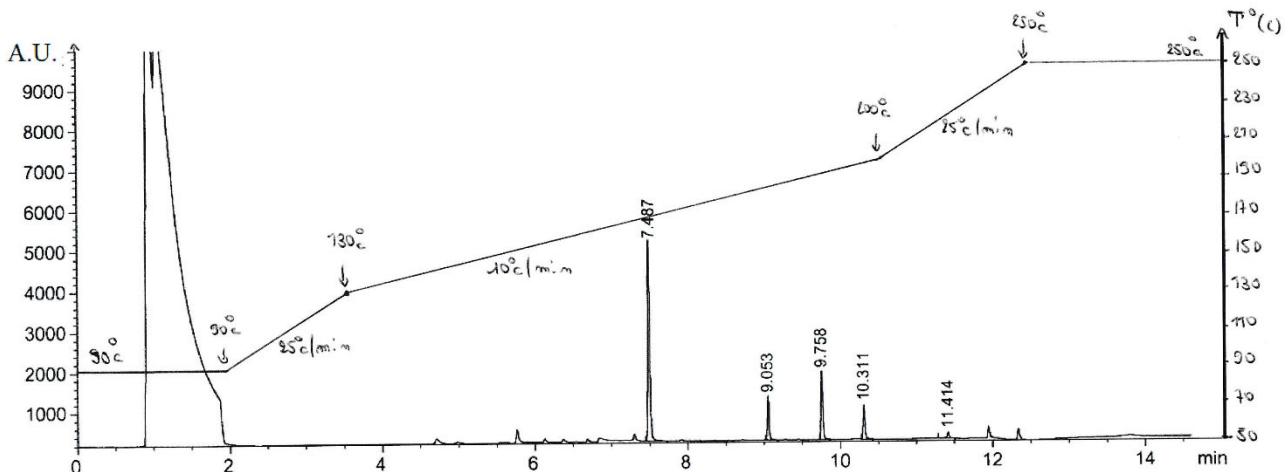
## II.1. Analyse par chromatographie GC

L'extrait à l'acétonitrile est analysé avec les conditions GC suivantes :

Colonne GC	WCOT HP-1 de 0,25 mm de diamètre et de 30 m de longueur
Phase stationnaire	Film de polydiméthylsiloxane pur (PDMS) de 0,25 µm d'épaisseur
Phase mobile	He à $\bar{u} = 80 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$
Elution	Programmation de température : voir sur le chromatogramme
Détection	ECD

Ci-dessous le chromatogramme de l'échantillon analysé où l'on a identifié les composés suivants : TNT, RDX, MNX, DNX et TNX.

Sur ce chromatogramme figure le programme de température utilisé pour réaliser l'analyse GC.



A partir des caractéristiques de la colonne GC et de la phase mobile, déterminer le temps mort de la colonne. Exprimer le résultat en minutes, arrondir à trois chiffres après la virgule.

$$t_M = \frac{L}{\bar{u}} = \frac{3000}{80} = 37,500 \text{ s} \Rightarrow 0,625 \text{ min}$$

Quelle est la nature du pic situé entre 0,8 et 2 minutes ?

*Il s'agit du solvant d'extraction, l'acétonitrile.*

En vous basant sur les pics **1** et **5** situés à 7,487 et à 11,414 minutes, déterminer le domaine de **k'** de l'analyse chromatographique. Donner les valeurs arrondies à trois chiffres après la virgule.

$$k'_{(1)} = \frac{t_{R(1)} - t_M}{t_M} = \frac{7,487 - 0,625}{0,625} = 10,979$$

$$k'_{(5)} = \frac{t_{R(5)} - t_M}{t_M} = \frac{11,414 - 0,625}{0,625} = 17,262$$

Le domaine de **k'** vous paraît-il optimum ?

*Non car dans le meilleur des cas on devrait avoir :  $2 \leq k' \leq 10$ .*

Quel serait le temps de rétention d'un composé pour lequel  $k' = 2$  ? Donner le résultat arrondi à trois chiffres après la virgule.

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \Rightarrow t_R = t_M + k' t_M$$

$$t_R = 0,625 + 0,625 \times 2 = 1,875 \text{ min}$$

Ce pic aurait-il été facilement identifiable ?

*Non car il aurait été masqué par le signal du solvant.*

En considérant l'interaction solutés/phase stationnaire comme principal mécanisme de rétention, remplir le tableau suivant :

Pic	1	2	3	4	5
$t_R$ (min)	7,487	9,053	9,758	10,311	11,414
w (min)	0,060	0,088	0,101	0,110	0,129
Substance	RDX	MNX	DNX	TNX	TNT

En considérant que les solutés présentent tous la même interaction avec la phase stationnaire, remplir le tableau suivant :

Pic	1	2	3	4	5
$t_R$ (min)	7,487	9,053	9,758	10,311	11,414
w (min)	0,060	0,088	0,101	0,110	0,129
Substance	TNX	DNX	TNT	MNX	RDX

Pour déterminer quel est le mécanisme de rétention qui gouverne la séparation, on se base sur l'indice de Kovats du composé qui ne fait pas partie de la même famille chimique, le TNT. L'indice de Kovats du TNT, analysé dans les mêmes conditions chromatographiques est :  $I_{TNT} = 1704$ .

Une série d'alcanes linéaires analysés dans les mêmes conditions chromatographiques dans le domaine de temps considéré donne les résultats présentés dans le tableau suivant.

Compléter ce tableau en donnant l'indice de Kovats relatif à chaque alcane :

Alcane	$t_R$ (min)	w ( min)	I
C <sub>14</sub>	6,291	0,055	<b>1400</b>
C <sub>15</sub>	7,433	0,060	<b>1500</b>
C <sub>16</sub>	8,572	0,083	<b>1600</b>
C <sub>17</sub>	9,710	0,105	<b>1700</b>
C <sub>18</sub>	10,850	0,113	<b>1800</b>
C <sub>19</sub>	11,991	0,130	<b>1900</b>
C <sub>20</sub>	13,134	0,147	<b>2000</b>

Dans les conditions chromatographiques et le domaine de temps considérés, l'indice de Kovats I<sub>x</sub> d'un soluté x est donné par :

- $I_x = 100n + 100 \left( \frac{\ln(t'_{R(x)}) - \ln(t'_{R(C_n)})}{\ln(t'_{R(C_{n+1})}) - \ln(t'_{R(C_n)})} \right)$  □
- $I_x = 100n + 100 \left( \frac{\ln(t_{R(x)}) - \ln(t_{R(C_n)})}{\ln(t_{R(C_{n+1})}) - \ln(t_{R(C_n)})} \right)$  □
- $I_x = 100n + 100 \left( \frac{t'_{R(x)} - t'_{R(C_n)}}{t'_{R(C_{n+1})} - t'_{R(C_n)}} \right)$  □
- $I_x = 100n + 100 \left( \frac{t_{R(x)} - t_{R(C_n)}}{t_{R(C_{n+1})} - t_{R(C_n)}} \right)$  ■

A l'aide de son indice de Kovats, calculer le temps de rétention brut du TNT (I<sub>TNT</sub> = 1704).

$$I_{TNT} = 1700 + 100 \left( \frac{t_{R(TNT)} - t_{R(C_{17})}}{t_{R(C_{18})} - t_{R(C_{17})}} \right)$$

$$t_{R(TNT)} = t_{R(C_{17})} + (t_{R(C_{18})} - t_{R(C_{17})}) \left( \frac{I_{TNT} - 1700}{100} \right)$$

$$t_{R(TNT)} = 9,710 + (10,850 - 9,710) \left( \frac{1704 - 1700}{100} \right)$$

$$t_{R(TNT)} = 9,756 \text{ min}$$

Basé sur le temps de rétention du TNT et sur les différents ordres d'élution proposés, cocher la ou les case(s) qui convient/conviennent.

- L'interaction solutés/phase stationnaire est le principal mécanisme de rétention.
- La séparation s'effectue selon l'ordre croissant des températures d'ébullition
- Tous les solutés présentent la même interaction avec la phase stationnaire.
- Tous les solutés présentent des interactions différentes avec la phase stationnaire.

Pour quantifier le TNT et le RDX, on procède par étalonnage interne. On choisit un étalon, le 2,6-diméthynaphtalène (DMN) dont le temps de rétention se situe en plein milieu de la fenêtre de temps chromatographique. Les caractéristiques chromatographiques de cette substance sont les suivantes :  $t_R = 9,596 \text{ min}$  ;  $w = 0,098 \text{ min}$  ;  $I_{(DMN)} = 1690$ .

Cette substance peut-elle servir d'étalon interne pour effectuer une mesure quantitative ? Justifier votre réponse par le calcul en donnant le(s) résultat(s) arrondis à trois chiffres après la virgule.

*Attendu que l'étalon choisi est loin des deux substances à doser, il ne faut s'intéresser qu'au deux produits qui entourent cet étalon. Pour se faire on doit calculer les résolutions suivantes :*

$$R_{s(E,2)} = \frac{t_{R(E)} - t_{R(2)}}{1 / 2(w_{(E)} + w_{(2)})} = \frac{2(t_{R(E)} - t_{R(2)})}{w_{(E)} + w_{(2)}} = \frac{2(9,596 - 9,053)}{0,098 + 0,088} = 5,839$$

$$R_{s(3,E)} = \frac{t_{R(3)} - t_{R(E)}}{1 / 2(w_{(3)} + w_{(E)})} = \frac{2(t_{R(3)} - t_{R(E)})}{w_{(3)} + w_{(E)}} = \frac{2(9,758 - 9,596)}{0,101 + 0,098} = 1,628$$

*Comme les deux résolutions sont supérieures à 1,5, alors oui, le 2,6-diméthylnaphtalène peut être utilisé comme étalon interne.*

## II.2. Analyse par chromatographie HPLC

Le même échantillon (extrait de sol par l'acétonitrile contenant du TNT, RDX, MNX, DNX et TNX ) est analysé par HPLC. Les conditions chromatographiques sont les suivantes :

<b>Colonne HPLC</b>	Supelco de 4,6 mm de diamètre, 250 mm de longueur et de porosité $\varepsilon = 0,40$
<b>Phase stationnaire</b>	Particules C <sub>18</sub> de 5 µm à base SiO <sub>2</sub> avec écrantage des silanols résiduels par endcapping
<b>Phase mobile</b>	Méthanol (60%) / solution aqueuse d'acide acétique à 1 mM (40%)
<b>Elution</b>	Mode isocratique à 0,5 mL·min <sup>-1</sup> à température ambiante
<b>Détection</b>	MS

Cocher la ou les case(s) qui convient/convienent.

Il s'agit d'une phase stationnaire :

- normale
- inverse
- apolaire
- polaire

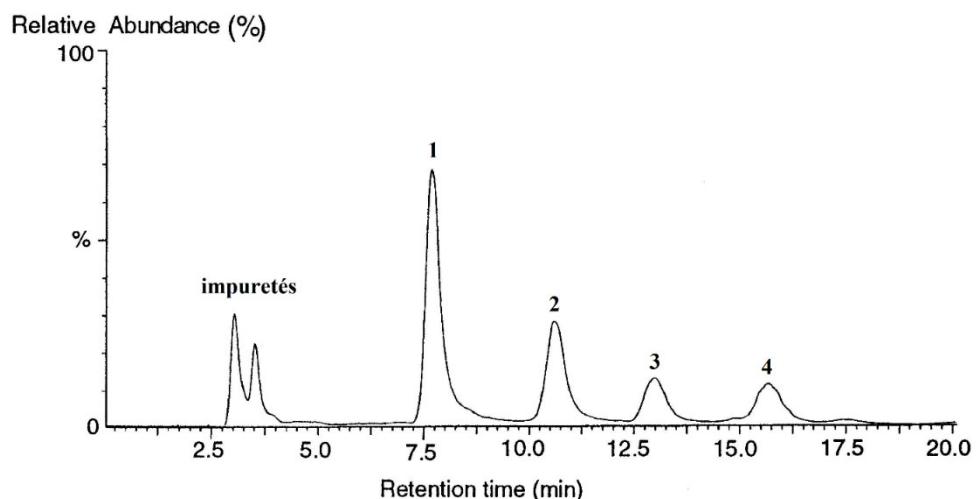
Le couple solvant de base/solvant sélectif de la phase mobile est :

- méthanol/solution aqueuse d'acide acétique à 1 mM
- solution aqueuse d'acide acétique à 1 mM/méthanol

Donner l'ordre d'élution ( $t_R$  croissants) attendu.

**RDX / MNX / DNX / TNX / TNT**

Le chromatogramme obtenu est donné ci-après :



La détection par spectrométrie de masse a permis de qualifier les pics 1 à 4 :

Pic n°	1	2	3	4
Composé	TNX	DNX	MNX	RDX

L'ordre d'élution obtenu est-il celui attendu ?

- oui
- non

Attendu que l'acide acétique est connu comme agent de pair d'ions, expliquer succinctement son rôle sur l'ordre d'élution obtenu.

*Il apparaît que le composé qui possède le plus de groupe NO<sub>2</sub> est celui qui est le plus retenu. En revanche, celui qui n'en possède pas est élué en premier. Dès lors, on peut raisonnablement penser que l'acide acétique se lie au groupement NO<sub>2</sub> par sa fonction carboxylique. En conséquence, c'est le CH<sub>3</sub> de l'acide carboxylique qui interagit avec la phase stationnaire, le plus de CH<sub>3</sub>, le plus apolaire et donc le plus retenu.*

Sur le chromatogramme, le signal du TNT n'apparait pas. En prenant en compte aussi le chromatogramme GC, choisir parmi les affirmations celles qui vous semblent correctes :

- Le temps de rétention du TNT est plus petit que celui du TNX.
- Le temps de rétention du TNT se situe entre celui du TNX et celui du RDX.
- Le temps de rétention du TNT est plus grand que celui du RDX.
- Le signal du TNT est masqué par les impuretés situées entre 2,5 et 4 minutes.
- Le signal du TNT est masqué par un des pics 1 à 4.
- Le signal du TNT se situe au-delà des 20 minutes de l'analyse chromatographique.
- Le signal du TNT n'est pas détecté car il est beaucoup moins concentré que le TNX, DNX, MNX et le RDX.
- Le signal du TNT sature le spectromètre de masse utilisé comme détecteur.

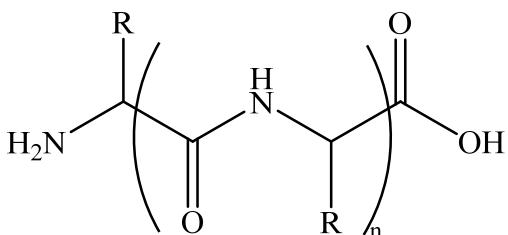
### II.3. Chromatographie GC versus chromatographie HPLC

Pour l'étude qui nous intéresse, choisir la méthode chromatographique la plus adaptée en cochant les cases qui conviennent :

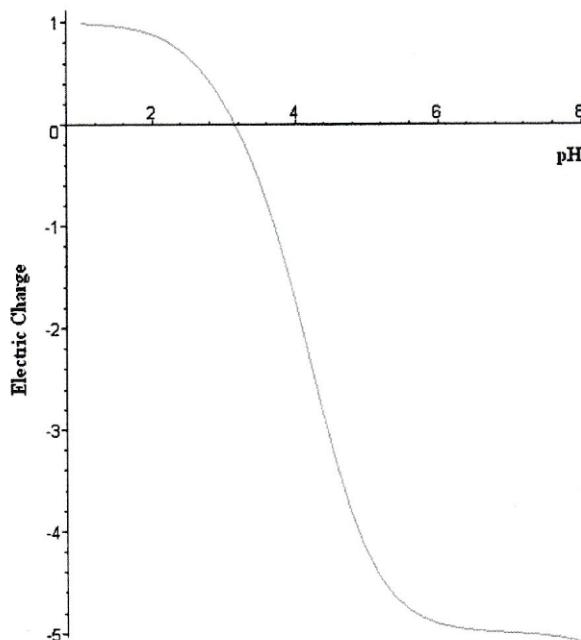
	GC	HPLC
En vous basant sur la volatilité des substances étudiées		✓
En vous basant sur la polarité des substances étudiées		✓
En vous basant sur la masse molaire des substances étudiées	✓	✓
En vous basant sur la dangerosité des substances étudiées		✓
En vous basant sur le mode d'élution		✓
En vous basant sur l'efficacité de la séparation (nombre de plateaux théoriques)	✓	
En vous basant sur la résolution atteignable	✓	
En vous basant sur la sensibilité de détection	✓	
En vous basant sur la méthode d'étalonnage		✓
En vous basant sur le temps d'analyse	✓	

### III. Analyse de peptides par chromatographies IC et SEC

On s'intéresse à l'analyse de peptides obtenus par bio-ingénierie. Ces peptides, potentiellement utilisables pour des applications thérapeutiques, sont constitués de 31 acides aminés dont les structures sont données ci-après :

	R = -H (glycine <b>G</b> ) R = -CH <sub>3</sub> (alanine <b>A</b> ) R = -CH-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (valine <b>V</b> ) R = -CH <sub>2</sub> -CH-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (leucine <b>L</b> ) R = -CH <sub>2</sub> -Ph (phényalanine <b>F</b> ) R = -CH <sub>2</sub> -COOH (acide aspartique <b>D</b> ) R = -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH (acide glutamique <b>E</b> )
---	--

Tous ces peptides possèdent quatre fonctions acides (**EEEE**) en plus du C-terminal (**D**). Les autres acides aminés présents sont une distribution des acides aminés neutres **G**, **A**, **V**, **L**, et **F**. La courbe ci-dessous représente la charge de ces peptides en fonction du pH de la solution dans laquelle ils sont dissous :



Le point de charge nulle de ces peptides est observé à pH = 3,15.

La masse molaire de ces peptides est comprise entre 2132,90 et 4476,12 g·mol<sup>-1</sup>

### III.1. Analyse par chromatographie IC

Dans un premier temps, on étudie la possibilité de séparer ce mélange de peptides par chromatographie IC.

Bien que ces peptides possèdent des masses molaires supérieures à 2000 g·mol<sup>-1</sup>, on peut les séparer par chromatographie IC. Expliquer brièvement pourquoi.

***Car il s'agit de substances ionisables hydrosolubles.***

Quelle fonction est responsable de la présence d'une charge positive sur ces peptides à pH < 3,15 ?

***Il s'agit du groupe amino -NH<sub>2</sub> qui se protonne en -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>.***

Parmi les propositions suivantes, choisir le couple phase stationnaire/éluant à utiliser pour réaliser cette chromatographie lorsque le pH de la solution de peptides est ajusté à pH < 3,15.

- Résine -SO<sub>3</sub><sup>-</sup> / HCl dilué
- Résine -SO<sub>3</sub><sup>-</sup> / KOH dilué
- Résine -NR<sub>3</sub><sup>+</sup> / HCl dilué
- Résine -NR<sub>3</sub><sup>+</sup> / KOH dilué.

Parmi les propositions suivantes, choisir le couple phase stationnaire/éluant à utiliser pour réaliser cette chromatographie lorsque le pH de la solution de peptides est ajusté à pH > 3,15.

- Résine -SO<sub>3</sub><sup>-</sup> / HCl dilué
- Résine -SO<sub>3</sub><sup>-</sup> / KOH dilué
- Résine -NR<sub>3</sub><sup>+</sup> / HCl dilué
- Résine -NR<sub>3</sub><sup>+</sup> / KOH dilué.

En tenant compte de la nature des groupes ioniques des phases stationnaires proposées et lorsque le pH de la solution de peptides est ajusté à pH < 3,15, l'ordre d'élution (*t<sub>R</sub>* croissant) est :

***Par masse molaire croissante***

En tenant compte de la nature des groupes ioniques des phases stationnaires proposées et lorsque le pH de la solution de peptides est ajusté à pH > 3,15, l'ordre d'élution (*t<sub>R</sub>* croissant) est :

***Par masse molaire croissante car ils auront toujours la même charge car tous constitués du même nombre d'acides aminés acides.***

L'ordre d'élution des cations et des anions est régi par l'équation suivante :

$$\log\left(k'_{(J,x)}\right) = \frac{1}{y} \log\left(K_{E^{y\pm}}\right) + \frac{x}{y} \log\left(\frac{C_D}{y}\right) - \frac{x}{y} \log\left(\left[E^{y\pm}\right]_M\right) + \log(\Phi_{SM})$$

En vous basant sur cette équation et sur la nature des phases stationnaires et mobiles proposées (-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, KOH, -NR<sub>3</sub><sup>+</sup>, HCl), répondre aux affirmations suivantes :

	<b>Vrai</b>	<b>Faux</b>
▪ Diminuer la capacité disponible de la colonne serait un avantage pour réduire le temps de chromatographie lors d'une séparation réalisée avec un éluant à pH = 6.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▪ Diminuer la capacité disponible de la colonne serait un avantage pour réduire le temps de chromatographie lors d'une séparation réalisée avec un éluant à pH = 2.	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
▪ Avec les deux phases stationnaires proposées, on peut jouer sur le pH de l'éluant pour changer la capacité disponible de la colonne.	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
▪ Pour chromatographier plus vite, on doit diminuer la concentration de l'ion éluant.	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
▪ Plus la charge des solutés est faible, plus la chromatographie est rapide.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Parmi les pHs des éluants suivants, choisir le plus adapté à notre étude :

- pH = 2 ■
- pH = 4 □
- pH = 6 □
- pH = 8 □

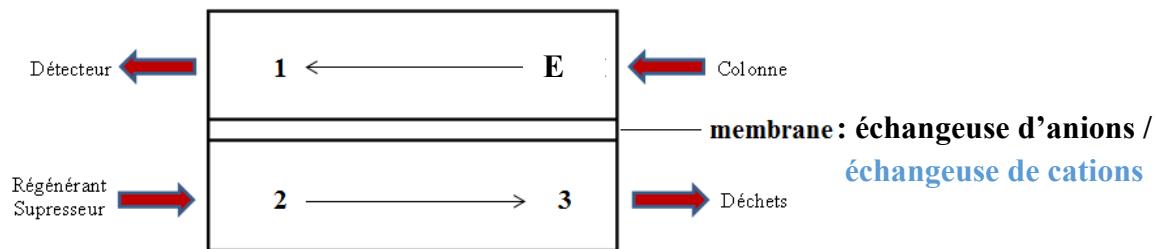
La séparation est mise en œuvre avec HCl ou KOH selon le pH que vous avez choisi. Concernant ces deux éluants, ce sont :

- des éluants faiblement conducteurs
- des éluants fortement conducteurs
- des éluants qui nécessitent l'utilisation d'un suppresseur lors d'une détection conductométrique
- des éluants qui ne nécessitent pas l'utilisation d'un suppresseur lors d'une détection conductométrique

Concernant l'utilisation d'un suppresseur dans la chaîne chromatographique, répondre aux affirmations suivantes :

	Vrai	Faux
▪ Le suppresseur se situe entre la colonne chromatographique et le détecteur.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▪ Le suppresseur ne participe pas à la variance observée sur les pics chromatographiques.	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
▪ L'utilisation d'un suppresseur à résine échangeuse d'ions permet de garantir une influence minimale sur la résolution chromatographique.	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
▪ Lors de la séparation de solutés cationiques, un suppresseur à résine échangeuse d'ions est constitué par une colonne échangeuse de cations.	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
▪ Un suppresseur à membrane possède un volume mort plus petit qu'un suppresseur à résine échangeuse d'ions.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▪ Un suppresseur à membrane est recommandé pour garantir une bonne résolution lors d'une séparation difficile.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Le schéma ci-dessous retrace le fonctionnement d'un suppresseur à membrane utilisé lors de la séparation chromatographique. Compléter ce schéma avec l'éluant E que vous avez choisi précédemment.



**E : HCl / KOH**

**1 : H<sub>2</sub>O**

**2 : NaOH ou KOH ou NaHCO<sub>3</sub> / HCl ou HClO<sub>4</sub> ou HNO<sub>3</sub> ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**

**3 : NaCl ou KCl ou Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> / KCl ou KClO<sub>4</sub> ou KNO<sub>3</sub> ou K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**

### III.2. Analyse par chromatographie SEC

Pour séparer les différents peptides obtenus par bio-ingénierie, on procède par chromatographie SEC à l'aide d'une phase stationnaire dont la taille des pores convient à la séparation de molécules dont la masse molaire s'étend entre 2000 et 5000 g·mol<sup>-1</sup>.

Cocher la ou les case(s) qui convient/conviennent.

En vous basant sur la nature des produits à séparer, le solvant constituant l'éluant est :

▪ une phase aqueuse



▪ un solvant organique



En vous basant sur la nature des produits à séparer et sur la nature de l'éluant, la phase stationnaire est :

- une phase stationnaire hydrophobe (PS-DVB)
- une phase stationnaire hydrophile (polyholosides)

Il s'agit d'une chromatographie SEC par :

- filtration sur gel (GFC)
- perméation de gel (GPC)

La chromatographie SEC est plutôt dédiée à la séparation de solutés dont les masses molaires sont :

- $M < 2000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- $M > 2000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Remplir le tableau suivant dans le cas d'une séparation SEC par exclusion pure :

Volume de phase mobile effective	<b><i>volume interstitiel</i></b> $V_i$
Volume de phase stationnaire effective	<b><i>volume des pores</i></b> $V_p$
Volume d'exclusion totale	$V_i = V_M$
Volume de perméation totale	$V_i + V_p = V_{mo}$
$K_D$ minimum	$K_D = 0$ ou $K_D \rightarrow 0$
$K_D$ maximum	$K_D = 1$
$k'$ minimum	$k' = 0$
$k'$ maximum	$k' = V_p / V_i$

On choisit une colonne dont le diamètre interne vaut 7,5 mm et dont la longueur est de 30 cm. Le volume interstitiel représente 70% du volume de la colonne. Le volume des pores représente 25% du volume de la colonne.

Remplir le tableau suivant dans le cadre d'une séparation SEC par exclusion pure en donnant les valeurs arrondies à deux chiffres après la virgule :

Volume de la colonne (mL)	<b>13,25 mL</b>
Volume de phase mobile effective (mL)	<b>9,28 mL</b>
Volume de phase stationnaire effective (mL)	<b>3,31 mL</b>
Volume de phase stationnaire physique (mL)	<b>0,66 mL</b>
Volume mort (mL)	<b>9,28 mL</b>
Volume de perméation totale (mL)	<b>12,59 mL</b>
<b>k'</b> minimum	<b>0</b>
<b>k'</b> maximum	<b>0,36</b>

$$\text{Le volume de la colonne est : } V_c = \pi r^2 L = \pi \times (0,375)^2 \times 30 = 13,25 \text{ cm}^3 = 13,25 \text{ mL}$$

La chromatographie réalisée à  $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  révèle que les temps de rétention bruts sont compris entre 19,05 et 24,52 minutes. Calculer le domaine de  $K_D$  en donnant les valeurs arrondies à deux chiffres après la virgule.

$$V_{R(\text{peptides})} = V_i + K_{D(\text{peptides})} V_p \Rightarrow K_{D(\text{peptides})} = \frac{V_{R(\text{peptides})} - V_i}{V_p}$$

Il faut convertir les temps de rétentions bruts en volume de rétention :  $V_{R(M)} = t_{R(M)} F_V$ . Comme  $F_V$  vaut  $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , alors on aura :  $9,53 \text{ mL} \leq V_{R(\text{peptides})} \leq 12,26 \text{ mL}$  soit  $0,08 \leq K_{D(\text{peptides})} \leq 0,90$

En vous basant sur tout ce qui précède, répondez aux affirmations suivantes :

	Vrai	Faux
▪ Pour vérifier le volume mort de la colonne SEC calculé, je dois utiliser une substance telle que D <sub>2</sub> O.	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
▪ Le facteur de rétention $k'$ maximum est inférieur à 1.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▪ La séparation est sous contrôle enthalpique.	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
▪ Un marqueur de perméation totale doit présenter un temps de rétention de 25,18 minutes.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▪ Une macromolécule qui présente un temps de rétention de supérieur à 25,18 minutes n'est pas séparée par un mécanisme d'exclusion pure.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

### III.3. Chromatographie IC versus chromatographie SEC

Pour l'étude qui nous intéresse, choisir la méthode chromatographique la plus adaptée en cochant les cases qui conviennent :

	IC	SEC
En considérant le domaine des masses molaires des peptides séparés		✓
Si les masses molaires des peptides à séparer sont proches (différence inférieure à 10%)	✓	
Si l'on veut déterminer facilement la masse molaire des peptides analysées		✓
En vous basant sur l'efficacité de la séparation (nombre de plateaux théoriques)	✓	
En vous basant sur la résolution atteignable	✓	