

Exercice 7.1 – Chromatographie d'exclusion de taille

On a séparé un mélange de protéines sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille BioSep-SEC-S3000 (Phenomenex, 90501 Torrance, CA – USA). Des quantités équivalentes de ces protéines ont été dissoutes dans un tampon NaH_2PO_4 50 mM, pH 6.8 avant d'être injectées (vol. d'échantillon = 20 μl) dans la colonne. L'élution s'est faite à un débit de 0.5 ml/min et la détection dans l'UV à 280 nm.

On a mesuré les volumes d'élution de ces différentes molécules. Ils sont donnés dans le tableau ci-dessous.

	PM [Da]	V_r [ml]		
Thyroglobuline	670000	4.01		
Lactate déshydrogénase	143000	8.57		
Phosphorylase b	97000	9.44		
BSA	68000	10.73		
Péroxydase raifort	40000	11.96		
Myoglobine	17000	14.31		
Insuline	5700	17.02		
Cyanocobalamine	1350	21.09		

Tableau 7.1: Poids moléculaire et volume d'élution de différentes molécules

- On a ensuite injecté dans les mêmes conditions une protéine inconnue. Son volume d'élution est de 13.2 ml. Quel est son poids moléculaire ?
- A l'inverse, quel serait le volume d'élution de l'uréase du haricot-sabre (jackbean), dont le poids moléculaire vaut 480 kDa (entité multimérique) ?

Exercice 7.2 – Echangeur d'anions

La diéthylaminoéthylcellulose (DEAE-cellulose) est un support échangeur d'anions, obtenu en substituant la cellulose par des groupements diéthylaminoéthyle :

- Quelle est le pourcentage de radicaux DEAE chargés positivement aux pH suivants: 2, 7, 9.4 et 12? (on considère que le pK de l'amine tertiaire du groupement DEAE est de 9.4)
- Parmi les protéines ci-dessous quelles sont celles qui, à pH 7, sont retenues par la DEAE-cellulose? (on considérera que les seules interactions sont de type électrostatique)
 1. Sérumalbumine ($\text{pl} = 4.9$)
 2. Uréase ($\text{pl} = 5$)
 3. Chymotrypsinogène ($\text{pl} = 9.5$)

Exercice 7.3 – Calculs fondamentaux

Les chercheurs de Alden Botanica ont séparé par HPLC les kavalactones d'un extrait alcoolique de racines de Kava (*Piper methysticum*) provenant de Hawaii. Le chromatogramme de cette séparation est donné à la Figure 7.3-1 : Les structures de ces kavalactones sont données à la Figure 7.3-2 et la composition de l'extrait est donnée au Tableau 7.3-1.

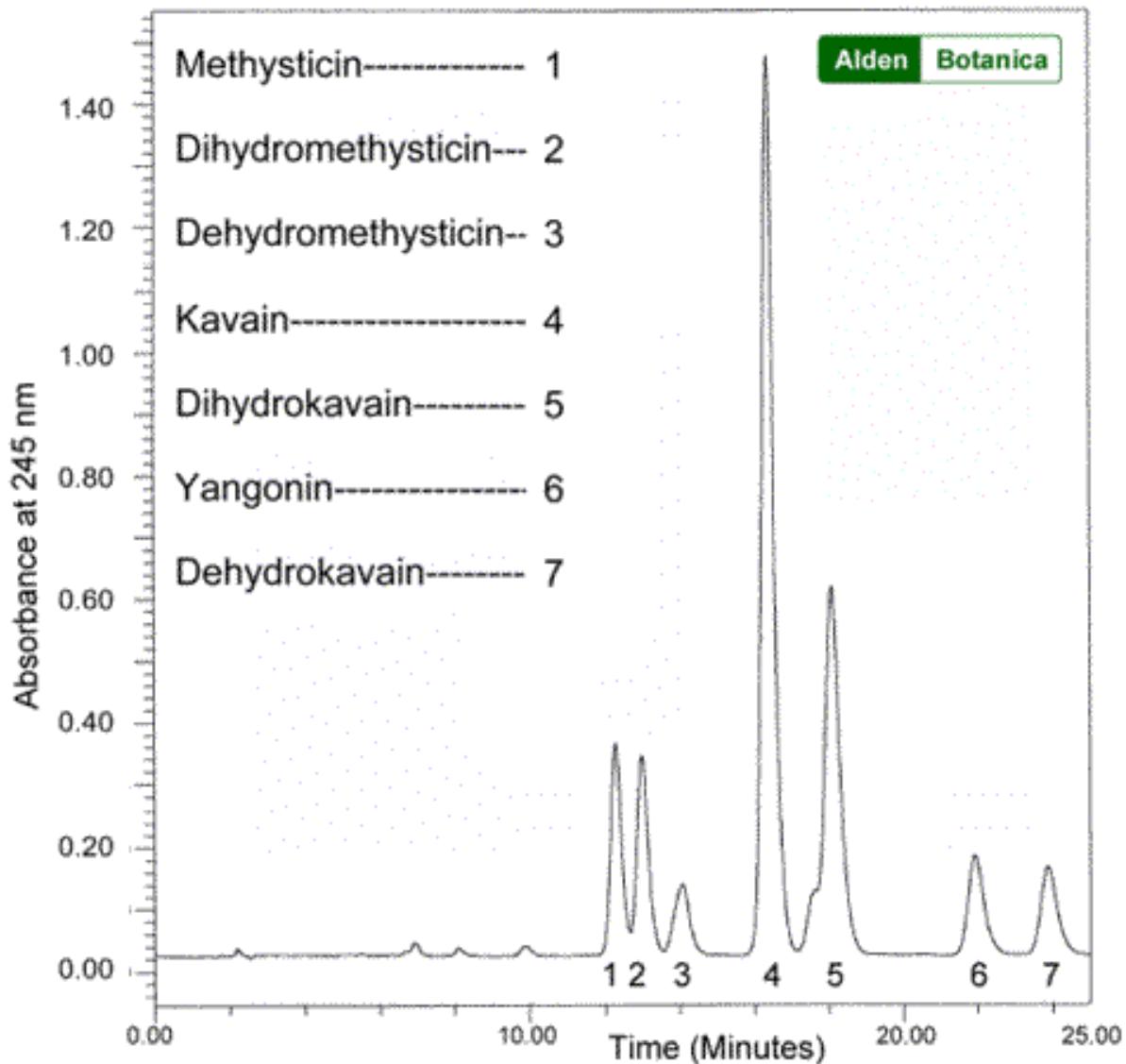


Figure 7.3-1: Chromatogramme HPLC de l'extrait alcoolique de Kava

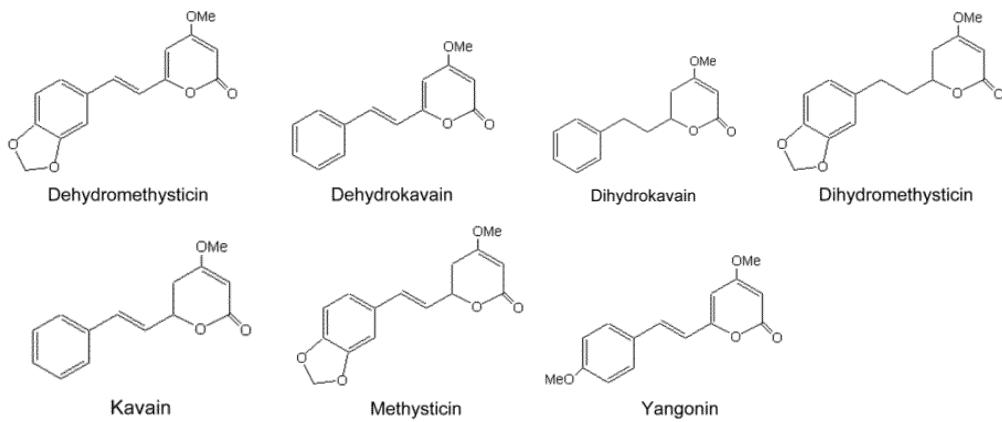


Figure 7.3-2 : Kavalactones extraites de *Piper methysticum*

Lactone	Distribution [%]
Methysticin	17.14
Dihydromethysticin	13.39
Dehydromethysticin	22.15
Kavain	29.48
Dihydrokavain	10.29
Yangonin	7.54
Dehydrokavain	17.14

Tableau 7.3-1 : Distribution des lactones dans l'extrait

Questions :

- Calculez la résolution des pics entre la Kavain et la Dihydrokavain
- Faites le même calcul pour la Yangonin et la Dehydrokavain

Exercice 7.4 – Nombre de plateaux théoriques

A partir du pic donné à la Figure 7.4-1, déterminez le nombre de plateaux théoriques de la colonne en utilisant deux formules différentes (l'une basée sur la largeur du pic à sa base, l'autre sur la largeur du pic à mi-hauteur).

- Les résultats obtenus sont-ils comparables ? Commentez.
- Si la colonne fait 30 cm de long, quelle est la hauteur équivalente d'un plateau théorique ?

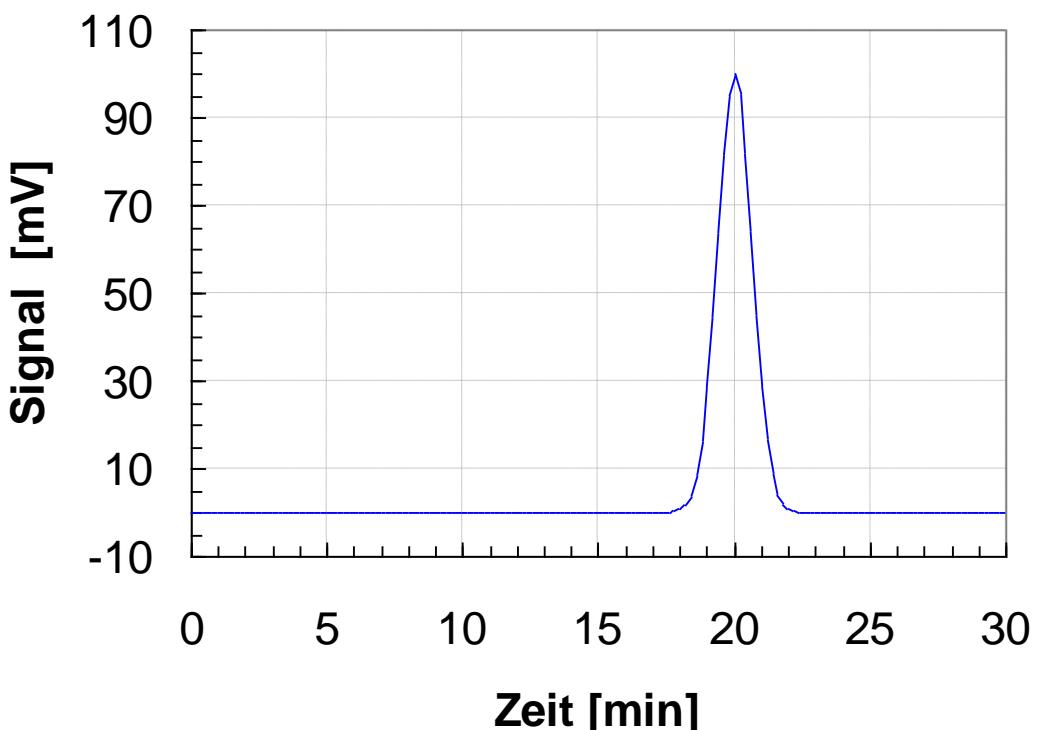


Figure 7.4-1: Chromatogramme

Exercice 7.5 – Equation de van Deemter

Dans une colonne de 37 cm de long et de 30 μm de diamètre interne remplie de particules de phase stationnaire de 1 μm de diamètre, on a évalué la hauteur équivalente d'un plateau théorique à diverses valeurs de la vitesse superficielle d'écoulement de la phase stationnaire u_s .

Les valeurs sont reportées dans le tableau ci-dessous pour l'hydroquinone et le catéchol.

- Déterminez les paramètres A, B et C de l'équation de van Deemter pour chacun de ces composés
- Développez l'équation donnant la valeur minimale de H
- Calculez la valeur minimale de H correspondant aux données du Tableau 7.4-1 pour chacun des deux composés

u_s [cm/s]	H hydroquinone [cm]	H catéchol [cm]
4.444E-02	2.241E-04	2.817E-04
6.486E-02	1.775E-04	2.314E-04
8.288E-02	1.656E-04	2.150E-04
9.970E-02	1.638E-04	2.003E-04
1.201E-01	1.629E-04	1.949E-04
1.357E-01	1.638E-04	1.903E-04
1.502E-01	1.610E-04	1.894E-04
1.670E-01	1.601E-04	1.939E-04
1.886E-01	1.647E-04	1.903E-04
2.066E-01	1.619E-04	1.921E-04
2.210E-01	1.674E-04	1.994E-04
2.366E-01	1.683E-04	2.095E-04
2.390E-01	1.656E-04	2.049E-04
2.595E-01	1.702E-04	2.003E-04
2.799E-01	1.674E-04	2.104E-04
2.991E-01	1.802E-04	2.077E-04

Table 7.4-1: Hauteur d'un plateau théorique H en fonction de la vitesse d'écoulement u_s pour l'hydroquinone et le catéchol. Tiré de Jerkovich A.D., Mellors J.S., and Jorgenson J.W. (2003): The Use of Micron-Sized Particles in Ultrahigh-Pressure Liquid Chromatography. Recent Developments in LC Column Technology, June 2003, 2-5

Exercice 7.6 – Violacéine

Rodrigues et al. (2012)⁽¹⁾ ont étudié le mélange violacéine/désoxyviolacéine produit par une souche recombinante *d'Escherichia coli* ainsi que par le producteur naturel *Janthinobacterium lividum* et ont caractérisé ses deux composants. A cours de leurs essais ils ont séparés une solution contenant 3.0 mg/L de violacéine (pic 1) et 9.75 mg/L (pic 2) de désoxyviolacéine. Le chromatogramme obtenu est montré ci-dessous.

Les conditions expérimentales de la séparation sont les suivantes:

Colonne : C₁₈ Hypersil ODS ($d_p = 5 \mu\text{m}$), 4.5 x 250 mm

Température: 30 °C

Eluant: H₂O : EtOH 50:50

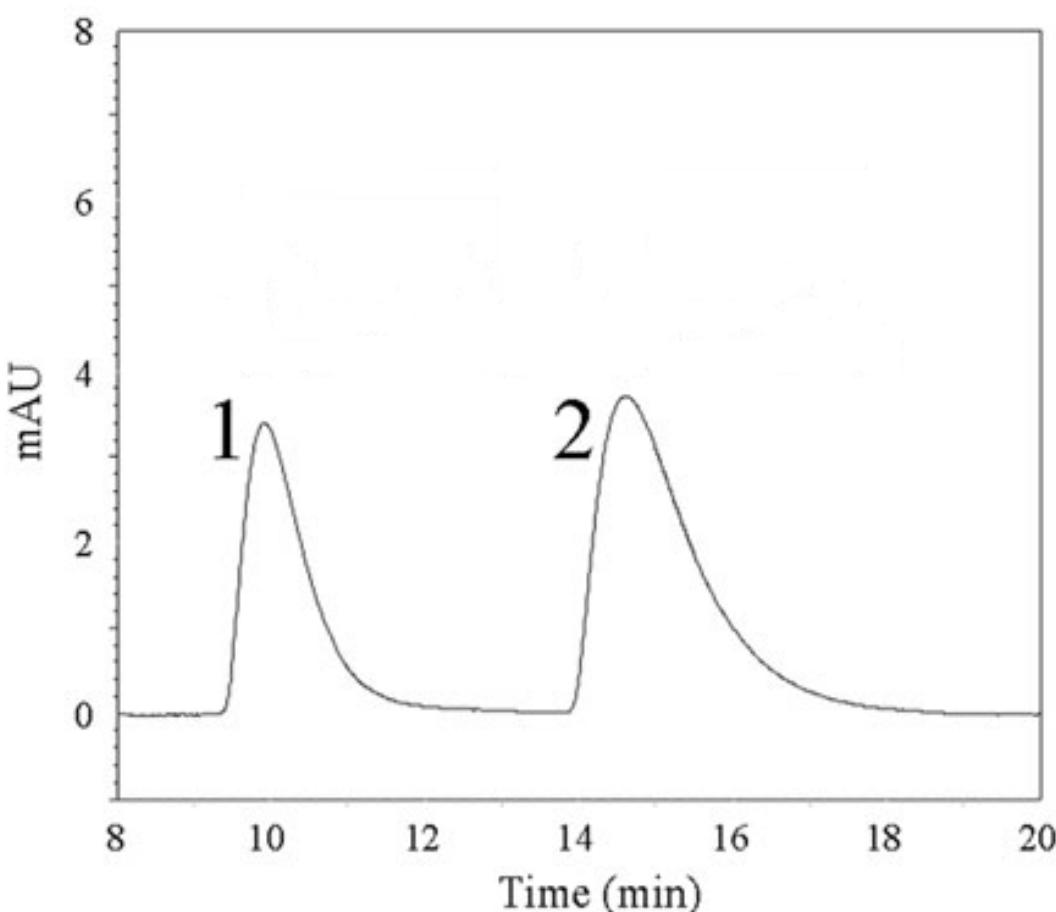
Débit: 0.5 ml/min

Vol. d'échantillon: 10 µl

Détection: DAD entre 200 et 700 nm

Sur la base de ces informations :

- Calculez le facteur d'asymétrie F_a des pics 1 et 2
- Déterminez la résolution de la séparation



- (1) A.L. Rodrigues et al., *Biotechnol. Lett.* **2012**, *34*, 717–720