

Exercices de TD Chromatographie liquide et Gaz

Exercice 1 - Chromatographie en phase liquide.

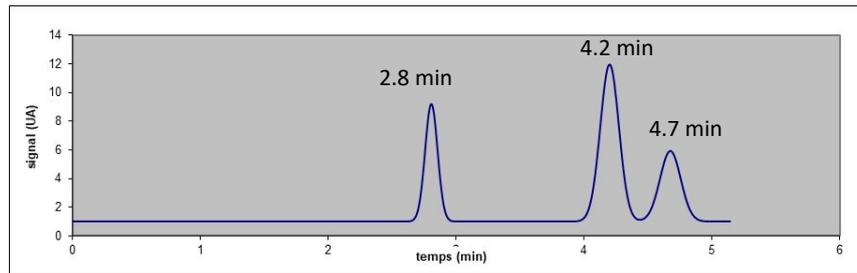
On souhaite réaliser des analyses sur une colonne de 5 cm de long avec un diamètre interne de 4,6 mm et remplie de particules de silice de 5 µm de diamètre.

- Déterminer le volume mort de la colonne (porosité estimé 70 %).

On souhaite préconditionner (équilibrer) la colonne avec une phase mobile eau/méthanol 50 :50. Le débit de phase mobile est réglé à 1 mL/min. Sachant qu'il faut faire passer un volume de phase mobile égale à 5 fois le volume de la colonne pour équilibrer la colonne.

- Calculer le temps nécessaire pour équilibrer la colonne.

On réalise ensuite l'injection d'un échantillon à un débit de 0,7 mL.min⁻¹. Le chromatogramme suivant est obtenu :



- Calculer les facteurs de rétention pour les trois composés élués.

Exercice 2 - Chromatographie en phase liquide

Une colonne de Chromatographie en Phase Liquide présente les caractéristiques suivantes:

Longueur 15 cm, Diamètre interne 4,6 mm, Diamètre des particules du remplissage 5 µm., Volume mort 1,49 mL.

- Calculer la porosité de la colonne.
- A quel débit (ml/mn) doit-on travailler pour avoir une vitesse linéaire de phase mobile de 0,1 cm.s⁻¹ ?
- Si on utilisait une colonne de 3,9 mm de diamètre interne, quel devrait être le débit à imposer pour avoir la même vitesse linéaire de 0,1 cm.s⁻¹.
- Si on double la vitesse linéaire, quel est le nouveau volume mort du système ?
- Si on impose un débit de 1 mL.min⁻¹, quel est le temps mort ?
- Si on double la longueur de la colonne et si on divise le débit de la phase mobile par 2, que deviennent la porosité, le volume mort et le temps mort ?

Exercice 3 - Chromatographie en phase liquide. La vitesse optimale u_{opt} , et la hauteur minimale correspondante H_{min} , peuvent être estimées à partir du diamètre d_p des particules dans la colonne par les relations :

$$u_{opt} (\text{cm.s}^{-1}) = 0,5/d_p (\mu\text{m}) \quad H_{min} = 3 * d_p$$

La pression ΔP à imposer en tête de la colonne est reliée à la viscosité η , à la longueur de la colonne L , à la vitesse linéaire de phase mobile u , au diamètre des particules d_p et à un facteur de forme ϕ .

$$\Delta P = \frac{\phi \cdot \eta \cdot L \cdot u}{d_p^2}$$

On dispose d'un système de chromatographie en phase liquide équipé d'une boucle d'injection de 10 µl et d'une colonne de silice greffée C₁₈ ayant les caractéristiques suivantes : longueur 5 cm, diamètre interne 4,6 mm, diamètre des particules de silice : 5 µm, porosité 80%.

Sur cette phase stationnaire, le benzène et le nitrobenzène ont des facteurs de rétention respectifs de 3,6 et de 4,3.

- Calculer la vitesse optimale, le débit optimal, l'efficacité correspondante, le temps mort et le temps d'analyse. A cette vitesse, la pression en tête de colonne est de 15 bar.

On peut utiliser une colonne identique (même géométrie, même phase stationnaire) mais remplie avec des particules de 3 μm .

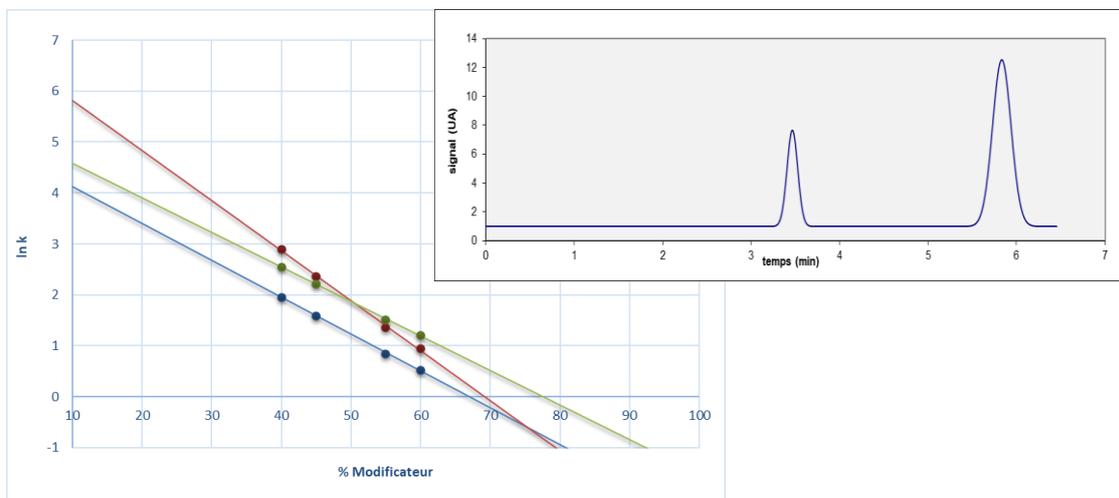
- Calculer la vitesse optimale, le débit optimal, l'efficacité correspondante, le temps mort, le temps d'analyse et la pression en tête de colonne pour cette colonne remplie avec des particules de 3 μm .

Pour obtenir un système présentant environ 10 000 plateaux, on a deux alternatives :

- colonne remplie de particules de 5 μm de diamètre, longueur 15 cm
- colonne remplie de particules de 3 μm de diamètre, longueur 10 cm

Pour chacune de ces deux options, calculer le temps d'analyse et la pression en tête de colonne

Exercice 4 - Chromatographie en phase liquide- On réalise l'analyse suivante à une composition de phase mobile eau :solvant, 50 :50.



Séparation de 3 composés en chromatographie liquide à polarité de phases inversée. Colonne (5 cm de long, 4,6 mm de diamètre interne, particule de silice C18, 5 μm de diamètre, porosité 70%). Débit 0,7 $\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$. Détection UV-Vis 214 nm.

D'après les données, quel serait pour vous les modifications à apporter pour améliorer la séparation ?

Exercice 5 - Chromatographie en phase liquide - Quel est l'ordre d'élution des acides suivants en HPLC avec une colonne dont la phases stationnaire est de type C18 et une phase mobile un tampon formiate (200 mM, de pH 9) ?

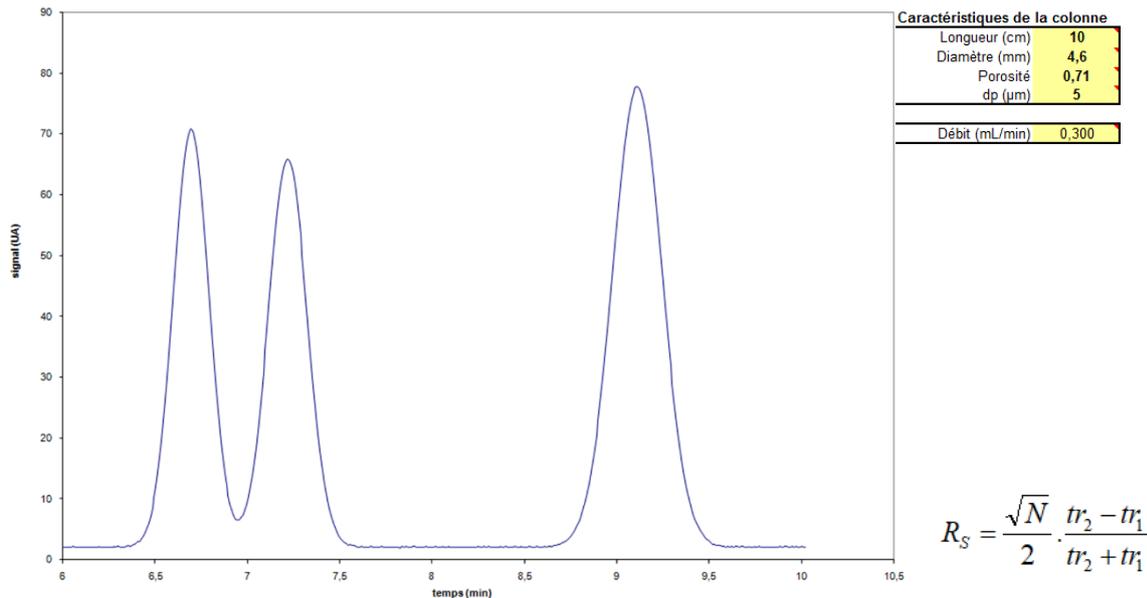
- 1 Acide linoléique $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$
- 2 Acide arachidique $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}_2\text{H}$
- 3 Acide oléique $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$

Exercice 6 - Chromatographie en phase liquide Une séparation en CPL sur une colonne de 10 cm de longueur avec une vitesse linéaire de la phase mobile de 0,1 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ donne un facteur de capacité de 8 pour le soluté le plus retenu.

- Quelle est la durée de l'analyse ?

Exercice 7 - Chromatographie en phase liquide - A partir du chromatogramme et des informations fournies calculez :

- Le temps mort
- La vitesse de phase mobile
- Le facteur de rétention du pic n°1
- Le facteur de rétention du pic n°2
- La sélectivité 2/1
- L'efficacité observée sur le pic n°3
- La hauteur équivalente à un plateau théorique pour le pic n°3
- La résolution 2/1



Exercice 8 - Chromatographie en phase liquide - Soient deux substances A et B ayant des temps de rétention respectivement de 16,40 et 17,63 min sur une colonne de 30,0 cm et dont les largeurs des pics à la base sont respectivement 1,11 et 1,21 min.

Calculer:

- la résolution de la colonne
- le nombre moyen de plateaux dans la colonne
- la hauteur d'un plateau théorique
- la longueur de la colonne nécessaire pour obtenir une résolution de 1,5

Exercice 9 - Chromatographie en phase liquide - - Indiquer l'ordre d'élution des composés benzène, trinitrotoluène et n-hexane.

- en HPLC mode normal
- en HPLC mode inverse

Exercice 10 - Chromatographie en phase liquide - En chromatographie à polarité de phases normale classez les phases mobiles suivant leur pouvoir d'élution croissant : Hexane, chlorure de méthylène
En chromatographie à polarité de phases inversée classez les phases mobiles suivant leur pouvoir d'élution croissant : eau, THF, méthanol,

Exercice 10 - Chromatographie en phase liquide - En chromatographie de partage à polarité de phases inversée, classez les phases mobiles suivant leur pouvoir d'élution croissant : Méthanol, Eau/méthanol (50/50), Eau/Méthanol (10/90)

Exercice 11 - Chromatographie en phase liquide - Analyse Quanti :

On cherche à déterminer la composition en simazine et en atrazine d'une eau de surface prélevée en rivière. On prélève 1 L de cette eau que l'on traite de la façon suivante :

Extraction de la simazine et de l'atrazine au dichlorométhane,

Evaporation à sec sur un évaporateur rotatif du dichlorométhane,

Reprise du résidu sec par 10 mL de méthanol. On obtient alors la solution inconnu S_{inc} .

On analyse cette solution en HPLC sur une colonne C18 en effectuant successivement trois injections, dans des conditions identiques. Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant :

Soluté	Aire du pic	Soluté	Aire du pic
atrazine	3 021	simazine	2 505
	2 989		2 432
	2 897		2 317

On prépare trois solutions standard contenant respectivement 10 mg (solution S1), 15 mg (solution S2), 20 mg (solution S3) d'atrazine et de simazine dans 100 mL de méthanol.

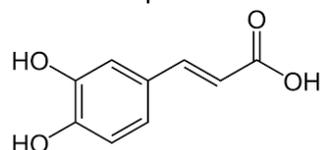
Chaque étalon est injecté 2 fois. Les aires des pics de l'atrazine et de la simazine sont les suivantes :

Solution	Injection n°1	Injection n°2
S1	875 (Atrazine)	880 (Atrazine)
	912 (Simazine)	924 (Simazine)
S2	1 308 (Atrazine)	1 319 (Atrazine)
	1 362 (Simazine)	1 371 (Simazine)
S3	1 698 (Atrazine)	1 730 (Atrazine)
	1 792 (Simazine)	1 852 (Simazine)

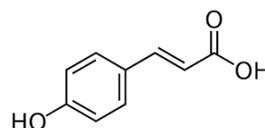
- Calculer, pour chaque injection de standard, les coefficients de réponse du détecteur à l'atrazine et à la simazine en mg/unité d'aire.
- Calculer, pour chaque soluté, le coefficient de réponse moyen du détecteur à l'atrazine et à la simazine en mg/unité d'aire.
- En déduire, pour chaque injection de la solution inconnue S_{inc} , la concentration massique en atrazine et en simazine de l'eau de rivière prélevée.

Exercice supplémentaire - Chromatographie en phase liquide - On souhaite séparer et quantifier par chromatographie en phase liquide l'acide caféique et l'acide coumarique présents en faible concentration dans un échantillon de bière.

acide caféique



acide coumarique



La colonne (4.6 x 150 mm) est constituée d'une phase de silice greffée octadécyle. Le diamètre des particules est de 5 µm. L'éluant est un mélange eau + acide acétique et acétate de sodium/méthanol 80/20.

Le débit est de 1ml/min. Le temps de rétention nulle est de 2 minutes. L'injection se fait avec une boucle de 20 µl.

- Identifier l'ordre de sortie des deux acides qui correspondent aux pics 1 et 2. Justifier.
- Quel sera le rôle de l'acide acétique + acétate de sodium ?
- Quel détecteur choisirez-vous? Justifier.
- Les aires des pics 1 et 2 du chromatogramme précédent sont de :

pic 1 : 9 000

pic 2 : 9500

Pour l'analyse quantitative, on réalise dans les mêmes conditions une injection d'une solution étalon d'acide caféique et d'acide coumarique chacun à une concentration de 3 mg/l. On obtient les aires des pics suivantes:

pic 1 : 10 000

pic 2 : 12 000

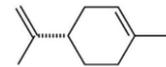
Calculer les concentrations des deux solutés dans la bière par la méthode de l'étalonnage externe.

Exercice 12- Chromatographie en phase gazeuse (CPG) - L'analyse de 2 composés 1 et 2, donne les résultats suivants sur une colonne A : $t_0 = 4,8$ min., $t_{R1} = 12,5$ min, $t_{R2} = 20$ min. Une autre colonne B contenant la même phase stationnaire qui donne t_0 de 4,8 min. et $t_{R1} = 18$ min est utilisée. Toutes les conditions sont identiques à l'exception du fait que la colonne B contient 50% de phase stationnaire en plus de A. On injecte le produit 2 sur la colonne B et on prévoit l'arrêt de l'enregistrement à 25 min. Verra-t-on le pic du produit 2 ?

Exercice 13 - Chromatographie en phase gazeuse (CPG) - Une analyse en chromatographie gazeuse dure trop longtemps. Parmi les paramètres suivants lesquels permettent de diminuer ce temps d'analyse, en déduire les conséquences ? température du four/ volume d'injection / débit de gaz vecteur / longueur de colonne / quantité de phase stationnaire (df).

Exercice 14 - Chromatographie en phase gazeuse (CPG) - Une huile essentielle de parfum contient du limonène ($E_b = 179^\circ\text{C}$)

et de l'acide pentanoïque $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ ($E_b=179^\circ\text{C}$).



Elle est analysée en CPG sur un appareil équipé d'un détecteur à ionisation de flamme.

Deux colonnes sont utilisées, l'une contenant une phase silicone SE30 (apolaire) et l'autre une phase Carbowax 20M (polaire).

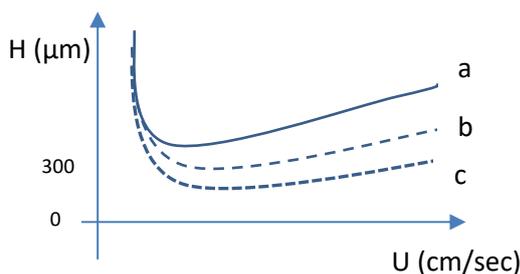
a) Donner le principe et les différents paramètres de réglage du détecteur.

b) Indiquer l'ordre de sortie des 2 composés sur chaque phase stationnaire.

c) Sur des colonnes capillaires SE30 de 15 m de long, les courbes de Van Deemter obtenues pour le limonène avec différentes épaisseurs de film (0,25 mm, 1mm et 5 mm) sont ci-contre :

Donner pour chaque courbe a, b et c, en le justifiant l'épaisseur du film correspondant.

Pour une analyse rapide faut-il choisir a, b ou c ?



Si l'on se situe à la valeur u optimum de la courbe de Van Deemter de la colonne b, le t_R du limonène est de 10 min. et le temps de rétention nulle est de 1 min. Quel est le nombre de plateaux théoriques pour cette valeur de u ? En déduire la largeur à mi-hauteur du pic du limonène.

Exercice 14 - Chromatographie en phase gazeuse (CPG) - Sur une colonne CPG Carbowax (polaire) de 20 mètre de long, l'analyse d'un mélange de propanol (Temp. E_b 97°C), benzène (Temp. E_b $80,5^\circ\text{C}$) et cyclohexane (Temp. E_b $80,5^\circ\text{C}$) donne 3 pics. Identifier les 3 pics en fonction de l'ordre de sortie des composés.

Exercice 14 - Chromatographie en phase gazeuse (CPG) - Sur une colonne CPG Carbowax (polaire) de 20 mètre de long, l'analyse d'un mélange d'hexanol, octanol et pentanol donne 3 pics. Identifier les 3 pics en fonction de l'ordre de sortie des composés.

Exercice 15 - Chromatographie en phase gazeuse (CPG) – Analyse Quanti

Un même mélange de méthanol et propanol est analysé 6 fois dans les mêmes conditions chromatographiques. Les surfaces obtenues sont les suivantes :

Injection	1	2	3	4	5	6
Méthanol	4737	5467	5552	4904	5116	4960
Propanol	4652	5410	5542	4890	5193	5136

Calculer le coefficient de variation des surfaces du méthanol (S_m), propanol (S_p) et du rapport S_m/S_p .

Quel intérêt présente l'utilisation du rapport pour une analyse quantitative ?

Exercice 16 - Chromatographie en phase gazeuse (CPG) – Calculer le % d'eau et de méthanol dans l'éthanol industriel par la méthode de l'étalon interne avec les éléments suivants.

1- Une solution témoin est préparée (4250 ml éthanol **pur** + 250 ml i-propanol + 250 ml eau + 250 ml méthanol) et injectée en CPG.

Les surfaces obtenues pour l'eau, le méthanol et le i-propanol sont respectivement 2398, 1694 et 445.

2- Une solution échantillon est préparée (4750 ml éthanol **industriel**, 250 ml i-propanol).

Les surfaces obtenues pour l'eau, le méthanol et le i-propanol sont respectivement 1760, 614 et 498.

Exercice 17 - Chromatographie d'exclusion stérique (CES) - On détermine les temps de rétention (t_r) au cours d'une chromatographie sur Sephadex, des protéines suivantes dont on connaît la masse moléculaire (MM) (Le débit de la colonne est de 5 ml / min) :

Protéine	MM	Tr (min)
Aldolase	145 000	10,4
Lactate déshydrogénase	135 000	11,4
Phosphatase alcaline	80 000	18,4
Ovalbumine	45 000	26,2
Lactoglobuline	37 100	28,6

1 - Calculer les volumes d'élution (V_e) correspondants. Porter le log de MM en fonction de V_e - Que remarquez-vous ?

2 - Pour la glucokinase, $t_r = 21$ min. Déterminer sa masse moléculaire à l'aide du graphique précédent. Existe-t-il une autre méthode pour déterminer la MM ?