

TP1 – INFLUENCE DE LA COMPOSITION DE LA PHASE MOBILE SUR LA RÉTENTION

Conditions opératoires :

- Colonne de silice greffée C₁₈
 - o Longueur colonne : 50 mm
 - o Diamètre interne : 4,6 mm
 - o Diamètre des particules : 5 μm
- Porosité estimée : 70%
- Longueur d'onde de détection : 260 nm
- Volume d'injection : 10 μL
- Phase mobile : Acétonitrile / Eau + 0,1 acide formique (13%/87%)

Détermination du débit :

- Calcul volume mort théorique

$$V_{m;théorique} = S_{utile} \times \varepsilon \times l_c$$

$$V_{m;théorique} = \frac{(\pi \times d^2)}{4} \times \varepsilon \times l_c$$

$$V_{m;théorique} = \frac{(\pi \times 4,6^2)}{4} \times 0,7 \times 50 = 581,7 \text{ mm}^3 = 0,5817 \text{ mL}$$

- Calcul de la vitesse optimal

$$u_{optimal} = \frac{0,5}{\text{diamètre particule}} = \frac{0,5}{50} = 0,1 \text{ cm. s}^{-1}$$

- Calcul temps mort

$$t_m = \frac{l_c}{u_{optimal}} = \frac{5}{0,1} = 50 \text{ sec soit } 0,83 \text{ minutes}$$

- Calcul du débit

$$d = \frac{V_m}{t_m} = \frac{0,5817}{0,83} = 0,7 \text{ mL. min}^{-1}$$

Nous avons décidé de travailler à un débit de 1 mL.min⁻¹, afin de gagner du temps d'analyse et de faciliter les calculs.

Détermination des temps de rétention :

4 solutés + thiourée avec une phase mobile eau/méthanol (70-30)

Solutés → permet d'étudier les standards

Thiourée (non retenu par la colonne) → permet de déterminer le temps mort (t_m) donc le volume mort (V_m)

	tr	k
Thiourée	0,7	/
Ac p-hydroxybenzoïque	1,601	1,287
Ac vanillique	1,732	1,474
Aldéhyde p-hydroxybenzoïque	1,902	1,717
Vanilline	2,126	2,037

$$\text{Facteur de rétention} = \frac{T_r - T_m}{T_m}$$

TP1 – INFLUENCE DE LA COMPOSITION DE LA PHASE MOBILE SUR LA RÉTENTION

Détermination de la porosité réelle :

$$V_m = d \times t_m$$

$$\varepsilon = \frac{V_m}{S_{utile}} = \frac{0,703}{\frac{\pi \times 0,46^2}{4}} = 0,85 \text{ soit } 85 \%$$

Justification choix vitesse phase mobile :

On a choisi comme vitesse de phase mobile 0,1 cm/s car le diamètre des particules est de 5 μm.

Choix longueur d'onde :

D'après les spectres d'absorbance des différents composés dans les annexes, il nous fallait trouver une longueur d'onde pour laquelle tous les composés doivent absorber. On a donc décidé d'utiliser une longueur d'onde de 260nm.

Composition de la phase mobile Eau/Méthanol (70/30) :

- Comment identifier les solutés ?

On a fait passer tous les solutés individuellement afin de déterminer leur temps de rétention (tr) et leur facteur de rétention (k). Pour identifier les différents solutés du mélange, on va pouvoir comparer les facteurs de retentions obtenus pour chaque pic à celui de chaque soluté.

	tr	k	Sélectivité	Rs (1-2)	Rs (2-3)	Rs (3-4)	RS _{min}
Thiourée	0,7	/	/	0,956	1,38	1,423	0,956
Ac p-hydroxybenzoïque	1,5	1,284	/				
Ac vanillique	1,719	1,456	1,133				
Aldéhyde p-hydroxybenzoïque	1,897	1,710	1,175				
Vanilline	2,093	1,990	1,164				

Composition de la phase mobile Eau/Méthanol (80/20) :

	tr	k	Sélectivité	Rs (1-2)	Rs (2-3)	Rs (3-4)	RS _{min}
Thiourée	0,7	/	/	3,205	0	3,947	3,205
Ac p-hydroxybenzoïque	2,546	2,637	/				
Ac vanillique	3,133	3,476	1,318				
Aldéhyde p-hydroxybenzoïque							
Vanilline	4,026	4,751	1,367				

TP1 – INFLUENCE DE LA COMPOSITION DE LA PHASE MOBILE SUR LA RÉTENTION

On observe que 3 pics après l’analyse HPLC, on suppose donc une coélution entre l’acide vanillique et l’aldéhyde p-hydroxybenzoïque. Pour valider cette hypothèse, nous avons injecté les 2 composés séparément. Dans le tableau suivant, sont indiqués les tr obtenus :

	tr
Acide vanillique	3,086
Aldéhyde p-hydroxybenzoïque.	3,092

Ces résultats confirment notre hypothèse.

Composition de la phase mobile Eau/Méthanol (90/10) :

	tr	k	Sélectivité	Rs (1-2)	Rs (2-3)	Rs (3-4)	RS _{min}
Thiourée	0,7	/	/	4,589	2,458	5,392	2,458
Ac p-hydroxybenzoïque	4,563	5,519	/				
Ac vanillique	6,039	7,627	1,382				
Aldéhyde p-hydroxybenzoïque	7,011	9,016	1,182				
Vanilline	9,81	13,01	1,444				

Vérification de la colonne utilisée :

$$N_{théorique} = \frac{l_c}{3 \times d_p} = \frac{50}{3 \times 5.10^{-3}} = 3333,3$$

$$N_{théorique} = \frac{l_c}{2 \times d_p} = \frac{50}{2 \times 5.10^{-3}} = 5000$$

Débit	N théorique	N observé
1 mL.min ⁻¹	3333-5000	≈ 4300

Le nombre de plateau observé est compris dans l’intervalle de nombre de plateau théorique, donc on peut en déduire que la colonne est efficace.

Rôle acide formique :

On utilise de l’acide formique pour travailler avec un pH stable à 5.4.

TP1 – INFLUENCE DE LA COMPOSITION DE LA PHASE MOBILE SUR LA RÉTENTION

Représentation graphique de l'évolution

- $\ln(k) = f(\% \text{ modificateur organique})$

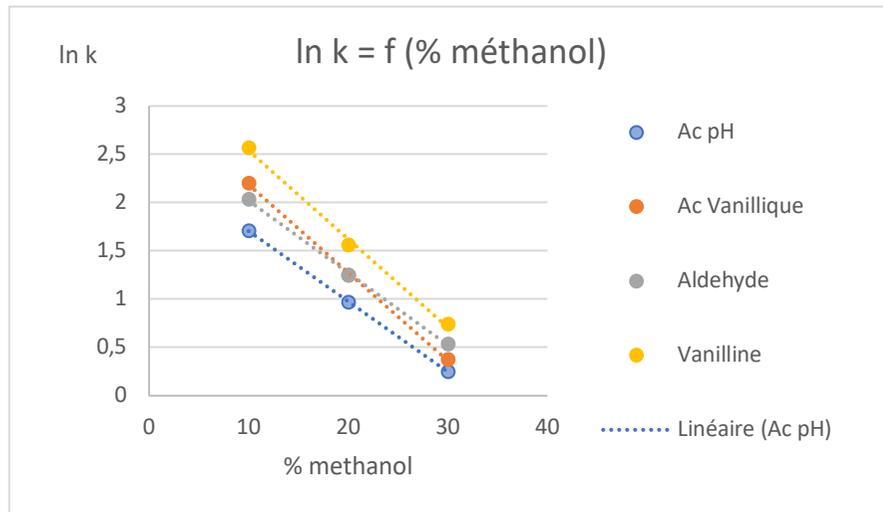


Figure 1 : Courbe d'étalonnage de l'évolution du \ln de k en fonction du % du solvant (méthanol) par HPLC sur une colonne silice greffée C18 (50x4,6 mm) de porosité 0,85. La phase mobile utilisée : Eau + 0,1 acide formique / méthanol.

Pour les 4 composés, plus la composition de la phase mobile en méthanol augmente plus le \ln du facteur de rétention va diminuer linéairement, ce qui montre que le % de solvant influe sur le temps de rétention des composés.

Pour l'acide vanillique et l'aldéhyde p-hydroxybenzoïque, les droites se croisent ce qui correspond à une coélution des composés. Au cours d'une coélution, les facteurs de rétention des 2 composés sont très proches. Ils sont tellement proches que à la suite de la coélution les facteurs de rétention sont inversés. Cette coélution a lieu à un certains % de solvant

- $Tr = f(\% \text{ modificateur organique})$

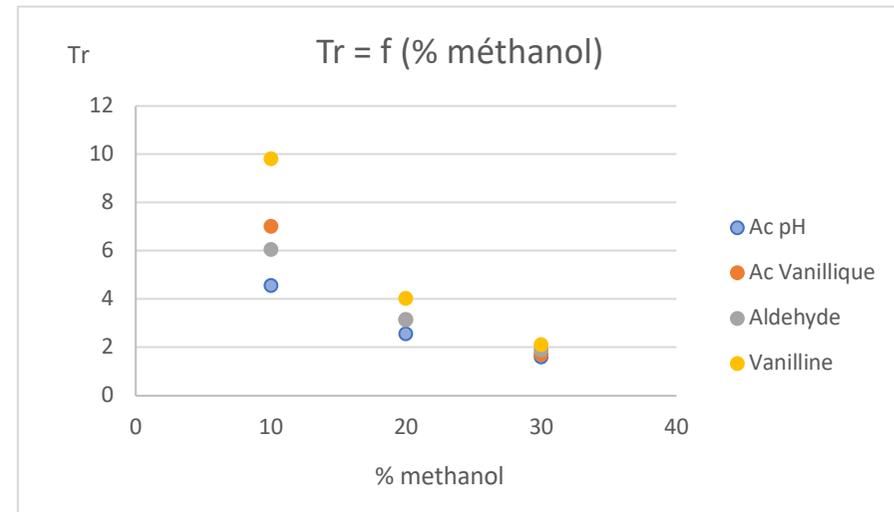


Figure 2 : Courbe d'étalonnage de l'évolution du tr en fonction du % du solvant (méthanol) par HPLC sur une colonne silice greffée C18 (50x4,6 mm) de porosité 0,85. La phase mobile utilisée : Eau + 0,1 acide formique / méthanol.

Pour les 4 composés, plus la composition de la phase mobile en méthanol augmente plus le temps de rétention va diminuer exponentiellement, ce qui montre qu'avec un % élevé de solvant la capacité du composé à être retenu va diminuer.

TP1 – INFLUENCE DE LA COMPOSITION DE LA PHASE MOBILE SUR LA RÉTENTION

- $R_{s\min} = f(\% \text{ modificateur organique})$

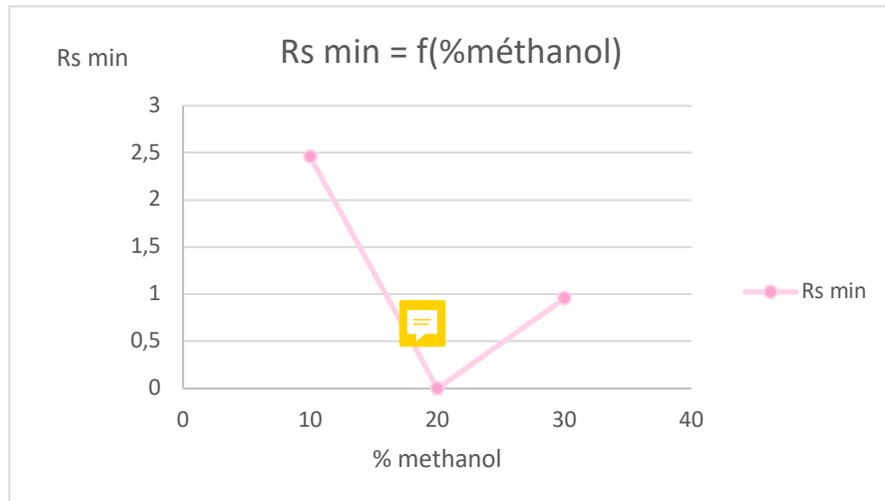


Figure 3 : Courbe d'étalonnage de l'évolution du R_s minimum en fonction du % du solvant (méthanol) par HPLC sur une colonne silice greffée C18 (50x4,6 mm) de porosité 0,85. La phase mobile utilisée : Eau + 0,1 acide formique / méthanol.

La résolution (R_s) correspond à l'écart entre 2 pics et la largeur des pics. Ce qui représente la sélectivité (α) et l'efficacité de la colonne.

Avec une phase mobile à 20% de méthanol, le R_s est de 0, cela est normal car on a pu observer une coélution des pics des composés : acide vanillique et l'aldéhyde p-hydroxybenzoïque. D'après le graphique, la phase à 10% de méthanol est celle qui correspond le mieux pour avoir une bonne résolution.

Rq : A noter que le % de méthanol est non proportionnel au R_s (extension de droite pas forcément linéaire)

- $\alpha_{\min} = f(\% \text{ modificateur organique})$

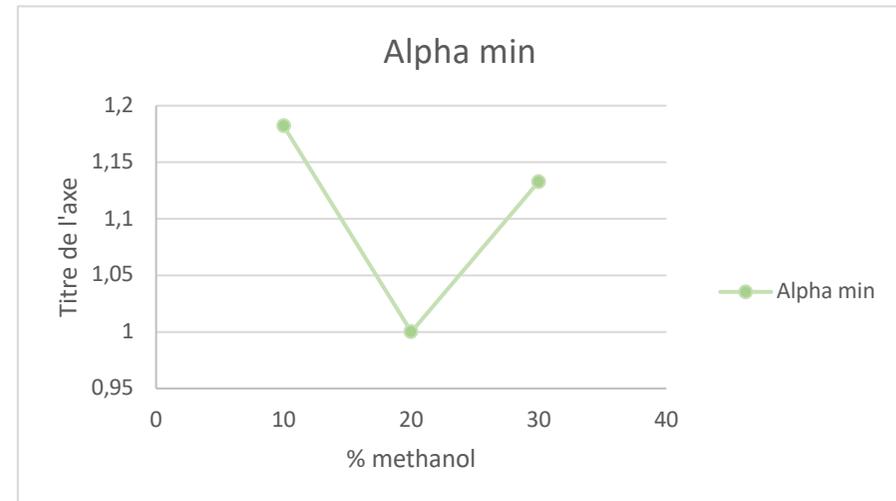


Figure 4 : Courbe d'étalonnage de l'évolution du α minimum en fonction du % du solvant (méthanol) par HPLC sur une colonne silice greffée C18 (50x4,6 mm) de porosité 0,85. La phase mobile utilisée : Eau + 0,1 acide formique / méthanol

La sélectivité (α) correspond à l'écart de rétention entre 2 pics.

Avec une phase mobile à 20% de méthanol, le α est de 1, cela est normal car on a pu observer une coélution des pics des composés : acide vanillique et l'aldéhyde p-hydroxybenzoïque. D'après le graphique, la phase à 10% de méthanol est celle qui correspond le mieux pour avoir une bonne sélectivité.

TP1 – INFLUENCE DE LA COMPOSITION DE LA PHASE MOBILE SUR LA RÉTENTION

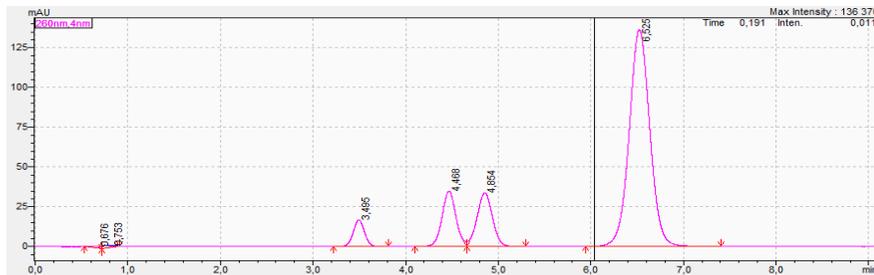
Intérêt des différentes représentations graphique :

Les représentations graphiques permettent de choisir des conditions opératoires (pourcentage de solvant) pour que la séparation des composés est la plus efficace et la plus sélective possible.

On fait une nouvelle analyse avec les conditions idéales que nous avons trouvé : % méthanol = 14%

Cela permettra une séparation idéale dans un temps le plus réduit possible.

Ci-dessous, le graphique obtenu avec les conditions idéales :



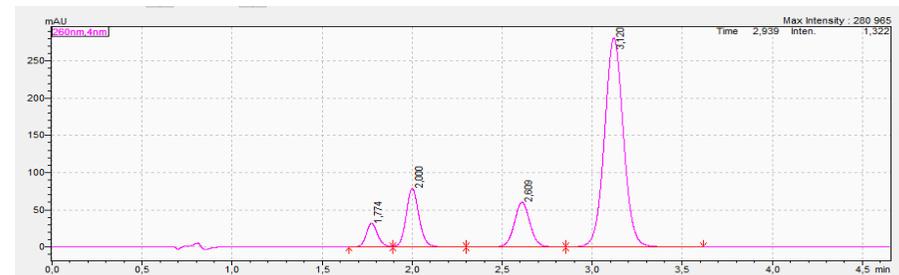
On observe que les pics des 4 composés sont bien séparés, donc notre hypothèse sur les conditions idéales sont validées.

Gamme de force isoéluante Eau/Acétonitrile :

Pour observer une modification des 3 paramètres principaux : la résolution, la sélectivité et l'efficacité, on modifie le solvant. Afin d'être dans les conditions optimales on prend les mêmes pourcentages que précédemment.

Nous avons 2 hypothèses concernant la séparation des composés dans le mélange, soit une séparation optimale soit une séparation inférieure à celle obtenue avec le méthanol.

Ci-dessous, le graphique obtenu avec la phase mobile Eau/Acétonitrile (86/14%) :



On observe que les pics des 4 composés sont bien séparés, donc une séparation avec une phase mobile Eau/Acétonitrile est meilleure qu'avec une phase mobile Eau/Méthanol. En effet, les pics 2 & 3 sont mieux séparés et ne convergent plus vers une coélution. On peut observer que les pics 1 & 2 sont plus proches l'un de l'autre mais la qualité de la séparation reste quand même meilleure.

TP1 – INFLUENCE DE LA COMPOSITION DE LA PHASEE MOBILE SUR LA RÉTENTION