TD n°1 : Chromatographie

1- Grandeurs caractéristiques de la chromatographie

Les données suivantes se rapportent à une colonne chromatographique :

Longueur du remplissage : 24,7 cm V_M : 1,37 mL

Vitesse d'écoulement : 0,313 mL/min V_S : 0,164 mL

Un chromatogramme d'un mélange des espèces **A**, **B**, **C** et **D** a fourni les données suivantes :

	Temps de rétention (min)	Largeur de la base du pic ω (min)
Non retenu	3,1	-
A	5,4	0,41
B	13,3	1,07
C	14,1	1,16
D	21,6	1,72

a) Calculez le nombre de plateaux théoriques pour chaque pic ainsi que la valeur moyenne de N.

b) Calculez la hauteur équivalente à un plateau théorique H.

c) Calculez le facteur de rétention de **A**.

d) Calculez le coefficient de distribution de **A**.

e) Calculez la résolution pour les espèces **B** et **C**.

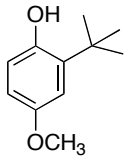
f) Calculez la longueur de colonne nécessaire pour séparer les deux espèces **B** et **C** avec une résolution de 1,5 sachant que :

$$\frac{R_1}{R_2} = \sqrt{\frac{N_1}{N_2}} = \sqrt{\frac{t_{R_1}}{t_{R_2}}}$$

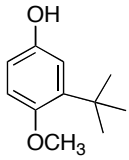
g) Calculez le temps requis pour séparer les deux espèces **B** et **C** sur la colonne à utiliser pour répondre à la question f).

2- Séparation des isomères du *tert*-butylhydroxyanisole

Le *tert*-butylhydroxyanisole (BHA) est utilisé comme antioxydant alimentaire : il est également actif comme anticancéreux. Le produit commercial est un mélange de deux isomères dont les formules sont indiquées ci-dessous. Le 3-BHA est environ 2,4 fois plus actif comme antioxydant que le 2-BHA tandis que le 2-BHA est un anticancéreux plus actif que le 3-BHA. Une méthode d'évaluation de la composition du BHA est ainsi nécessaire. Une méthode consiste à utiliser, comme phase stationnaire, une silice greffée accepteur d'électrons et, comme phase mobile, un mélange *n*-hexane-propan-2-ol. Le tableau ci-après donne les temps de rétention du 2-BHA et du 3-BHA pour différentes compositions de la phase mobile.



3-BHA



2-BHA

Les conditions chromatographiques sont les suivantes : longueur de la colonne : 25 cms ; diamètre intérieur de la colonne : 4,6 mm ; diamètre des particules : 5 µm ; porosité de la colonne : ε = 0,75 ; température : 25°C ; Vitesse linéaire de l'éluant : 0,134 cm/s.

% de propan-2-ol dans le *n*-hexane (en volume)	Temps de rétention (min)	
	2-BHA	3-BHA
0	-	-
1	96,0	47,8
2	30,4	21,6
3	17,2	13,3
5	10,7	9,0
7	8,2	7,0
10	6,8	6,0

a) Calculer le temps de rétention mort t_0.

b) Calculer, pour les différents pourcentages de propan-2-ol, les facteurs de rétention k pour chacun des composés ainsi que la sélectivité α. Commenter les valeurs de α obtenues pour les forts pourcentages de propan-2-ol.

c) Quel est le nombre de plateaux théoriques de la colonne pour le 2-BHA pour la composition de la phase mobile à 10% de propan-2-ol, sachant qu'à cette composition, le facteur de résolution pour le couple 3-BHA/2-BHA est de 2 ? Calculer la HEPT correspondante.

d) Calculer la longueur de la colonne nécessaire pour séparer le 2-BHA et le 3-BHA pour la composition de la phase mobile à 10% de propan-2-ol avec une résolution de 1,5 sachant que :

$$\frac{R_1}{R_2} = \sqrt{\frac{N_1}{N_2}} = \sqrt{\frac{t_{R1}}{t_{R2}}}$$

e) Calculer le temps requis pour séparer le 2-BHA et le 3-BHA sur la colonne à utiliser pour répondre à la question précédente.

3- Facteur de résolution R

On veut analyser par CPG des mélanges de n-octane et de 2-méthylheptane. En utilisant une colonne de phase stationnaire apolaire, de longueur 2 mètres, de diamètre intérieur 3 mm, à 40 cm^3/min et à 90°C, le nombre de plateaux théoriques est N = 3600. Injectés séparément, on mesure les temps d'élution des deux composés qui sont respectivement 200 s et 204 s.

a) Calculer σ, l'écart-type des pics observés pour les deux composés ainsi que le facteur de résolution si on analyse dans les mêmes conditions un mélange équimolaire des deux produits et tracer à main levée, mais avec quelques repères quantitatifs, l'allure du chromatogramme observé.

b) Pour obtenir une séparation plus satisfaisante, on pourrait utiliser une colonne capillaire ayant la même phase stationnaire que la colonne précédente, de longueur 20 mètres et fournissant environ 40 000 plateaux théoriques au débit optimum qui correspond à une vitesse linéaire du gaz vecteur de 10 cm/s. En faisant l'approximation que le rapport des temps d'élution des deux composés restera inchangé par rapport au cas précédent, tracer à main levée l'allure du chromatogramme observable si on analyse sur cette nouvelle colonne un mélange équimolaire des deux produits après avoir calculé le facteur de résolution pour un tel chromatogramme.

c) La même colonne capillaire employée à un débit double du débit optimum fournit 32 000 plateaux théoriques. Déterminer les valeurs des paramètres de l'équation de Van Deemter pour cette colonne en précisant dans quelle unité vous les exprimez.

4- Equation de Van Deemter

Sur une colonne de CPG capillaire de longueur 30 mètres et de diamètre intérieur 0,2 mm, on fait deux analyses à la même température mais en modifiant le débit. Le nombre de plateaux théoriques est N = 20 000 pour un pic d'hexane sortant à 200 s et N = 30 000 pour un pic d'hexane sortant à 400 s.

Dans les conditions opératoires utilisées, le facteur de rétention k est $k_{hexane} = 1,2$.

Calculer la vitesse linéaire moyenne du gaz vecteur pour chaque expérience, puis les paramètres de l'équation de Van Deemter pour cette colonne.

Quels sont les débits de gaz dans chaque cas et quel débit permettrait d'obtenir le nombre optimum de plateaux théoriques ?

5- Analyse quantitative

Le dosage de l'alcool dans le sang est fréquemment réalisé par chromatographie en phase gazeuse en utilisant la méthode de l'étalonnage interne. On prépare, pour ce faire, dans un premier temps 8 solutions renfermant des quantités connues d'alcool (éthanol) noté **A** et de l'étalon interne (le 1-propanol) noté **E**. On chromatographie ces solutions étalons en CPG en injectant à chaque fois 0,5 µL de solution et on mesure à l'aide de l'intégrateur de l'appareil les surfaces (notées S_A et S_E) des pics observés. Les résultats sont les suivants :

Etalon n°	1	2	3	4	5	6	7	8
C_A (g/L)	0,1	0,2	0,4	0,5	0,6	0,8	1	1,2
C_E (g/L)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
S_A^*	50,5	99,5	201	251	298	399	501	598,5
S_E^*	225	225	224,5	225	225,5	225	225	225,5

* unités arbitraires

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse de quatre échantillons de prélèvements sanguins est réalisée sur le plasma (surnageant après centrifugation). On ajoute 5 µL d'une solution de 1-propanol à 1 $g.L^{-1}$ à 5 µL de plasma et on injecte 0,5 µL de la solution ainsi obtenue en CPG. Les chromatogrammes fournissent les résultats suivants :

Echantillon n°	1	2	3	4
S_A^*	287	124,5	378	28
S_E^*	225	225,5	225	226

* unités arbitraires

A partir de l'ensemble de ces résultats, déterminer la concentration en alcool dans le sang de chacun des conducteurs 1 à 4.