

UNIVERSITE PARIS-SACLAY
UFR DE PHARMACIE

DFGSP2

UE5-B SCIENCES ANALYTIQUES
Enseignements dirigés

TECHNIQUES SEPARATIVES

ANNEE 2024-2025

Enseignants intervenant dans les ED UE5 B:

Tristan GIRAUD, Athena KASSELOURI, Isabelle LE POTIER, Danielle LIBONG, Thanh Duc MAI, Ghozlene MEKHLOUFI, Rime MICHAEL-JUBELI, Thuy TRAN-MAIGNAN, Jiangyan ZHOU.

Enseignant responsable : athena.kasselouri@universite-paris-saclay.fr

ED1

CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

1. On analyse le même soluté sur deux colonnes A et B de diamètre interne 4.6 mm. Les deux colonnes ont la même longueur $L_A = L_B = 10$ cm. Avec la colonne A on obtient un temps de 3.79 min entre l'injection et le maximum du pic (largeur à mi-hauteur : 0.14 min). Avec la colonne B, le temps est de 8.02 min avec une largeur à mi-hauteur de 0.25 min. Laquelle des deux colonnes est la plus efficace ? Quelle pourrait en être la cause ?

2. Un mélange de deux composés est chromatographié sur une colonne de 5 cm de longueur et de 4.6 mm de diamètre interne avec une phase mobile de vitesse linéaire de 1 mm/sec, la porosité de la colonne est de 0.8. On a $t_1 = 1.7$ min et $t_2 = 1.9$ min.

a- Calculer le temps mort théorique (t_0) et le débit de la phase mobile.

b- Déterminer les facteurs de rétention des deux composés, la sélectivité et la résolution sachant que la largeur à mi-hauteur est $\omega_{0.5(1)} = 7.9$ sec et $\omega_{0.5(2)} = 8.4$ sec.

c- Calculer N pour le deuxième pic ainsi que HEPT

d- Calcul prévisionnel : calculer la résolution prévisionnelle que l'on obtiendrait avec une colonne ayant toutes les caractéristiques identiques, remplie avec la même phase stationnaire mais dont la longueur est de 25 cm .

3. Un composé est analysé par CLHP avec la même colonne mais en utilisant deux vitesses linéaires de phase mobile u_1 et u_2 . Avec u_1 , on a $k_1 = 1.6$. Le pic du composé non retenu a un temps de 2.7 min. On double la vitesse de la phase mobile : Quel est le k dans le deuxième système ? Quel est le temps de rétention de ce composé dans le deuxième système ? Quelle est l'évolution de la pression ?

4. Déterminer la polarité d'un mélange eau / acétonitrile 50/50 selon la table de Rohrschneider d'une part, et selon les paramètres de solubilité de Hildebrand d'autre part.

5. Un mélange contient de la phényle méthyl cétone, du méthyl benzène, du nitrobenzène et du benzène. Il est séparé sur une colonne octadécyle C18 avec un mélange méthanol/eau (60/40 v/v).

-Quel est leur ordre de sortie (justifier par le calcul en utilisant les indices de Rekker)

-Comment modifier la phase mobile pour augmenter la rétention des composés?

-On augmente le taux de greffage. Comment cela affecte-t-il la rétention des composés?

-Quelle(s) modification(s) entraîne le remplacement de cette colonne par une silice greffée avec des groupements phényle ?

6. Deux composés A et B présents dans une solution méthanolique sont séparés par chromatographie liquide sur une colonne C8. L'élution des deux composés s'effectue avec une phase mobile acétonitrile/eau (50:50)

A: ϕ -CH₂-CH₂-OH

B: ϕ -CH₂-CH₂-CN

On obtient trois pics chromatographiques aux temps suivants: 1.80 min, 6.79 min et 10.1 min.

a- Déduire par le calcul (indices de Rekker) le temps de rétention des composés A et B.

b- On remplace dans la phase mobile, l'acétonitrile par du méthanol. Discuter, selon la table de Hildebrand, les conséquences de ce changement sur la rétention des composés et sur la sélectivité.

c- Quel pourcentage de méthanol devra-t-on utiliser afin de conserver la même force éluante en terme de solubilité.

d- Déterminer la résolution et la sélectivité entre les composés A et B sachant que les largeurs des pics à la base sont pour le premier composé $\omega_1=0.85$ min et pour le second $\omega_2=1.2$ min.

e- Calculer la longueur de la colonne à partir du deuxième composé sachant que la HEPT pour ce composé est de 0.09 mm.

Note :

Le coefficient de partage P du soluté entre l'eau et le n-octanol ($P = C_{\text{octanol}}/C_{\text{eau}}$) constitue une mesure de l'hydrophobie du soluté. Plus P est grand, plus le soluté est hydrophobe. Le coefficient de partage P est ici calculé selon Rekker : la molécule est divisée en fragments élémentaires (par exemple : $-\text{CH}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{COO}$,...) possédant chacun une constante partielle de pouvoir hydrophobe f_i . Le log du coefficient de partage P s'obtient en additionnant les constantes f_i de tous les fragments de la molécule :

$$\log P = \sum_i f_i$$

Données :

-Valeurs des constantes partielles de pouvoirs hydrophobes selon Rekker : f_i

-Polarité des solvants selon Rohrschneider : P'

-Paramètres de solubilité des solvants selon Hidebrand : δ

<u>Fragment</u>	f_i
C₆H₅	1.886
CH₃	0.702
CH₂	0.530
H	0.175
(ar) CO	-0.842
(al) OH	-1.491
(ar) N O₂	-0.078
(al) C≡N	-1.066

solvant	P'	δ
Acétonitrile	5.8	12.0
Methanol	5.1	14.5
Eau	10.2	23.4

ED2

ELECTROPHORESE

Nombre d'Avogadro : $N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$

Permittivité du vide : $\epsilon_0 = 8,8542 \cdot 10^{-12} \text{ SI}$

Constante de Boltzmann : $k = 1,3806 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$

Charge élémentaire : $e = 1,602 \cdot 10^{-19} \text{ C}$

I. Séparation de macromolécules par électrophorèse capillaire

Soient deux macromolécules A et B que l'on analyse par électrophorèse capillaire dans un milieu de viscosité $\eta = 1,0 \text{ mPa.s}$ à 20°C et de permittivité relative $\epsilon_r = 80$. Soumises à un champ électrique de 300 V.cm^{-1} , les macromolécules A et B parcourent en régime permanent 76 cm en 15 et 20 min respectivement. On considère que le flux électro-osmotique est négligeable et qu'injectées au niveau du compartiment anodique, les macromolécules A et B migrent vers le compartiment cathodique.

- 1) Dans les conditions de l'analyse, les macromolécules sont-elles chargées positivement, négativement, ou sont-elles neutres ?
- 2) Rappeler la définition de la mobilité électrophorétique μ . Déterminer les mobilités électrophorétiques μ_A et μ_B des macromolécules A et B.
- 3) Au bout de quel temps Δt sont-elles séparées par 10 cm dans le capillaire si elles ont été injectées simultanément ?
- 4) Établir la relation reliant la charge q_A de A et la mobilité électrophorétique μ_A de A, en fonction de la constante de Boltzmann k , la température T et le coefficient de diffusion D . En déduire le nombre n de charges élémentaires sur la macromolécule A, sachant que son coefficient de diffusion D est égal à $0,704 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$, à 20°C .
- 5) Établir la relation reliant le potentiel zêta ζ_A de A et sa mobilité électrophorétique μ_A , en fonction de la viscosité η et de la constante diélectrique ϵ . Calculer le potentiel zêta ζ_A et le rayon hydrodynamique R_H de la macromolécule A supposée sphérique.

II. Analyse de molécules d'intérêt pharmaceutique par EC

On s'intéresse à l'analyse de molécules d'intérêt pharmaceutique dont la structure, la masse molaire et le pKa sont présentés dans le tableau 1.

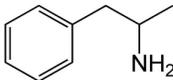
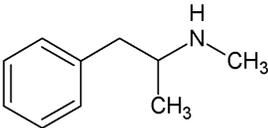
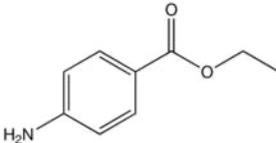
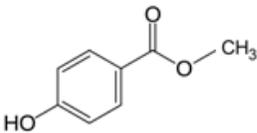
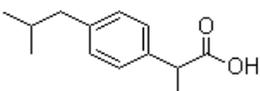
<p>Amphétamine (A)</p>  <p>pKa = 10,1 M = 135 g/mol</p>	<p>Métamphétamine (MET)</p>  <p>pKa = 9,9 M = 149 g/mol</p>	<p>Benzocaïne (BZ)</p>  <p>pKa = 4,9 M = 165 g/mol</p>
<p>Parahydroxybenzoate de méthyle (PHM)</p>  <p>pKa = 8,2 M = 152 g/mol</p>	<p>Ibuprofène (I)</p>  <p>pKa = 4,5 M = 206 g/mol</p>	

Tableau 1

L'analyse d'une solution contenant l'amphétamine (A), la métamphétamine (MET) et la benzocaïne (BZ) est réalisée par électrophorèse capillaire de zone dans les conditions expérimentales suivantes :

Capillaire de séparation : silice fondue diamètre interne 75 μm , longueur totale 57 cm, longueur effective 50 cm

Electrolyte : tampon phosphate de sodium pH 2,3 ; force ionique 50 mM

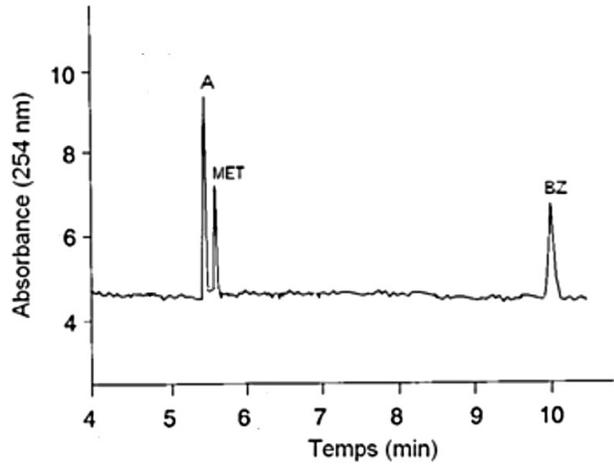
Détection : spectrométrie UV 254 nm, coté cathodique

Injection hydrodynamique : 10 s, 4 kPa, coté anodique

Tension appliquée : 22 kV

Température : 25°C

L'électrophérogramme obtenu est présenté sur la figure 1.



Pic	Temps migration (min)	Largeur mi-hauteur (min)
A	5.41	0.041
MET	5.50	0.045
BZ	9.96	0.120

Figure 1

- 1) Interpréter l'ordre de migration des composés A, MET et BZ.
- 2) Serait-il possible dans ces conditions opératoires de séparer les composés PHM et I ?
- 3) L'utilisation d'un électrolyte de pH 8,8 conduit à une mobilité électroosmotique égale à $5,8 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$. Dans ces conditions, le temps de migration du PHM est égal à 6,80 min. Calculer la mobilité apparente μ_{app} et la mobilité électrophorétique μ_{ep} du PHM (en $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$).
- 4) Dans ces nouvelles conditions, quel serait l'ordre de migration des composés PHM, MET et BZ ?

III. Analyse d'une protéine par électrophorèse capillaire

On considère un dispositif d'électrophorèse capillaire comportant un capillaire en silice fondue. Dans les conditions utilisées, la charge de la paroi du capillaire est négative. La longueur totale du capillaire est $L = 100$ cm, sa longueur effective (jusqu'au détecteur) est $\ell = 90$ cm, son diamètre interne vaut $d = 75$ μm . La différence de potentiel appliquée aux bornes du capillaire est de 20 kV. Le détecteur est situé vers l'extrémité cathodique du capillaire. L'électrolyte de migration est une solution tampon de pH 9 et de force ionique 40 mM. On considère que cette solution a une permittivité relative $\epsilon_r = 80$ et une viscosité $\eta = 1,0$ mPa.s. On donne la permittivité du vide $\epsilon_0 = 8,8542 \cdot 10^{-12}$ SI. La séparation est réalisée à la température de 25°C.

- 1) Une protéine, P, présente dans l'échantillon à analyser, a un temps de migration $t_m(P) = 9,86$ min. Peut-on, à ce stade, en déduire si la charge nette portée par la protéine P est positive ou négative ? Justifier votre réponse.
- 2) Calculer la mobilité électrophorétique apparente μ_{app} de P.
- 3) Sachant qu'un marqueur neutre, N, a un temps de migration $t_m(N) = 5,01$ min, en déduire la valeur du flux électro-osmotique μ_{eo} .
- 4) Calculer la mobilité électrophorétique μ_{ep} de la protéine P. En déduire le signe de sa charge nette. Comment se place le point isoélectrique de P par rapport au pH de l'électrolyte de migration ?