

**Exercices
CAN 201
Chromatographie liquide**

Partie I

1. Si pour les composés A et B, la valeur de k est 0.5 et 5 respectivement :
 - a. Quel analyte passe plus de temps dans la phase mobile?
 - b. Quel analyte passe plus de temps dans la phase stationnaire?
2. Pourquoi le facteur de sélectivité (α) doit être $\neq 1$ pour qu'une séparation entre deux solutés soit possible?
3. Pourquoi utilise-t-on des substances très polaires (thiouree, uracile, nitrate de sodium, etc.) en chromatographie liquide en phase inverse (RPLC) pour déterminer le temps mort (t_0)?
4. Déterminez approximativement le volume mort d'une colonne de 5 cm de longueur et diamètre interne de 2.1 cm.
5. Vous travaillez dans le développement d'une nouvelle méthode de chromatographie liquide. Voici les conditions expérimentales de votre séparation :
Colonne C₁₈, dimensions suivantes : longueur 10 cm, diamètre interne 2.1 mm et diamètre des particules 1.8 μ m. Température : 30 °C; Phase mobile (PM): solvant A (0.1% acide formique dans l'eau) et solvant B (0.1% acide formique dans le méthanol); gradient d'éluion en fonction du %B dans la PM : 0 min 5%, 2 min 5%, 12 min 95%, 16 min 95%, 16.5 min 5%, 20 min 5%. Débit : 500 μ L/min.
 - a. Vous observez qu'à 7 min la pression de votre système est élevée ($\approx 12\ 500$ psi). Cette pression correspond-elle à la valeur attendue? (Utilisez l'équation vue en classe et le Tableau 1 ci-dessous).
 - b. Votre système semble ne pas bien fonctionner à des pressions ≥ 10000 psi. Proposez 2 façons de diminuer la pression de votre système LC en dessous de cette valeur et calculez la pression maximale.

Tableau 1. Viscosité de la PM en fonction de la composition (%B, v/v) et de la température. Pour chaque température et valeur de %B, le chiffre en haut correspond à la viscosité en centipoises (cP) pour méthanol et celle d'en bas à l'acétonitrile. Par exemple à 15 °C, la viscosité d'une PM constitué de 20% eau et 80% méthanol est de 1.40 cP. Pour une PM constituée de 20% eau et 80% d'acétonitrile à la même température, la viscosité est de 0.70 cP.

T °C	%B										
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
15	1.10	1.43	1.72	1.92	2.00	2.02	1.91	1.69	1.40	1.05	0.63
	1.10	1.18	1.23	1.30	1.09	0.98	0.89	0.81	0.70	0.54	0.40
20	1.00	1.32	1.57	1.75	1.83	1.83	1.72	1.52	1.25	0.93	0.60
	1.00	1.14	1.10	1.13	0.99	0.90	0.81	0.69	0.56	0.50	0.37
25	0.89	1.18	1.40	1.56	1.62	1.62	1.54	1.36	1.12	0.84	0.56
	0.89	1.01	0.98	0.98	0.89	0.82	0.72	0.59	0.52	0.46	0.35
30	0.79	1.04	1.23	1.36	1.43	1.43	1.36	1.21	1.01	0.76	0.51
	0.79	0.90	0.87	0.86	0.80	0.74	0.65	0.52	0.45	0.43	0.32
35	0.70	0.92	1.07	1.19	1.24	1.26	1.21	1.09	0.91	0.69	0.46
	0.70	0.73	0.78	0.76	0.72	0.68	0.59	0.47	0.43	0.39	0.30
40	0.64	0.82	0.96	1.05	1.11	1.12	1.08	0.98	0.83	0.64	0.42
	0.64	0.72	0.70	0.68	0.65	0.62	0.54	0.44	0.41	0.36	0.27
45	0.58	0.75	0.87	0.96	1.00	1.02	0.98	0.89	0.76	0.58	0.39
	0.58	0.61	0.64	0.61	0.59	0.58	0.50	0.43	0.38	0.33	0.25
50	0.54	0.71	0.82	0.89	0.93	0.94	0.90	0.82	0.70	0.54	0.37
	0.54	0.60	0.60	0.57	0.55	0.53	0.46	0.41	0.36	0.31	0.24

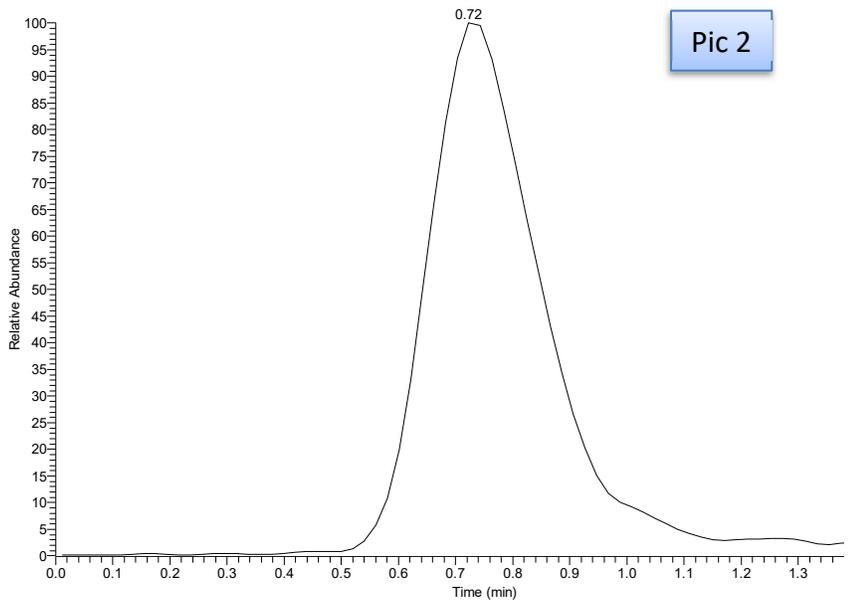
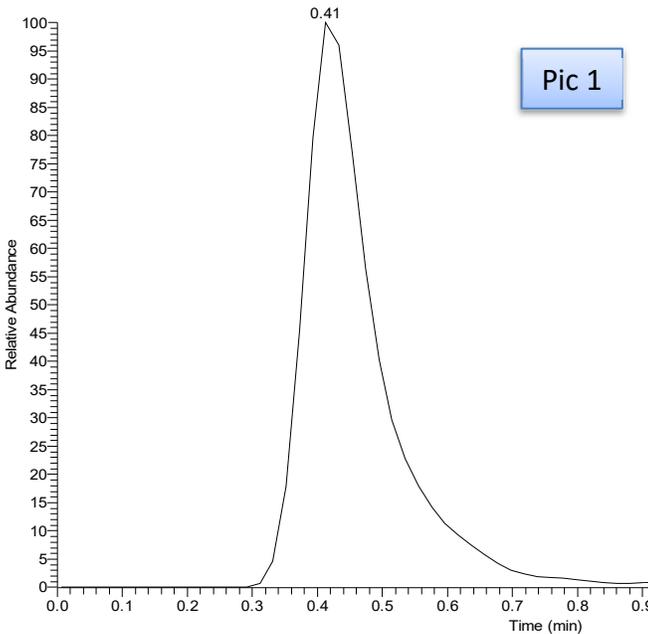
**Exercices
CAN 201
Chromatographie liquide**

Partie II

1. Expliquer dans vos propres mots les phénomènes de contribution à l'élargissement des pics suivants :
 - a. Diffusion d'Eddy :
 - b. Diffusion longitudinale :
 - c. Transfert de masse :
 - d. Contributions externes à la colonne :

2. D'après les paramètres de l'équation de van Deemter, comment peut-on obtenir des plateaux théoriques plus petits lors d'une séparation?

3. Calculer le facteur d'asymétrie A_s des pics 1 et 2 suivants :



Colonne

Longueur 20 mm, diamètre interne: 2.1 mm, taille de particules: 12 μm .

Pic 1: $t_R=0.41$ min, $W=0.54$ min (largeur à la base du pic), $t_{A10\%}=0.34$ min, $t_{B10\%}=0.62$ min

Pic 2: $t_R=0.72$ min, $W=0.8$ min (largeur à la base du pic), $t_{A10\%}=0.58$ min, $t_{B10\%}=0.98$ min

4. Calculer le nombre de plateaux théoriques (N) et la hauteur des plateaux théoriques des pics 1 et 2 de la question précédente.

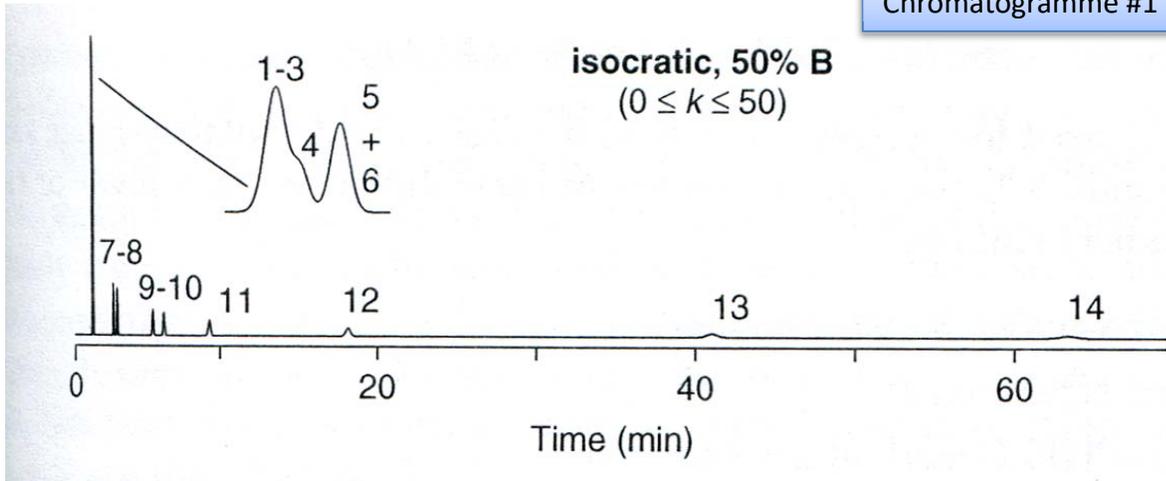
5. D'après les paramètres de l'équation $R_s = \left(\frac{\sqrt{N}}{4}\right) \left(\frac{k_2}{1+k_2}\right) \left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right)$, comment peut-on améliorer la résolution (R_s) d'une séparation chromatographique?

Exercices
CAN 201
Chromatographie liquide

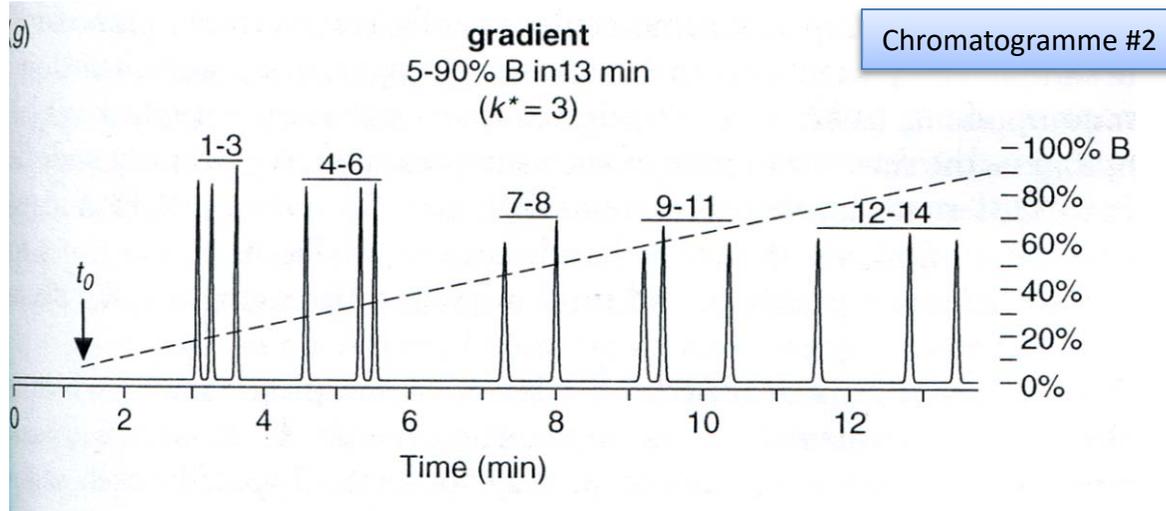
Partie III

1. Les chromatogrammes suivants montrent la séparation d'un mélange de 14 étalons avec les conditions suivantes : PS : C₁₈; PM: A : H₂O, B : acétonitrile.

Élution isocratique (%B=50)



Élution par gradient %B=5-90 en 13 min



- Expliquer le changement du temps de rétention des étalons dans les deux chromatogrammes.
- Quelles sont les avantages de l'élution par gradient par rapport à l'élution isocratique?
- Quel type de gradient est utilisé dans le chromatogramme #2?

Exercices

CAN 201

Chromatographie liquide

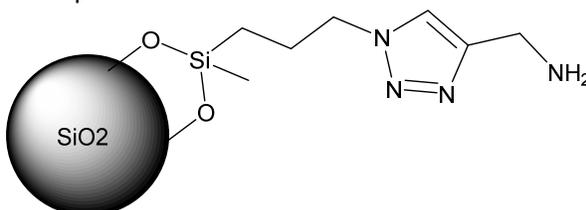
2. Vous voulez développer une méthode de séparation de la base B (pK_a de son acide conjugué=5) par RPLC. Dans vos conditions expérimentales, la valeur de k^0 et de k^\pm sont 10 et 1 respectivement. Déterminer la valeur de k pour cette base lorsque :
 - a. Le pH de la phase mobile est de 5
 - b. Le pH de la phase mobile est de 5.1

3. Supposons qu'en plus de la base B, vous vous intéressez à un soluté neutre S de valeur de $k=6.1$. En sachant que le nombre de plateaux théoriques pour cette séparation est de 10000, calculer :
 - c. La R_s entre le pic B et S lorsque le pH de la phase mobile est de 5
 - d. La R_s entre le pic B et S lorsque le pH de la phase mobile est de 5.1

**Exercices
CAN 201
Chromatographie liquide**

Partie IV

1. Le développement de nouvelles phases stationnaires pour la chromatographie liquide est un domaine de recherche important pour améliorer la sélectivité des séparations des échantillons complexes. En 2012, Liu *et al.* ont publié le développement d'une nouvelle phase stationnaire pour la chromatographie liquide d'interaction hydrophile (HILIC) et la chromatographie ionique. Cette nouvelle phase stationnaire à base de silice a été appelée CTASP (*Click triazole-amino stationary phase*) et sa structure est représentée ci-dessous:



Dans CTASP, la principale contribution à la charge de la phase est due à l'amine primaire dont le pK_a de l'acide conjugué est ≈ 8 .

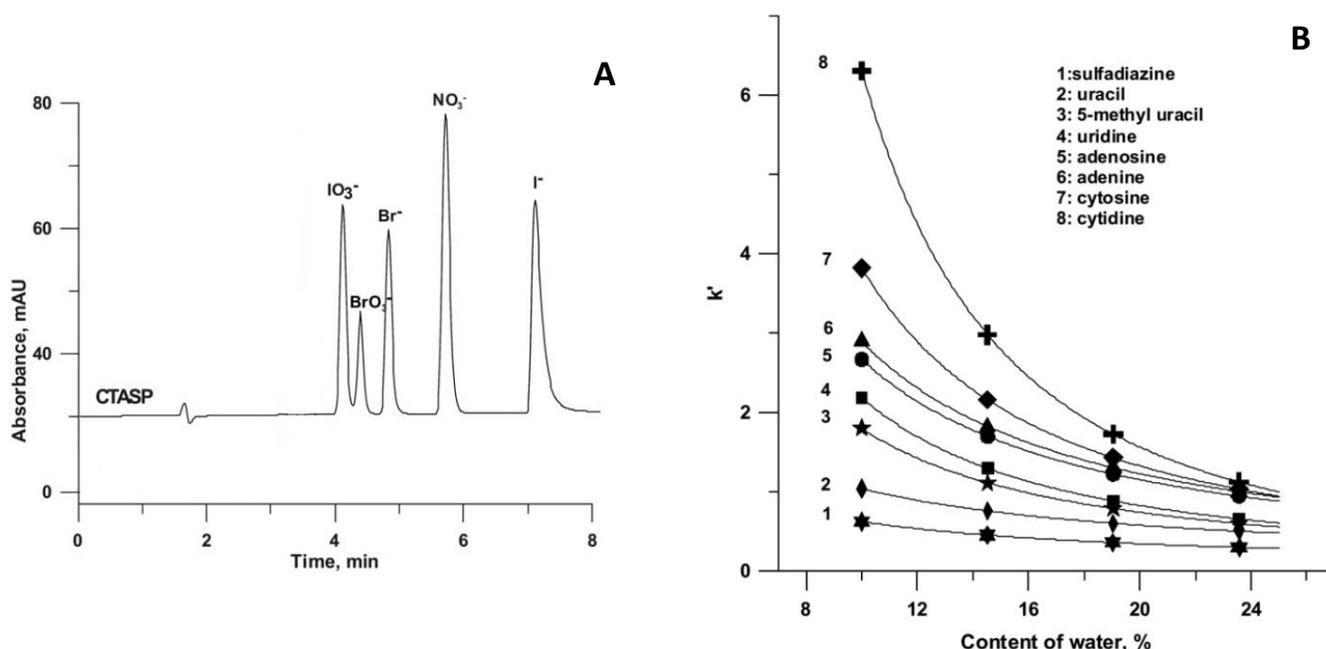


Figure 2. Structures moléculaires des composés séparés avec la colonne de phase stationnaire CTASP.

**Exercices
CAN 201
Chromatographie liquide**

- a. La Figure 1A montre la séparation des plusieurs anions avec la colonne de phase stationnaire CTASP. Expliquez pourquoi ce type de PS peut être utilisé pour la chromatographie ionique.
 - b. Expliquez pourquoi la colonne de phase stationnaire CTASP peut être utilisée dans le mode HILIC.
 - c. Expliquez la tendance observée dans la Figure 1B.
2. Expliquer pourquoi l'eau est le solvant de force d'éluion plus grande en HILIC.
 3. Expliquez avec vos propres mots l'ordre d'éluion des solutés en chromatographie d'exclusion stérique.
 4. Expliquer l'effet de l'augmentation de la concentration de l'ion compétiteur sur la rétention des ions solutés en IC.
 5. Les lipides (acides gras, glycérides, stérols, etc.) sont des substances solubles dans les solvants organiques et insolubles dans l'eau. Avec les glucides et les protéines, les lipides sont les principaux constituants des cellules végétales et animales. Les lipides sont des biomolécules importantes dans tous les systèmes biologiques et servent à de nombreuses fonctions cellulaires (formation de parois cellulaires, communication, stockage d'énergie, etc.) essentielles à la vie. La *lipidomique*, c'est-à-dire l'étude globale des lipides dans un système biologique, pose de multiples défis analytiques en raison de la diversité dans les structures lipidiques. Par exemple, la variation des liaisons et des positions de ou des chaînes d'acyle gras sur le squelette lipidique, la modification des groupes fonctionnels, la présence d'espèces moléculaires sous forme d'isomères géométriques (isomérisie cis-trans) ou structuraux (même composition, différent arrangement spatial des atomes) sont parmi certains des plus grands défis à résoudre en lipidomique.

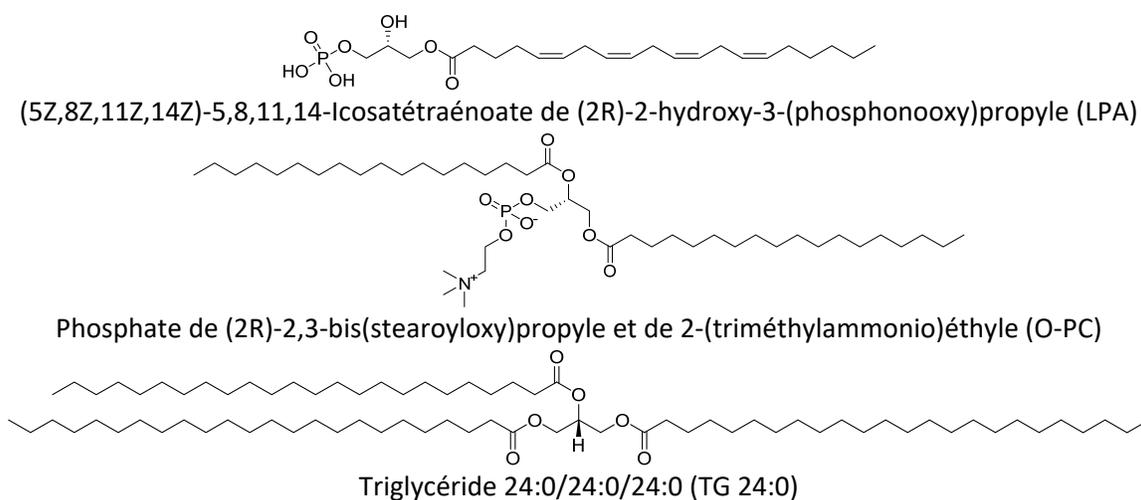


Figure 3. Structure moléculaire de quelques lipides étudiés par Pham et al.

Une méthode publiée en 2018 par Pham *et al.* (*Scientific Reports* 2019, 9 :5048) a utilisé deux types de colonnes, C₃₀ et diol réticulé (Figure 4) pour séparer les lipides de diverses matrices (tissus végétaux, tissus animaux, sols, etc.).

Exercices
CAN 201
Chromatographie liquide

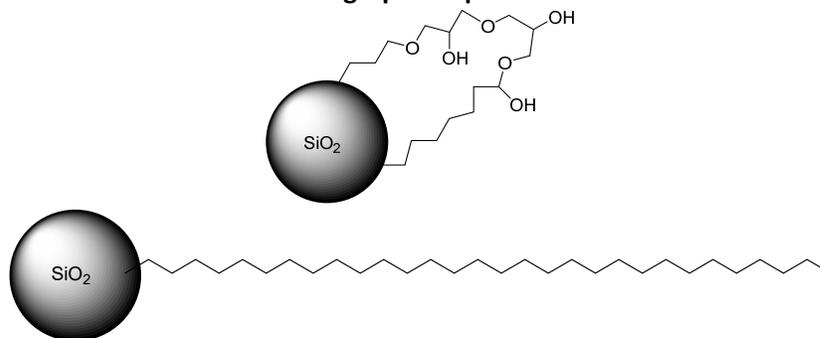


Figure 4. Représentation des phases stationnaires utilisées dans l'étude.

Voici le protocole expérimental :

Extraction des lipides

Les échantillons ont été homogénéisés et 10 à 100 mg d'échantillon ont été transférés dans des tubes à centrifuge dans lesquels 1 mL de méthanol contenant 0.01% d'hydroxytoluène butylé (agent anti-oxydant) et 1 mL de chloroforme ont été ajoutés. Le mélange a été vortexé, puis 0.8 mL d'eau a été ajouté et centrifugé à 5 000× g pendant 15 min. Après centrifugation, la couche organique contenant les lipides a été transférée dans un vial. L'échantillon a été séché sous un courant d'azote. L'échantillon récupéré a ensuite été remis en suspension dans 1 mL chloroforme: méthanol (1: 1 v/v) et stocké à -20 °C pour analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS).

Séparation chromatographique des extraits de lipides

Méthode #1 : Pour la colonne diol réticulé de dimensions 100 x 2 mm (taille de particule: 3 µm) la phase mobile utilisée était la suivante: acétonitrile: eau (97:3 v/v) contenant 10 mM d'acétate d'ammonium (solvant A) et solvant B contenant 10 mM d'acétate d'ammonium dans de l'eau. La séparation a été effectuée à 25 °C avec un débit de 0.2 mL/min et 10 µL de l'extrait lipidique ont été injectés dans le chromatographe liquide. Le gradient du système a été maintenu à 100% de solvant A pendant 2 min; le solvant B a ensuite été augmenté à 10% en 23 min, le solvant B de 10 à 15% en 10 minutes, puis maintenu à 15% de B pendant 5 minutes. La colonne a été équilibrée dans les conditions de départ (100% de solvant A) pendant 10 minutes avant chaque nouvelle injection.

Méthode #2 : Pour la colonne C₃₀ de dimensions 150 x 2 mm (taille de particule: 2.6 µm) la phase mobile utilisé était constituée du solvant A (acétonitrile: H₂O 60:40 v/v) et du solvant B (isopropanol: acétonitrile: eau 90:10: 1 v/v/v) contenant tous deux 10 mM de formate d'ammonium et de 0.1% d'acide formique. La séparation a été réalisée à 30 °C avec un débit de 0.2 mL/min et 10 µL de l'extrait lipidique ont été injectés dans le chromatographe liquide. Le gradient suivant a été utilisé : 30% de solvant B pendant 3 min; puis le solvant B a augmenté à 43% en 5 min, puis à 50% de B en 1 min, puis à 90% de B en 9 min, puis à 99% de B en 8 min et finalement maintenu à 99% de B en 4 min. La colonne a été équilibrée dans les conditions de départ (70% de solvant A) pendant 5 min avant chaque nouvelle injection.

- a. Vous vous intéressez à l'analyse des lipides et vous répétez cette expérience. Vous constatez que les taux de récupération de l'extraction de vos lipides sont faibles (<20%). Selon la littérature scientifique le mélange méthanol-chloroforme utilisé par les auteurs est le meilleur solvant pour l'extraction des lipides. Comment pourriez-vous améliorer ce taux? Donnez une approche et expliquez-la en vous basant sur les concepts d'extraction liquide-liquide vus en classe.

Exercices
CAN 201
Chromatographie liquide

- b. Les auteurs affirment que la méthode #1 est complémentaire à la méthode #2 pour la séparation des lipides de différentes classes. Expliquez cette affirmation en vous basant sur les différences de sélectivité et les principes de base de chacun de modes de chromatographie liquide utilisés dans ces deux méthodes.
- c. Les auteurs ont utilisé deux temps d'équilibration différents dans les méthodes #1 et #2. Expliquez pourquoi cette étape est importante et confirmez par un calcul si les temps minimaux d'équilibration ont été respectés.
- d. Expliquez les différences dans l'ordre d'éluion des lipides O-PC et LPA selon les chromatogrammes obtenus avec la méthode #1 et la méthode #2 (Figure 5).

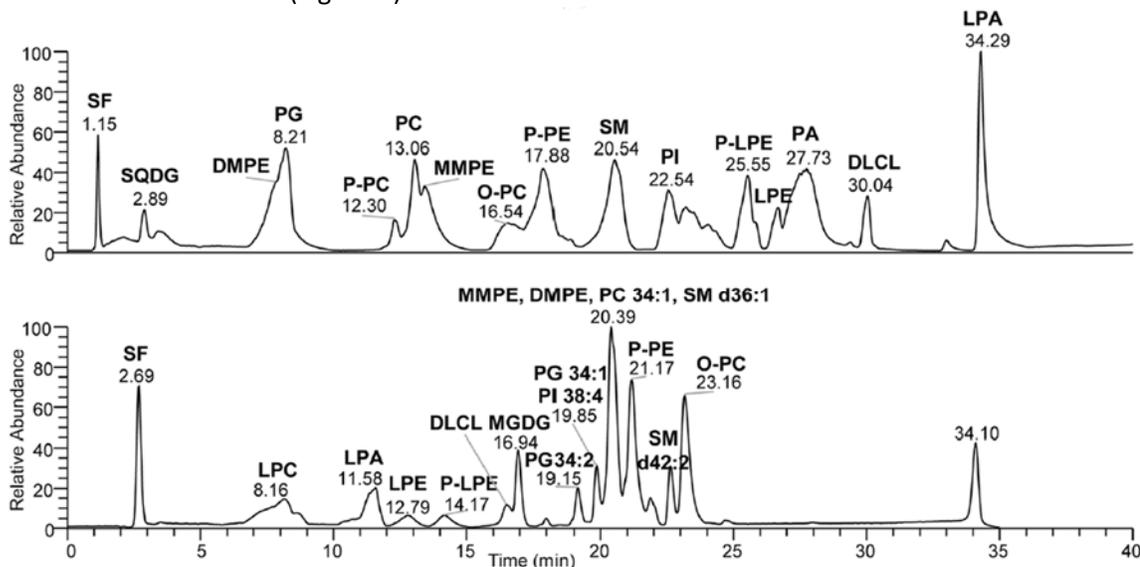


Figure 5. Chromatogrammes de la séparation d'un mélange de lipides avec la méthode #1 (en haut) et la méthode #2 (en bas).

6. La recherche des nouvelles approches plus écologiques et durables en chimie analytique a mené au développement des méthodes plus vertes et moins polluantes telles que l'extraction sur phase solide et l'extraction par liquide pressurisé. En 2006, Tasaki et Okada ont publié un article décrivant l'étude de la glace comme une nouvelle phase stationnaire pour la chromatographie liquide. Dans cet article, les auteurs ont évalué la performance de la glace pour la séparation des divers composés organiques dont ceux de la Figure 6.

Dibenzo-18-crown-6 (DB18C6)

Dibenzo-24-crown-8 (DB24C8)

Figure 6. Structures moléculaires des analytes utilisés par Tasaki et Okada dans leur étude.

D'après les auteurs, le mécanisme principal de rétention de la « chromatographie sur glace » est l'adsorption des solutés sur la surface de la glace (Figure 7) par la formation des ponts H. La glace peut agir comme donneur et receveur de ponts H.

Exercices
CAN 201
Chromatographie liquide

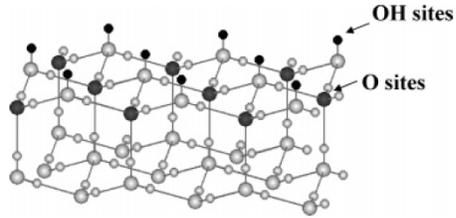


Figure 7. Structure de la phase stationnaire et des composants de la phase mobile.

Voici une description de la méthode expérimentale :

Le système chromatographique était composé d'une pompe HPLC, d'un injecteur équipé d'une boucle d'injection de 100 μL . Les particules de glace ont été préparées en introduisant des gouttelettes d'eau nébulisée directement dans l'azote liquide. Les diamètres de particules de glace mesurés au microscope variaient de 20 à 100 μm et étaient typiquement de 50 μm . Les particules de glace ont été placées dans une colonne en polyétheréthercétone (polymère résistant les pressions élevées) de 150 \times 7.5 mm et immergée dans de l'azote liquide. Après conditionnement, la colonne a été transférée dans un bain à basse température. La température de la colonne de séparation, de la boucle d'injection et du réservoir de solvant a été maintenue entre environ -12 et -15 $^{\circ}\text{C}$. La phase mobile a été pré-refroidie en passant à travers un tube enroulé connecté entre la pompe et l'injecteur d'échantillon. Des mélanges tétrahydrofurane/hexane dégazés par ultrasons ont été utilisés comme phase mobile.

- Est-ce que la chromatographie sur glace peut être classifiée comme une chromatographie d'interaction hydrophile? Expliquez selon les caractéristiques de ce mode de chromatographie liquide.
- Calculez le facteur de rétention ainsi que la hauteur des plateaux théoriques (en μm) pour le pic de DB24C8 à l'aide du chromatogramme suivant (Figure 8) :

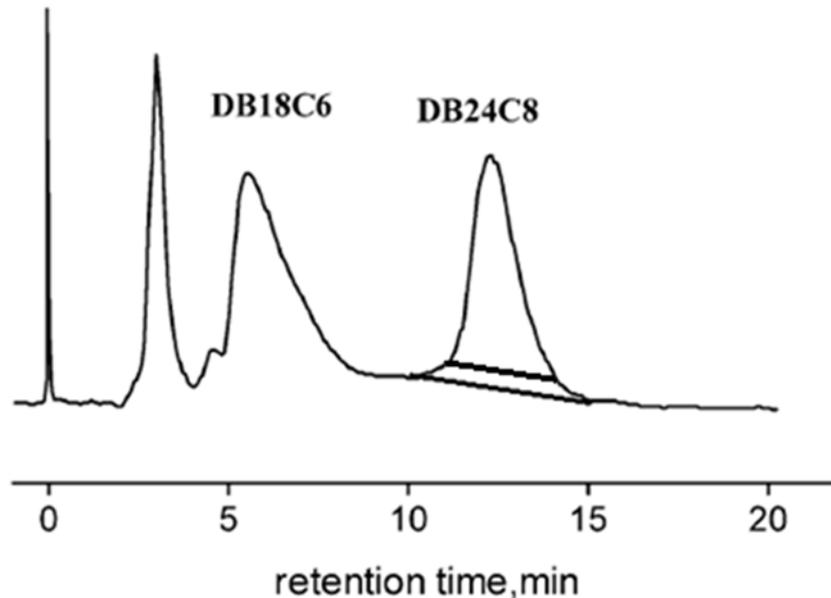


Figure 8. Chromatogramme de la séparation de DB18C6 et DB24C8 par chromatographie sur glace avec une élution isocratique à 3% (v/v) de tétrahydrofurane dans l'hexane. Le pic à 2.8 min correspond à un constituant non retenu par la colonne. Les lignes sous le pic DB24C8 indiquent la largeur du pic à la base et à 10% de la hauteur.

Exercices
CAN 201
Chromatographie liquide

- c. Les auteurs affirment que le diamètre relativement élevé des particules de glace a causé l'élargissement des pics observé dans le chromatogramme de la Figure 8 et explique la hauteur des plateaux théoriques obtenue (en comparaison, les colonnes ayant des particules de $1.7 \mu\text{m}$ ont des $H=5 \mu\text{m}$). Expliquez cette affirmation en fonction de la théorie vue en classe.
- d. Expliquez les différences observées entre les temps de rétention de DB18C6 et DB18C24 sur chromatogramme de la Figure 8.

**Exercices
CAN 201
Chromatographie liquide**

Partie V

1. La présence de faibles concentrations de composés pharmaceutiques dans l'environnement est un phénomène connu depuis plusieurs années. Ce type de contamination est préoccupant puisque les effets chroniques de ces substances sur les espèces aquatiques ne sont pas encore connus. Récemment, certaines drogues illicites (voir Figure 1) ont été détectées dans les eaux usées municipales au Canada à des concentrations de l'ordre du nanogramme par litre [Metcalf C., *et al.* (2010) *Environmental Pollution* 158(10):3179-3185].



Figure 1. Structures des drogues illicites ciblées par l'étude de Metcalfe *et al.* Les composés ont été dessinés sous leur forme protonnée.

Voici un résumé de la méthode utilisée pour extraire et analyser les drogues illicites des échantillons d'eau de rivière :

Extraction des analytes

Les échantillons d'eau de rivière ont été filtrés avec des filtres de fibre de verre de taille de pores de 1.5 μm . Avant l'extraction, le pH des échantillons a été ajusté à 3.0 avec l'acide sulfurique. Les sorbants des cartouches Oasis MCX ont été préparés pour l'extraction avec 6 mL de méthanol et 10 mL d'eau à pH 3.0. Ensuite, les échantillons d'eaux usées ont été introduits dans les cartouches à un débit de 10 mL/min. Une fois l'introduction de l'échantillon a été finie, les cartouches ont été rincées avec 10 mL d'eau et 3 mL de 5% méthanol dans l'eau. L'élution a été faite avec 2 \times 3 mL de 5% hydroxyde d'ammonium dans le méthanol. Les échantillons ont été évaporés presque à sec et ensuite redissous avec une solution de 50% méthanol dans l'eau.

Analyse

Les analytes ont été séparés par chromatographie liquide à température de la pièce à un débit de 0.2 mL/min dans une colonne C_{18} . Un gradient d'élution a été utilisé pour séparer les analytes. La phase mobile était constituée de 0.1% d'acide formique dans l'eau (solvant A) et d'acétonitrile (solvant B). Le volume d'injection a été de 20 μL . La détection des analytes a été réalisée par un analyseur de spectrométrie de masse de type triple quadripôle en utilisant une source d'électronébulisation dans le mode positif.

- Quelle technique de séparation a été utilisée pour extraire les drogues illicites des eaux usées? Expliquez le principe de fonctionnement de cette technique.
- Les cartouches MCX sont des cartouches polymériques de type échangeurs cationique fort. Justifiez l'utilisation de ce type de cartouche et les conditions d'extraction utilisées (ajustement de pH, solvant d'élution) en fonction des propriétés des analytes ciblés par cette étude.
- Selon ce protocole, quel type de chromatographie liquide (ionique, phase inverse, phase normale, interaction hydrophile) a été utilisée? Justifiez votre réponse.

Exercices

CAN 201

Chromatographie liquide

- Le protocole indique qu'un gradient d'élution a été utilisé pour réaliser la séparation des analytes. Expliquez en quoi consiste ce mode d'élution et quels sont ses principaux avantages.
 - Décrivez brièvement le fonctionnement d'une source d'électronébulisation.
2. La Figure ci-dessous montre le chromatogramme d'un échantillon contenant un mélange de 10 anions obtenu par chromatographie ionique et détection par conductivité avec suppresseur.

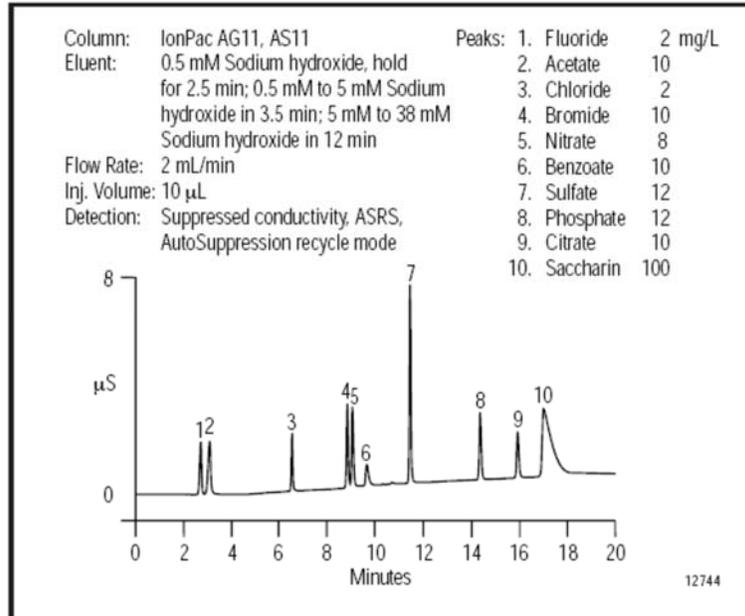


Figure 2. Conditions expérimentales : colonne IonPac AG11 ; phase mobile : gradient de concentration de NaOH (0.5mM à 38 mM) ; débit : 2 mL/min, volume d'injection : 10 µL. Dans le suppresseur, Na⁺ est échangé contre H⁺. Pics : 1) F⁻, 2) CH₃COO⁻, 3) Cl⁻, 4) Br⁻, 5) NO₃⁻, 6) C₆H₅COO⁻, 7) SO₄²⁻, 8) PO₄³⁻, 9) citrate (C₆H₅O₇³⁻) et 10) saccharine (C₇H₄NO₃S).

- La séparation se fait-elle par échange anionique ou cationique ? Expliquez.
 - D'après la Figure 2, pour les deux réactions suivantes qui ont lieu dans la colonne chromatographique, laquelle est la plus déplacée vers la droite ? Expliquez.
$$OH^-_{(PS)} + Cl^-_{(PM)} \rightleftharpoons OH^-_{(PM)} + Cl^-_{(PS)}$$
$$3OH^-_{(PS)} + Citrate^{3-}_{(PM)} \rightleftharpoons 3OH^-_{(PM)} + Citrate^{3-}_{(PS)}$$
 - Quel est l'avantage principal de la détection par conductivité avec suppresseur par rapport à la détection par conductivité directe (sans suppresseur) ?
3. Pourquoi a-t-on besoin d'une source d'ions lorsque l'on fait la spectrométrie de masse ?
4. Quelles sont les avantages de la détection par spectrométrie de masse en tandem par rapport à la détection avec un seul analyseur de masse ?
5. Pourquoi observe-t-on des pics négatifs dans la détection indirecte par conductivité ?
6. Pourquoi en IC la détection par conductivité avec suppresseur est plus sensible que la détection par conductivité directe (sans suppresseur) ?