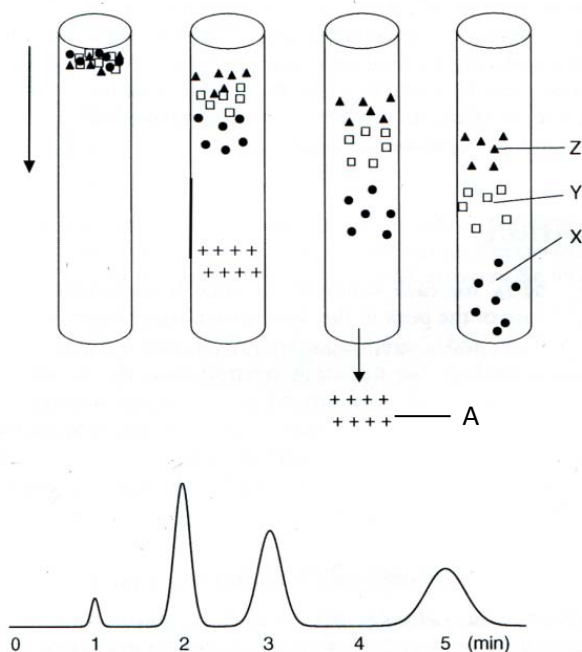


Exercices en classe
CAN 306
Chromatographie liquide

Partie I

1. Pour la figure suivante :

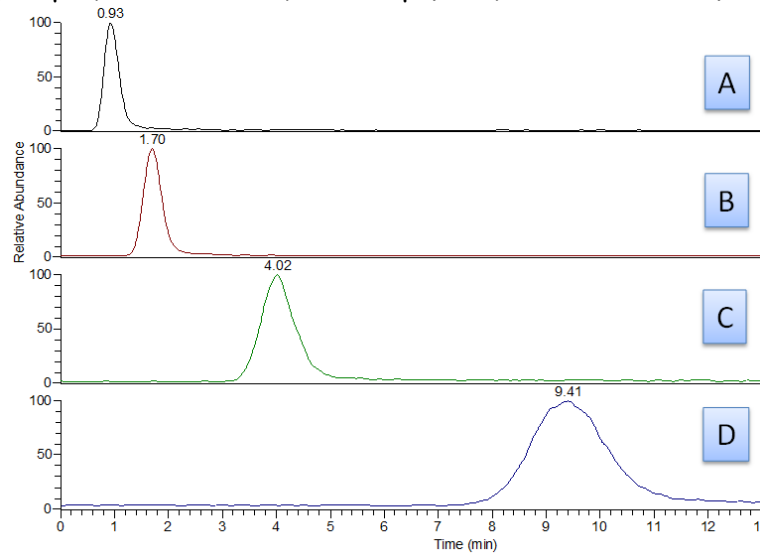


- a. Identifier chaque pic de cette séparation dans le chromatogramme (Le composé A représente un soluté non retenu par la phase stationnaire).
- b. Classifier les solutés A, Z, Y et X par ordre de polarité croissante en sachant que la phase stationnaire est de type C₁₈ et la phase mobile est 50% méthanol dans H₂O.
- c. Calculer k pour Z, Y et X en sachant que :

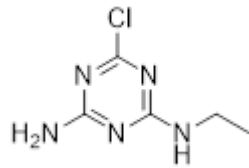
$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{t'_R}{t_0}$$

2. 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?
3. Pourquoi le facteur de sélectivité (α) doit être $\neq 1$ pour qu'une séparation entre deux solutés soit possible?
4. Pourquoi utilise-t-on des substances très polaires (thiourée, uracile, nitrate de sodium, etc.) en chromatographie liquide en phase inverse (RPLC) pour déterminer le temps mort (t_0)?

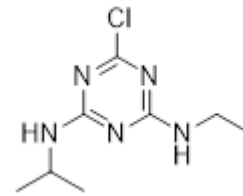
5. Le chromatogramme suivant représente la séparation de 2 herbicides et 2 de ses métabolites (atrazine, simazine, dééthylatrazine et déisopropylatrazine) dans les conditions expérimentales suivantes : Colonne: Hypersil Gold (C₁₈) 20×2.1mm, 12 μm, V₀= 0.058 mL, F = 200 μL/min, PM=40% MeOH/60% H₂O.



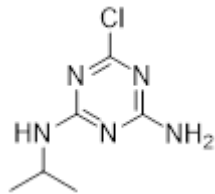
Les structures des analytes sont les suivantes :



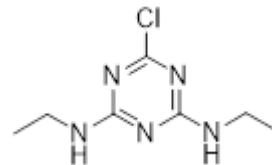
Déisopropylatrazine



Atrazine

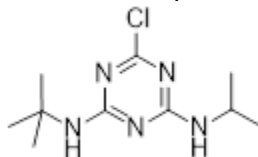


Dééthylatrazine



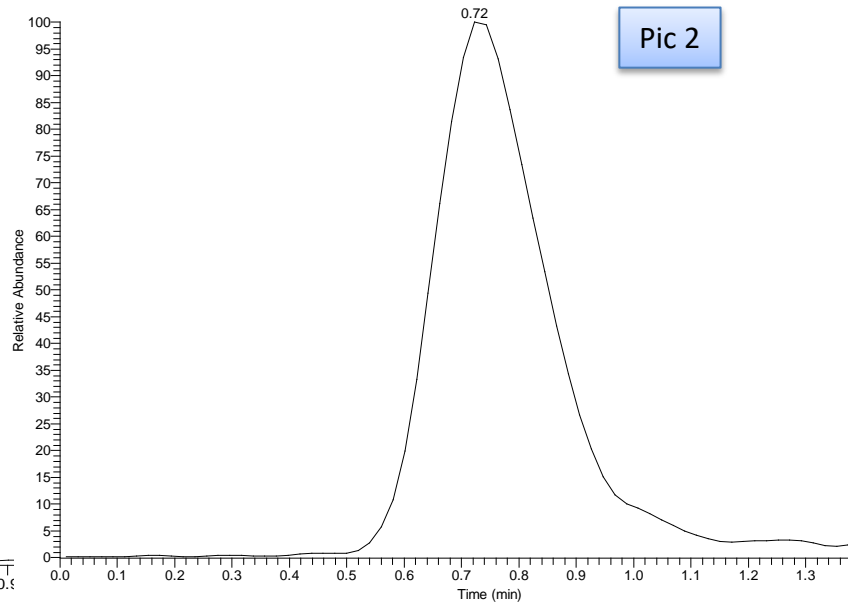
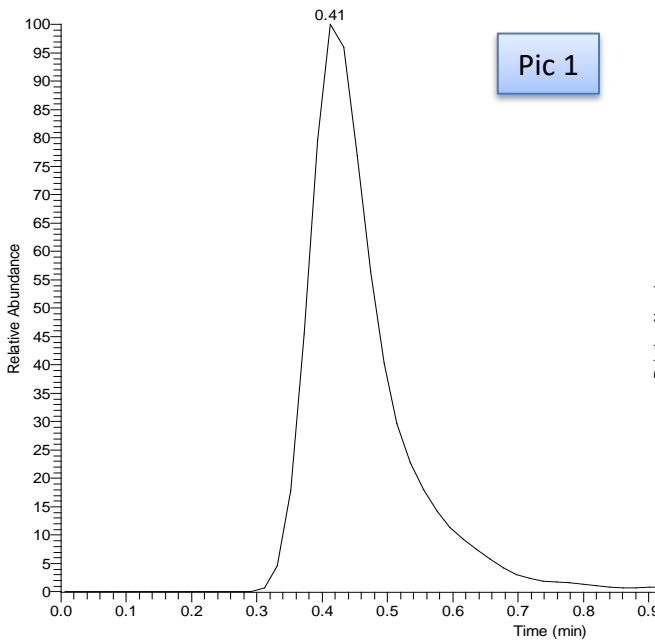
Simazine

- Pourquoi cette séparation peut être classifiée comme en phase inverse?
- Associer un analyte à chaque pic du chromatogramme.
- Déterminer t_0 et le facteur de rétention (k) pour les 4 analytes.
- Est que k pour l'analyte suivant serait plus élevée ou plus bas que celui de l'atrazine dans les mêmes conditions expérimentales?



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

Formules

$$A_s = B/A$$
$$A = t_R - t_{A10\%} \quad B = t_{B10\%} - t_R$$
$$W_{10\%} = t_B - t_A$$

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

Formules

$$N = \frac{41.7 \left(\frac{t_R}{W_{10\%}} \right)^2}{(B/A) + 1.25} \quad N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad H = \frac{L}{N}$$

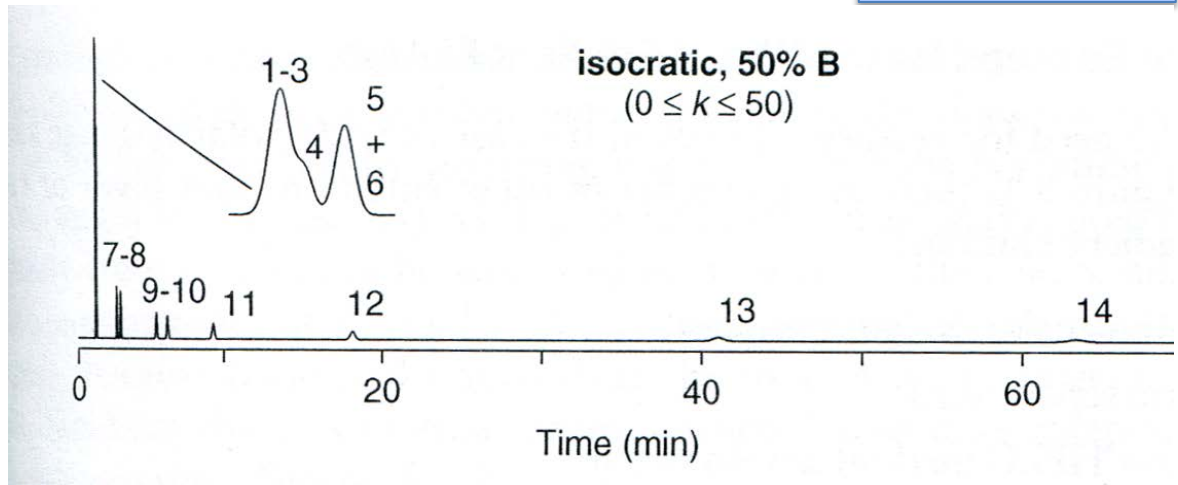
5. D'après les paramètres de l'équation $R_s = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{k_2}{1+k_2} \right) \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right)$, comment peut-on améliorer la résolution (R_s) d'une séparation chromatographique?

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.

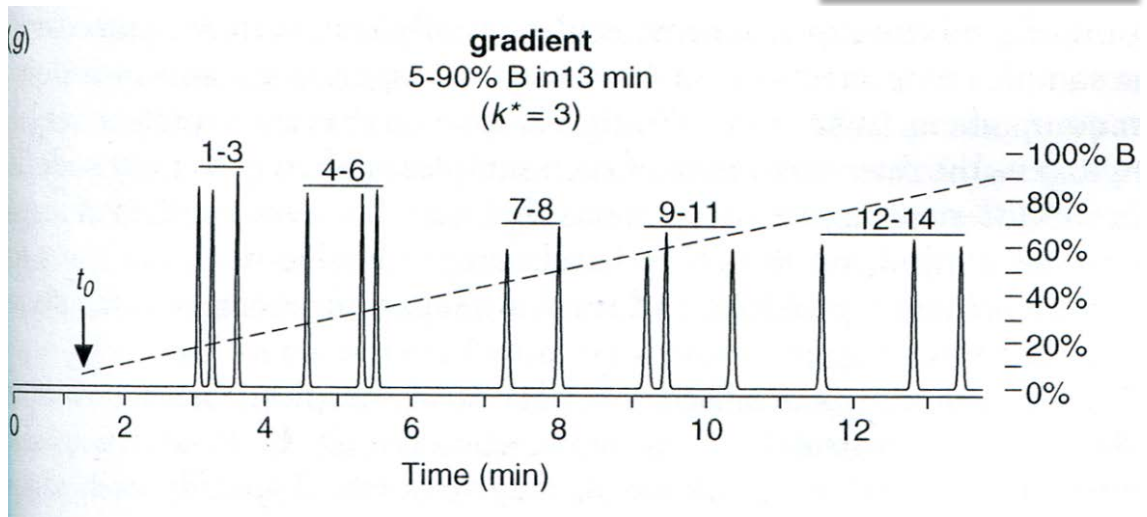
Élution isocratique (%B=50)

Chromatogramme #1



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

Chromatogramme #2



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

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

$$k = k^0(1 - \chi) + k^\pm \chi$$

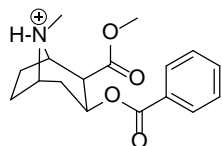
$$\chi = \frac{1}{1 + 10^{(pH - pK_a)}}$$

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

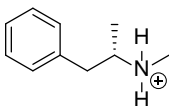
$$R_s = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{k_2}{1 + k_2} \right) \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right)$$

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

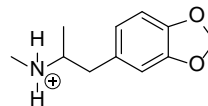
4. Expliquer l'effet de la diminution pourcentage volumique du tampon (solvant aqueux) dans la composition de la phase mobile sur la rétention en HILIC.
5. Expliquez avec vos propres mots l'ordre d'élué des solutés en chromatographie d'exclusion stérique.
6. Expliquer l'effet de l'augmentation de la concentration de l'ion compétiteur sur la rétention des ions solutés en IC.
7. 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 ci-dessous) 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].



Cocaïne
 $pK_a=8.85$



Méthamphétamine
 $pK_a=10.14$



3,4-méthylènedioxy-
méthamphétamine
 $pK_a=10.14$

Figure. 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

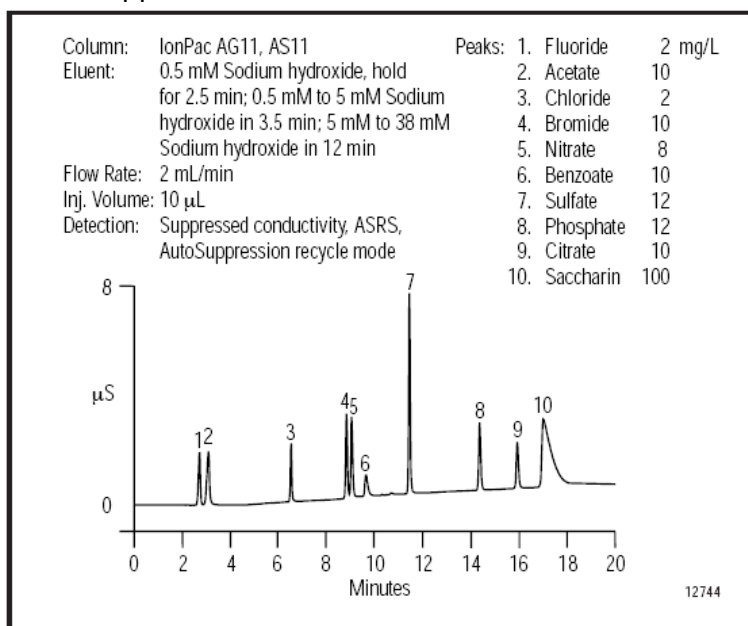
Les analytes ont été séparés par chromatographie liquide à température de la pièce à un débit de 0.2 mL/min dans une colonne C_{18} . Un gradient d'élution a été utilisé pour séparer les analytes. La phase mobile était constituée de 0.1% d'acide formique dans l'eau (solvant A) et d'acétonitrile (solvant 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.

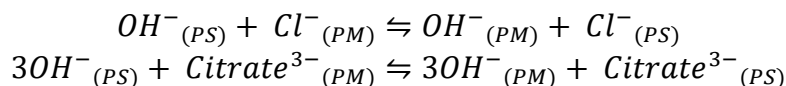
- Selon ce protocole, quel type de chromatographie liquide (ionique, phase inverse, phase normale, interaction hydrophile) a été utilisée? Justifiez votre réponse.
- Le protocole indique qu'un gradient d'élution a été utilisé pour réaliser la séparation des analytes. Expliquez en quoi consiste ce mode d'élution et quels sont ses principaux avantages.
- Décrivez brièvement le fonctionnement d'une source d'électronébulisation.

8. 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.



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 le **Figure 1**, pour les deux réactions suivantes qui ont lieu dans la colonne chromatographique, laquelle est la plus déplacée vers la droite ? Expliquez.



- Quel est l'avantage principal de la détection par conductivité avec suppresseur par rapport à la détection par conductivité directe (sans suppresseur) ?

9. Identifier 2 détecteurs utilisés en LC et décrire brièvement son principe de fonctionnement.
10. Pourquoi a-t-on besoin d'une source d'ion lorsque l'on fait la spectrométrie de masse ?
11. Quelles sont les avantages de la détection par spectrométrie de masse en tandem par rapport à la détection avec un seul analyseur de masse ?
12. Pourquoi observe-t-on des pics négatifs dans la détection indirecte par conductivité?
13. Pourquoi en IC la détection par conductivité avec supprimeur est plus sensible que la détection par conductivité directe (sans supprimeur) ?