



UE XLP5CE033
Techniques Séparatives

HPLC et CPG

Exercices

LICENCE PROFESSIONNELLE
METROLOGIE CHIMIQUE ET NUCLEAIRE

2024-2025

HPLC

Exercice 1

Dans un système chromatographique à phase inverse, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) suivants ont un facteur de rétention qui vaut :

-Aspirine = 0,4

-Diclofénac = 10,4

-Ibuprofène = 14,5

-Naproxène = 3,6

Sachant que le temps mort est de 2 minutes, quels sont les temps de rétention ?

Exercice 2

Le dosage du minoxidil, un médicament favorisant la repousse des cheveux, est réalisé par HPLC. Les conditions sont les suivantes :

Volume injecté : 10 μ L

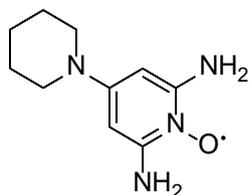
Débit : 1 mL.min⁻¹

Colonne : silice (RP-18)

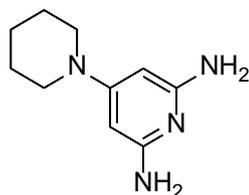
Détecteur : spectrophotomètre UV réglé sur 240 nm

Déroulement du chromatogramme : 2 cm.min⁻¹

$t_m = 0,87$ min ; t_r du minoxidil = 2,56 min ; ω_{50} du minoxidil = 2 mm ; ω_{50} du désoxyminoxidil = 2 mm



Minoxidil



Désoxyminoxidil

- Calculez le volume mort du système chromatographique.
- L'analyse par HPLC n'est valable que si la résolution entre le minoxidil et le désoxyminoxidil, son impureté principale, est >2 . Quel devra donc être le temps minimum ou maximum de rétention et les facteurs de rétention correspondants de cette impureté ?
- Calculez la sélectivité entre ces deux pics.
- Calculez l'efficacité de la colonne pour le dosage du minoxidil.
- Tenant compte de la polarité et de la nature des phases mobiles et stationnaires, le temps d'élution de l'impureté sera-t-il supérieur ou non à celui du minoxidil ?

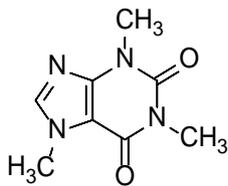
Exercice 3

Un sirop antitussif ($d = 1,25$) censé contenir 0,3 % (m/v) de phosphate de codéine est analysé par HPLC équipée d'une colonne à phase inverse, une phase mobile constituée d'acide acétique 0,1 M et de méthanol (40 : 60) contenant 0,01 M d'octanesulfonate. La détection est effectuée à 285 nm. Une calibration à un seul point est effectuée en utilisant une solution de référence contenant 0,06047 % (m/v) de phosphate de codéine qui donne une AUC de 84732. Avant injection, l'échantillon de sirop (12,7063 g) est amené à 50,0 mL avec de l'eau. L'AUC du phosphate de codéine provenant de l'échantillon est de 86983. Quelle est la concentration massique en phosphate de codéine du sirop exprimée en % (m/v) ?

Exercice 4

Dosage par HPLC de la caféine contenue dans le Coca-Cola par 3 méthodes différentes :

- La droite d'étalonnage
- La méthode des ajouts dosés
- L'étalon interne



L'analyse se fait sur une colonne C18 (250*4 : 5 μ m) en mode isocratique avec pour éluant un mélange acétonitrile/eau (70/30 (v/v)). La pression est de 141 bars. La détection se fait en UV à 254 nm.

Préparation de la solution mère (S_m) : L'extraction a été réalisée sur 250 mL de Coca-Cola. Dissoudre la totalité de la caféine recueillie dans de l'éluant et porter au trait de jauge dans une fiole jaugée de 20,0 mL.

Préparation de la solution fille (S_f) : Dans une fiole de 20,0 mL, introduire 30,0 μ L de la solution mère préparée précédemment et compléter à 20,0 mL avec de l'éluant.

- La droite d'étalonnage

Préparation des solutions standards :

A partir d'une solution de caféine de référence à 1,021 g.L⁻¹ dans l'éluant, 5 solutions diluées sont préparées dans 5 fioles jaugées de 20,0 mL. Ces solutions sont injectées dans la boucle de 20,0 μ L, à l'aide d'une seringue de 250 μ L.

Fiole jaugée	Volume solution de caféine de référence (μ L)	AUC du pic de la caféine
A	10,0	0,124
B	20,0	0,232
C	30,0	0,331
D	40,0	0,447
E	50,0	0,548

Dosage de la caféine contenue dans le Coca-Cola :

Injecter 20,0 μL de la solution fille (S_f) dans la boucle de 20,0 μL , à l'aide d'une seringue de 250 μL . L'AUC du pic de la caféine est de 0,312.

Quelle est la concentration en caféine dans le Coca-Cola ?

b) La méthode des ajouts dosés

Préparation des solutions standards et dosage de la caféine contenue dans le Coca-Cola :

A partir d'une solution de caféine de référence à 1,021 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dans l'éluant et de la solution mère (S_m) de caféine à doser, 5 solutions diluées sont préparées dans 5 fioles jaugées de 20,0 mL. Ces solutions sont injectées dans la boucle de 20,0 μL à l'aide d'une seringue de 250 μL .

Fiole jaugée	Volume solution de caféine de référence (μL)	Volume solution mère (S_m) de caféine (μL)	AUC du pic de la caféine
A'	0	50,0	0,508
B'	5,0	50,0	0,562
C'	10,0	50,0	0,618
D'	15,0	50,0	0,671
E'	20,0	50,0	0,728

Quelle est la concentration en caféine dans le Coca-Cola ?

c) L'étalon interne

Préparation du mélange standard + étalon interne :

Dans une fiole jaugée de 20,0 mL, ajouter 30,0 μL de solution de caféine de référence de concentration 1,021 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et 30,0 μL de solution de benzoïne de concentration 1,087 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Amener au trait de jauge à 20,0 mL avec l'éluant. Injecter ce mélange dans la boucle de 20,0 μL .

Composé	t_r (min)	AUC
Benzoïne	1,60	0,980
Caféine	1,00	0,361

Préparation du mélange solution inconnue + étalon interne :

Dans une fiole jaugée de 20,0 mL, ajouter 30,0 μL de la solution mère (S_m) et 30,0 μL de solution de benzoïne de concentration 1,087 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Amener au trait de jauge à 20,0 mL avec l'éluant. Injecter ce mélange dans la boucle de 20,0 μL .

Composé	t_r (min)	AUC
Benzoïne	1,60	0,998
Caféine	1,00	0,334

Quelle est la concentration en caféine dans le Coca-Cola ?

Exercice 5

Des comprimés censés contenir 100 mg de naproxène et 250 mg d'aspirine sont analysés par HPLC. Une courbe de calibration est effectuée dans une plage de concentration de $\pm 20\%$ par rapport aux valeurs annoncées. La détection est effectuée à 278 nm. Le poids moyen de 20 comprimés est de 10,3621 g. Après avoir broyé les comprimés, on met en suspension 257,1 mg dans 250 mL de méthanol. Après filtration, 10,0 mL de la solution sont amenés à 100,0 mL avec la phase mobile ; de cette solution, 20,0 mL sont prélevés et amenés à 100,0 mL. C'est cette solution qui est analysée. Les droites de calibration sont les suivantes :

Pour le naproxène : $AUC = 174040 \times [\text{mg} \cdot 100\text{mL}^{-1}] + 579$; $r = 0,999$

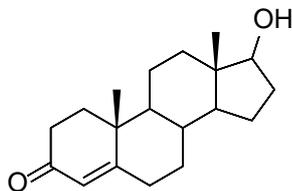
Pour l'aspirine : $AUC = 54285 \times [\text{mg} \cdot 100\text{mL}^{-1}] + 1426$; $r = 0,999$

Le chromatogramme de l'échantillon analysé donne les valeurs suivantes : $AUC_{\text{NAP}} = 72242$ et $AUC_{\text{ASP}} = 54819$

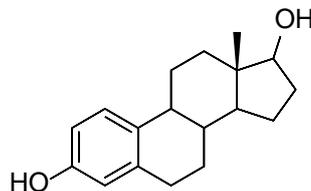
Quelle est la teneur (%) en naproxène et en aspirine dans les comprimés ?

Exercice 6

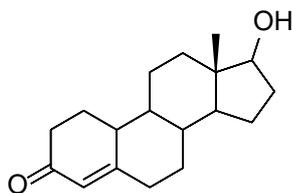
Un mélange des 4 stéroïdes suivants est dosé par HPLC sur une colonne de type octadécylsilane (ODS ou C18 ou RP-18). La phase mobile est constituée d'un mélange méthanol/eau (70 : 30). Quel sera l'ordre d'élution de ces stéroïdes ?



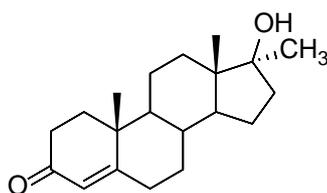
1 Testostérone



2 Oestradiol



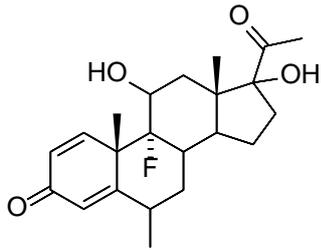
3 Nandrolone



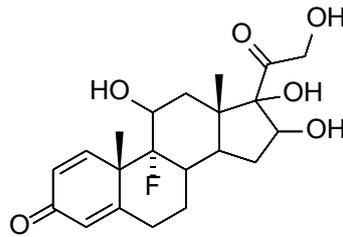
4 Méthyltestostérone

Exercice 7

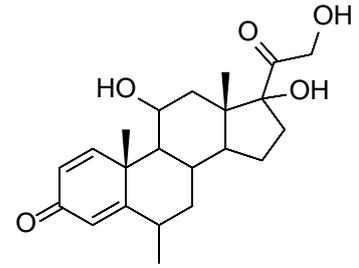
Dans un système HPLC, les stéroïdes suivants sont séparés sur une colonne de type octadécylsilane (ODS ou C18 ou RP-18) à l'aide d'une phase mobile méthanol/eau (60 : 40). Quel est leur ordre d'élution ?



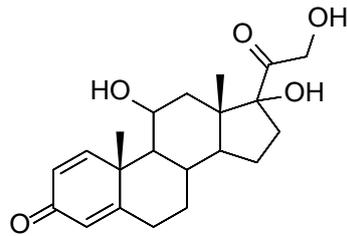
1 Fluométholone



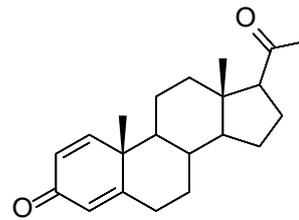
2 Triamcinolone



3 Méthylprednisolone



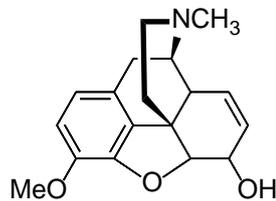
4 Prednisolone



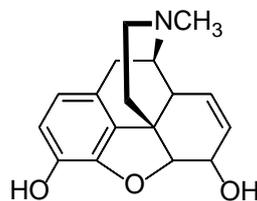
5 Progestérone

Exercice 8

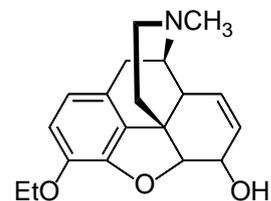
Dans un système HPLC, la morphine et 5 molécules apparentées sont séparées sur une colonne de type RP-18 (octadécylsilane ou ODS ou C18) à l'aide d'une phase mobile acétonitrile/tampon pH 8,0 (10 : 90). Quel est leur ordre d'éluion en postulant que les valeurs de pKa de la fonction amine sont similaires ?



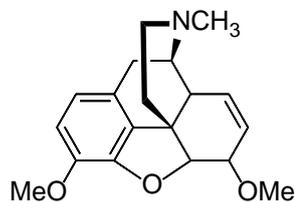
1 Codéine



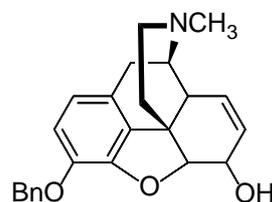
2 Morphine



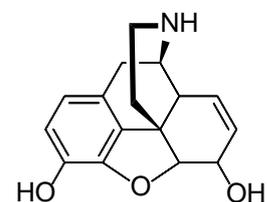
3 Ethylmorphine



4 Thébaïne



5 Benzylmorphine



6 Normorphine

CPG

Exercice 1

Le dosage du limonène et du citronellal, deux composés contenus dans l'huile essentielle de citronnelle, est effectué par chromatographie en phase gazeuse. Une solution de référence contenant ces deux molécules est préparée de la manière suivante : 3,0 mL de citronellal (masse volumique = 0,85 g/mL) et 2,0 mL de limonène (masse volumique = 0,84 g/mL) sont amenés à 10,0 mL avec du *n*-hexane, ensuite 1,0 mL de cette solution est dilué 20 fois par de l'hexane. C'est cette dernière solution de référence qui est utilisée pour l'analyse. Le chromatogramme est obtenu dans les conditions suivantes :

Phase stationnaire : colonne capillaire recouverte de polyéthylène glycol (0,2 μm) (L = 60 m, diamètre = 0,25 mm)

Phase mobile : He (1,5 mL.min⁻¹)

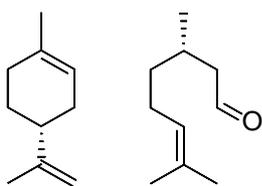
Volume injecté : 0,5 μL

Détecteur FID : 260°C

Température de l'injecteur : 260°C

Température de la colonne : 0-2 min : 80°C
2-26 min : 80°C \rightarrow 150°C
26-42 min : 150°C \rightarrow 185°C
42-49 min : 185°C \rightarrow 250°C

$t_0 = 5,5$ min



Limonène Citronellal

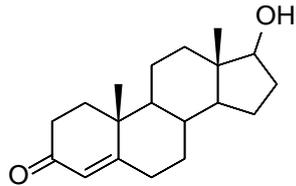
limonène : $t_r = 14,2$ min $\omega_{\text{à } 50\%} = 0,5$ min

citronellal : $t_r = 26,5$ min $\omega_{\text{à } 50\%} = 0,75$ min

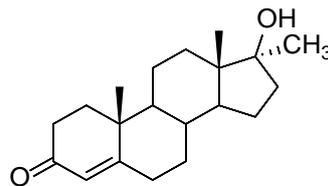
- Quelle est la masse de limonène injecté ?
- Quelle est la concentration (en mol.L⁻¹ et en ppm) en citronellal dans la solution de référence ?
- Calculez le volume mort, la sélectivité et la résolution du système.
- Quelle est l'efficacité de la colonne ?
- Quelle est la hauteur d'un plateau théorique ?

Exercice 2

La chromatographie gazeuse est utilisée pour doser la méthyltestostérone censée être contenue à raison de 25 mg par comprimé. Cinq comprimés sont pesés (0,7496 g), puis broyés. Une prise d'essai de 0,1713 g est prélevée et extraite par 50 mL d'éthanol contenant préalablement 0,043 % de testostérone. Une solution de référence contenant 0,04 % et 0,043 % de méthyltestostérone et de testostérone est également préparée dans de l'éthanol. L'analyse de la solution de référence donne la réponse suivante : $AUC_{TEST} = 216268$ et $AUC_{CH_3-TEST} = 212992$. La solution à analyser donne les valeurs suivantes : $AUC_{TEST} = 191146$ et $AUC_{CH_3-TEST} = 269243$. Quelle est la teneur en méthyltestostérone, exprimée en %, dans les comprimés ?



Testostérone



Méthyltestostérone

Exercice 3

Deux espèces chimiques, A et B sont séparées par chromatographie gazeuse isotherme, à l'aide d'une colonne de 2,00 m ayant 5000 plateaux théoriques au débit de 15,0 ml/min.

Le pic de l'air non absorbé apparaît au bout de 30 s ; le pic de A apparaît au bout de 5 min et celui de B au bout de 12 min.

- Calculez le volume mort V_M de la colonne, et les volumes de rétention V_A et V_B .
- Calculez les volumes réduits V'_A et V'_B .
- Calculez les coefficients de rétention k'_A et k'_B .
- Quelles sont les largeurs à la base des pics A et B ?
- Quelle est la valeur de H pour cette colonne ?
- Déterminez la valeur de la sélectivité α de cette séparation.
- Calculez la résolution R de la séparation.
- Commenter brièvement les valeurs de k' et de R.

Exercice 4

Un mélange de six iodures d'alkyle est séparé par chromatographie gazeuse à l'aide d'une colonne remplie de poudre de brique réfractaire enrobée d'huile de silicone (longueur $L = 365$ cm). La colonne est chauffée de telle sorte que sa température croisse linéairement durant toute l'opération. Le tableau donne les résultats relevés.

Pic	Identité	t_R (min)	ω (min)	Température (°C)	Surface (cm ²)
1	Air	$t_M = 0,5$	Petite	55	Petite
2	CH ₃ I	6,60	0,55	100	13,0
3	C ₂ H ₅ I	9,82	1,00	127	12,0
4	Iso-C ₃ H ₇ I	11,90	1,04	139	10,0
5	<i>n</i> -C ₃ H ₇ I	13,04	1,08	148	7,2
6	CH ₂ I ₂	19,10	1,60	193	2,0

(a) Calculez la résolution entre les pics 2-3, 3-4, 4-5, 5-6.

(b) La séparation est-elle convenable ?

(c) Quelle longueur de colonne aurait-il fallu pour que la résolution des pics 4 et 5 ait été de $R' = 1,5$?

Exercice 5

Le chromatogramme suivant a été obtenu pour un mélange de chaînes droites d'hydrocarbures : C_nH_{2n+2}. Le pic M est dû à un corps non absorbé ; le pic A est celui de C₃H₈ ; le pic F est celui de C₂₀H₄₂. La colonne mesure 120 cm de longueur et est utilisée à température constante avec un débit de gaz de 50,0 cm³/min. On trouve les données concernant les temps de rétention et la largeur des pics dans le tableau 12-2.

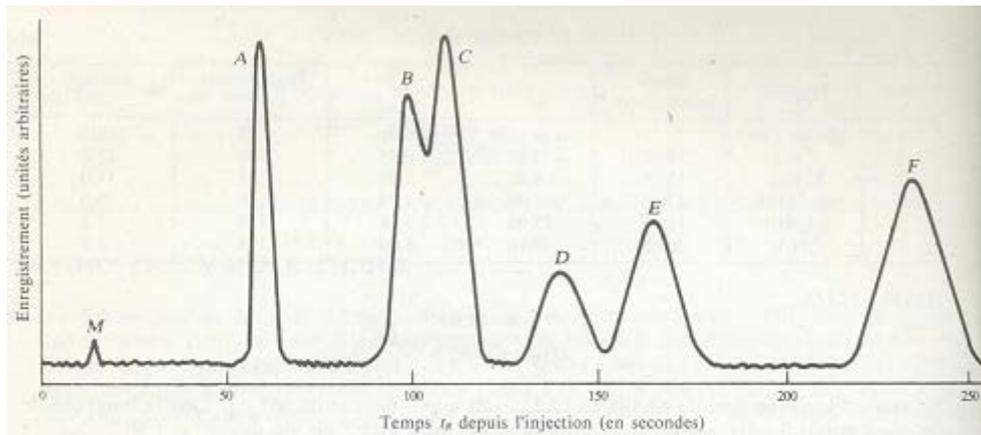


Fig. 12-2

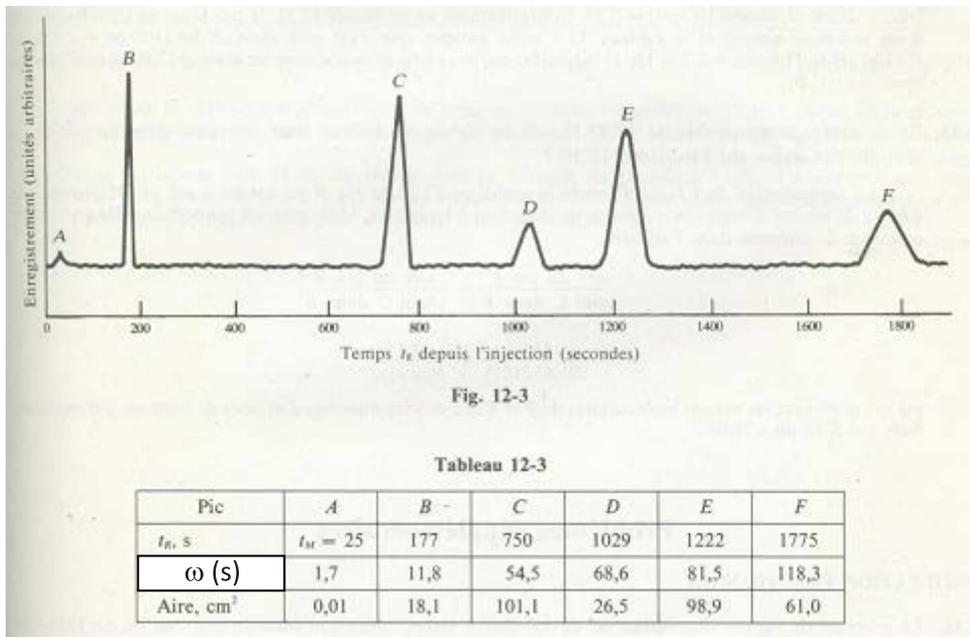
Tableau 12-2

Pic	M	A	B	C	D	E	F
t_R, s	15	60	100	110	140	165	235
$\omega (s)$	petit	9,00	15,00	16,50	21,00	24,75	35,25
Aire, cm^2	petit	0,900	1,200	1,650	0,610	1,040	1,900

- Trouvez le nombre de plateaux théoriques N_A en se basant sur le pic A.
- Calculez la résolution entre les pics B-C et D-E.
- Quelle longueur de colonne aurait-il fallu pour que la résolution des pics B et C ait été de $R' = 1,5$?
- En déduire la nouvelle résolution des pics D et E.
- Sachant que le temps de rétention est directement proportionnel à la longueur de colonne, déterminez le t_R de F sur une colonne de longueur déterminée au (c) et conclure.

Exercice 6

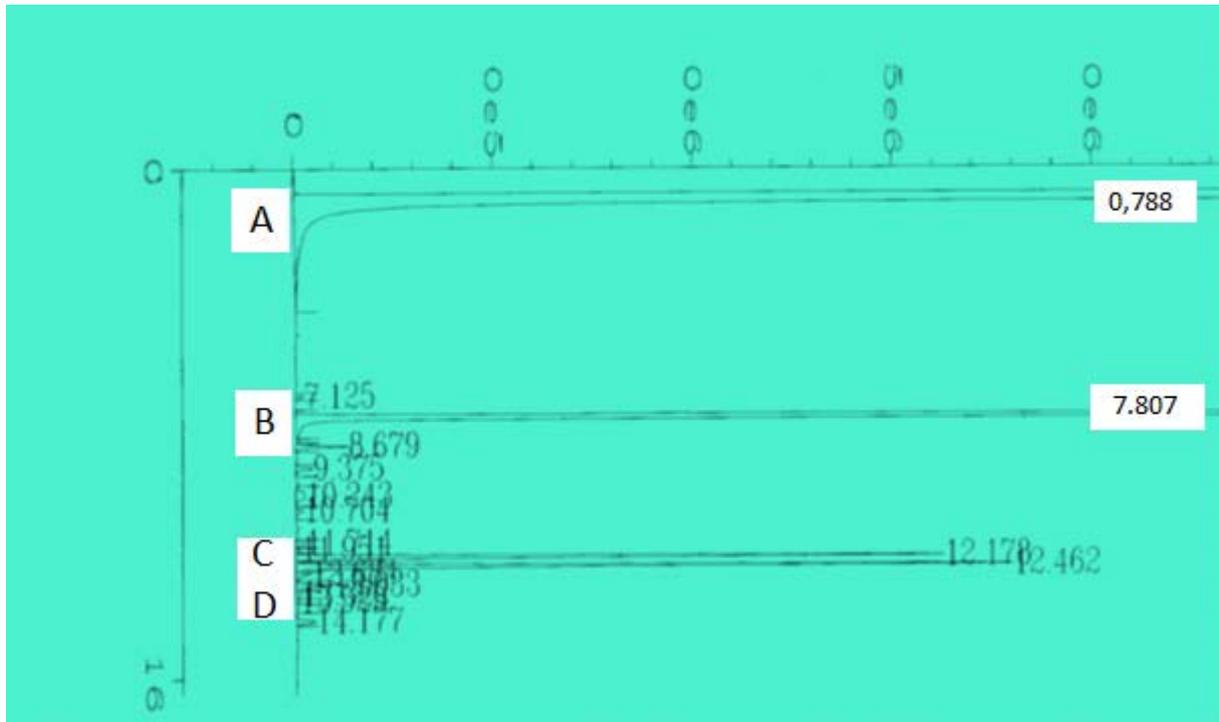
Un mélange de bromures d'alkyle est séparé par CPG. Les paramètres de la colonne sont : $L = 150$ cm, $T = 140^\circ\text{C}$, gaz vecteur He, débit = $20\text{ cm}^3/\text{min}$, détection FID. Le chromatogramme a été obtenu avec un mélange de composition inconnue, néanmoins, on sait que le pic F est dû à du $n\text{-C}_5\text{H}_{11}\text{Br}$. Le tableau résume les données pour les différents pics.



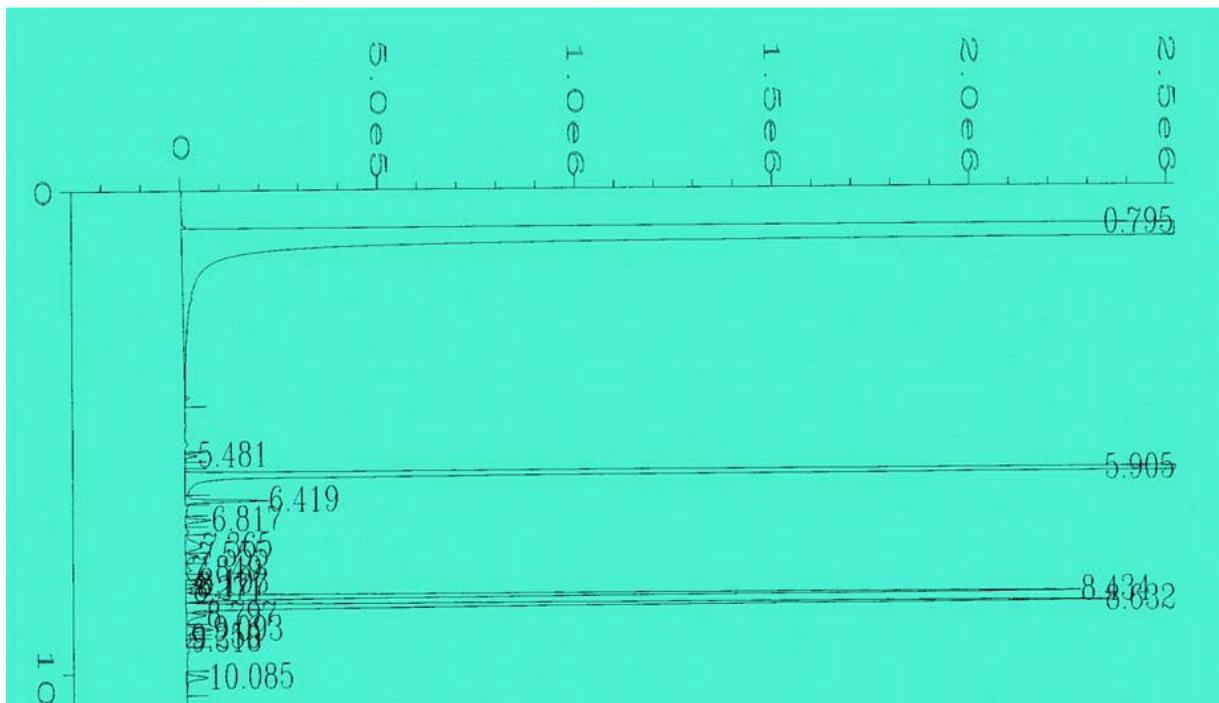
- Quelle peut être la longueur de la colonne minimale pour que les pics D et E puissent être résolus avec moins de 1% de recouvrement ?
- Déterminez le nombre de plateaux théoriques N , pour les pics B, C, D, E et F.
- Commentez la valeur de N_c .

Exercice 7

Le 2,5-dihydro-2,5-diméthoxy-2-furane carboxylate de méthyle est le produit d'électrolyse du 2-furoate de méthyle dans le méthanol. Dans le cadre d'une étude de cette réaction, on veut identifier les signaux chromatographiques correspondant à ces composés. Une solution contenant ces deux produits commerciaux est analysée par chromatographie en phase gazeuse, dans une colonne Carbowax (polyéthylèneglycol). Les chromatogrammes suivant correspondent à différents programmes de température.



$T_0 = 100\text{ }^\circ\text{C}/1\text{min}$; $8\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$; $T_1 = 200\text{ }^\circ\text{C}/3\text{min}$



$T_0 = 100\text{ }^\circ\text{C}/1\text{min}$; $15\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$; $T_1 = 200\text{ }^\circ\text{C}/3\text{min}$

