

Travaux dirigés : Techniques de fractionnement et de purification

Exercice 1 :

Indiquer en regard de chacune de ces techniques chromatographiques, le terme qui représente le mode essentiel de fixation sur la phase.

- | | |
|----------------------------|---------------------------|
| 1. phase inversée | a. masse moléculaire |
| 2. perméation de gel | b. hydrophilie |
| 3. chromatographie ionique | c. hydrophobie |
| 4. phase normale | d. protonation/ionisation |

Exercice 2 :

Un mélange de deux composés A et B conduit après migration à deux taches aux caractéristiques suivantes (distance de migration x et diamètre du spot w) :

$$- x_A = 27 \text{ mm } w_A = 2 \text{ mm}$$

$$- x_B = 33 \text{ mm } w_B = 2,5 \text{ mm}$$

La migration du front de solvant dans cette expérience est de 60 mm.

- Calculer R_f , l'efficacité N et HEPT (H) pour chacun des composés.
- Calculer le facteur de résolution entre les deux composés A et B.
- Établir la relation entre le facteur de sélectivité et le R_f des deux composés. Calculer sa valeur numérique.

Exercice 3 :

Quel est l'ordre d'élution des acides suivants en HPLC avec une colonne dont la phase stationnaire est de type C18 et une phase mobile un tampon formiate $C = 200 \text{ mM}$, de pH 9 ?



Exercice 4 :

Un mélange de trois acides aminés : Asp ($pH_i = 2,87$), Arg ($pH_i = 10,76$) et Leu ($pH_i = 6$), est soumis à une chromatographie sur colonne échangeuse de cations. L'élution est effectuée à l'aide d'un tampon à $pH = 6$.

Dans quel ordre peut-on prévoir la sortie de ces acides aminés ?

Exercice 5 :

Les 5 protéines dont les masses moléculaires et les points isoélectriques sont donnés ci-dessous, sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (une des techniques de séparation très utilisée) en présence de SDS.

1- Donner l'ordre de leur migration du sommet (le point de dépôt des échantillons) à la partie inférieure du gel.

a: alpha-Antitrypsine (PM: 45000, pI : 5,4),

b: Cytochrom c (PM: 13400, pI : 10,6),

c: Myoglobine (PM: 17000, pI : 7,0),

d: Albumine sérique (PM: 69000, pI : 4,8),

e: Transferrine (PM: 90000, pI : 5,9).

2- Si les 5 protéines de la question 1 sont séparées par isoélectrofocalisation, quelle pourrait être leur distribution entre les extrémités positive (anode,+) et négative (cathode, -) du gel ? Donner les valeurs les plus hautes et les plus faibles de pH .

Exercice 6 :

On veut déterminer la concentration (mol/L) de deux sels A ($Co(NO_3)_2$) et B ($Cr(NO_3)_3$) dans un échantillon inconnu en solution aqueuse. On enregistre un spectre dans le visible de chacun de ces deux composés pris isolément en solution aqueuse ainsi que de la solution échantillon à analyser. Le trajet optique des cuves utilisées est 1 cm.

Les valeurs des absorbances mesurées à 510 et 575 nm sur les trois spectres sont les suivantes : le composé A ($1,5 \times 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) présente une absorbance de 0,714 à 510 nm et de 0,0097 à 575 nm. Le composé B ($6 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) présente une absorbance de 0,298 à 510 nm et de 0,757 à 575 nm. La solution à doser présente une absorbance de 0,40 à 510 nm et de 0,577 à 575 nm.

1- Calculer les 4 coefficients d'absorption molaire $\epsilon_A(510)$, $\epsilon_B(510)$, $\epsilon_A(575)$ et $\epsilon_B(575)$.

2- Calculer les concentrations molaires ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) des deux sels A et B dans la solution échantillon.