

Compléments à l'article « Mise au point d'une optimisation de séparation en CLHP. Séparation de cinq bases nucléiques : adénine, thymine, uracile, cytosine et guanine », de Xavier Bataille et Caroline Bazot (*L'Act. Chim.*, 2007, 314, p. 30).



DR : Xavier Bataille.

Annexe I - Matériel utilisé

La pompe est une GYNKOTEK-POMP série P-580 ALPG équipée d'une boucle d'injection Rhéodyne de 20 μ L. Le détecteur est un GYNKOTEK UVD 340-S à barrette de diodes 200-595 nm.

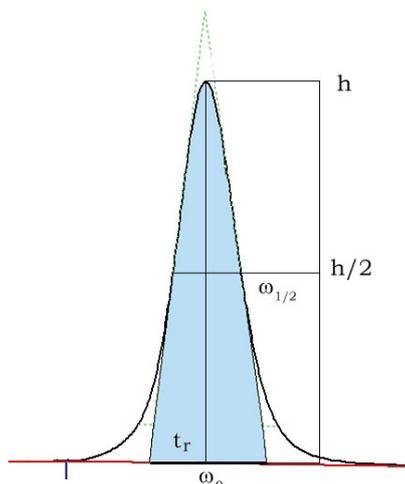
Colonnes :

Type de colonne	Chaîne alkyle	Longueur (mm)	Diamètre de colonne (mm)	Diamètres de particules (μ m)
YMC ODS AQ	C ₁₈	125	4,6	5
Wakosil C18	C ₁₈	250	4	3
Wakosil C18	C ₁₈	100	4	3
Nucléosil C8	C ₈	250	4,6	5
Kromasil C8	C ₈	150	4,6	5

Annexe II - Définition de critères d'optimisation en CLHP

Le **nombre de plateaux théoriques** est défini par : $N_{th} = 16 \left(\frac{t_r}{\omega_0} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_r}{\omega_{1/2}} \right)^2$,

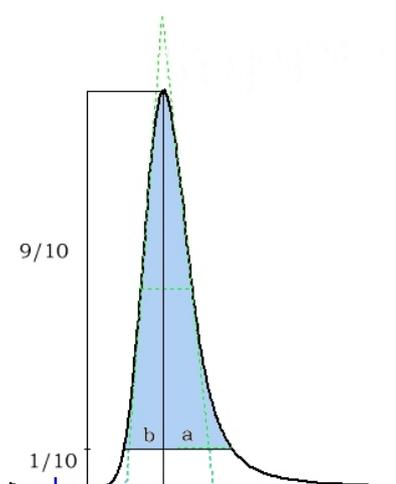
où t_r est le temps de rétention, ω_0 la largeur à la base du pic, $\omega_{1/2}$ la largeur du pic à mi-hauteur :



La **résolution** est définie par : $R = 2 \frac{t_{r_A} - t_{r_B}}{\omega_{0_A} + \omega_{0_B}}$,

où t_{r_i} est le temps de rétention du constituant i , et ω_{0_i} la largeur à la base du pic.

Le **facteur d'asymétrie**, A_s , est défini comme le rapport a/b pour le graphe ci-dessous :



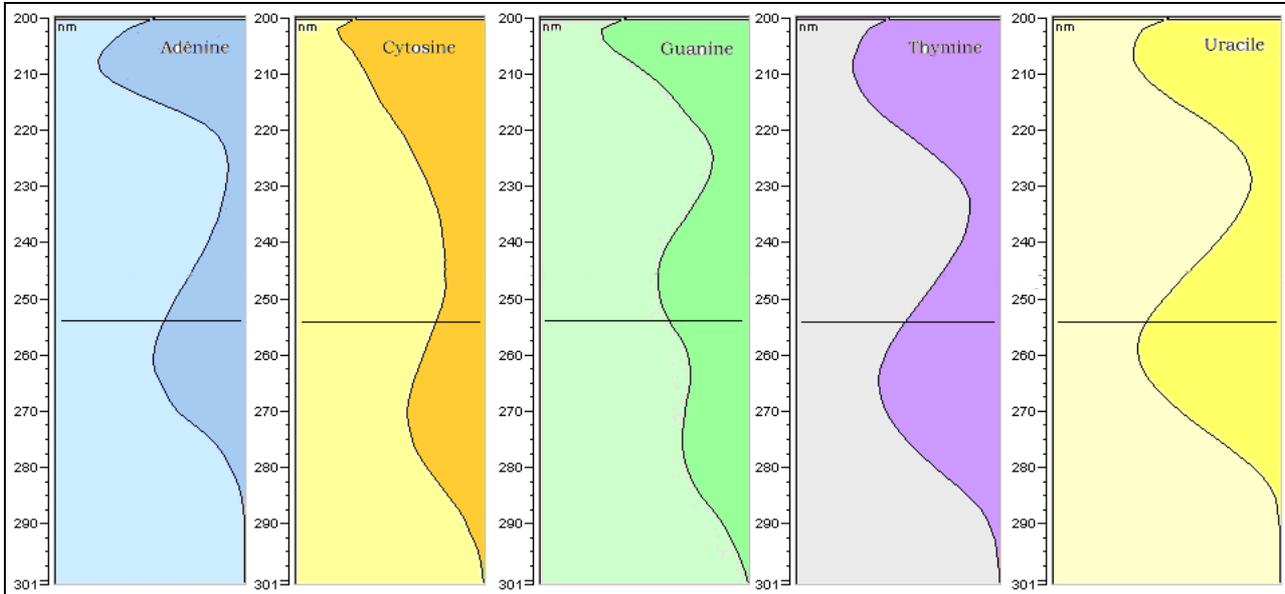
Annexe III - Produits utilisés

Produits de chez Sigma.

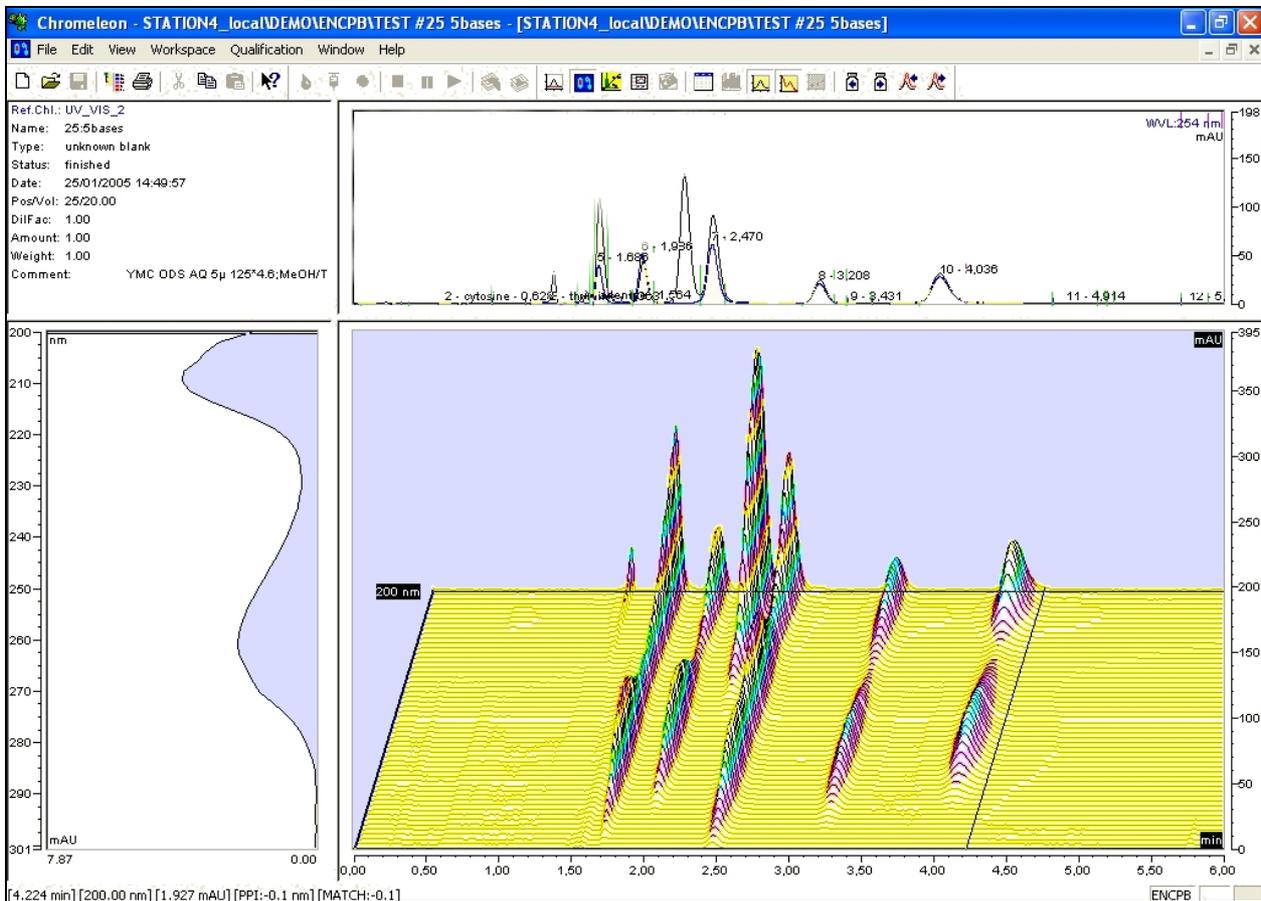
Solution	Composition	Concentration
Tampon à pH = 3,5	Acide acétique – acétate d'ammonium	20 mmol.L ⁻¹
Tampon à pH = 4,8	Acide acétique – acétate d'ammonium	20 mmol.L ⁻¹
Tampon à pH = 5,8	Acide acétique – acétate d'ammonium	20 mmol.L ⁻¹
Adénine	Adénine dissoute dans la solution tampon	10 µmol.L ⁻¹
Cytosine	Cytosine dissoute dans la solution tampon	10 µmol.L ⁻¹
Guanine	Guanine dissoute dans la solution tampon ; dissolution aidée par ajout d'acide chlorhydrique	10 µmol.L ⁻¹
Thymine	Thymine dissoute dans la solution tampon	10 µmol.L ⁻¹
Uracile	Uracile dissout dans la solution tampon	10 µmol.L ⁻¹

Annexe IV - Spectres ayant permis le choix de la longueur d'onde de travail

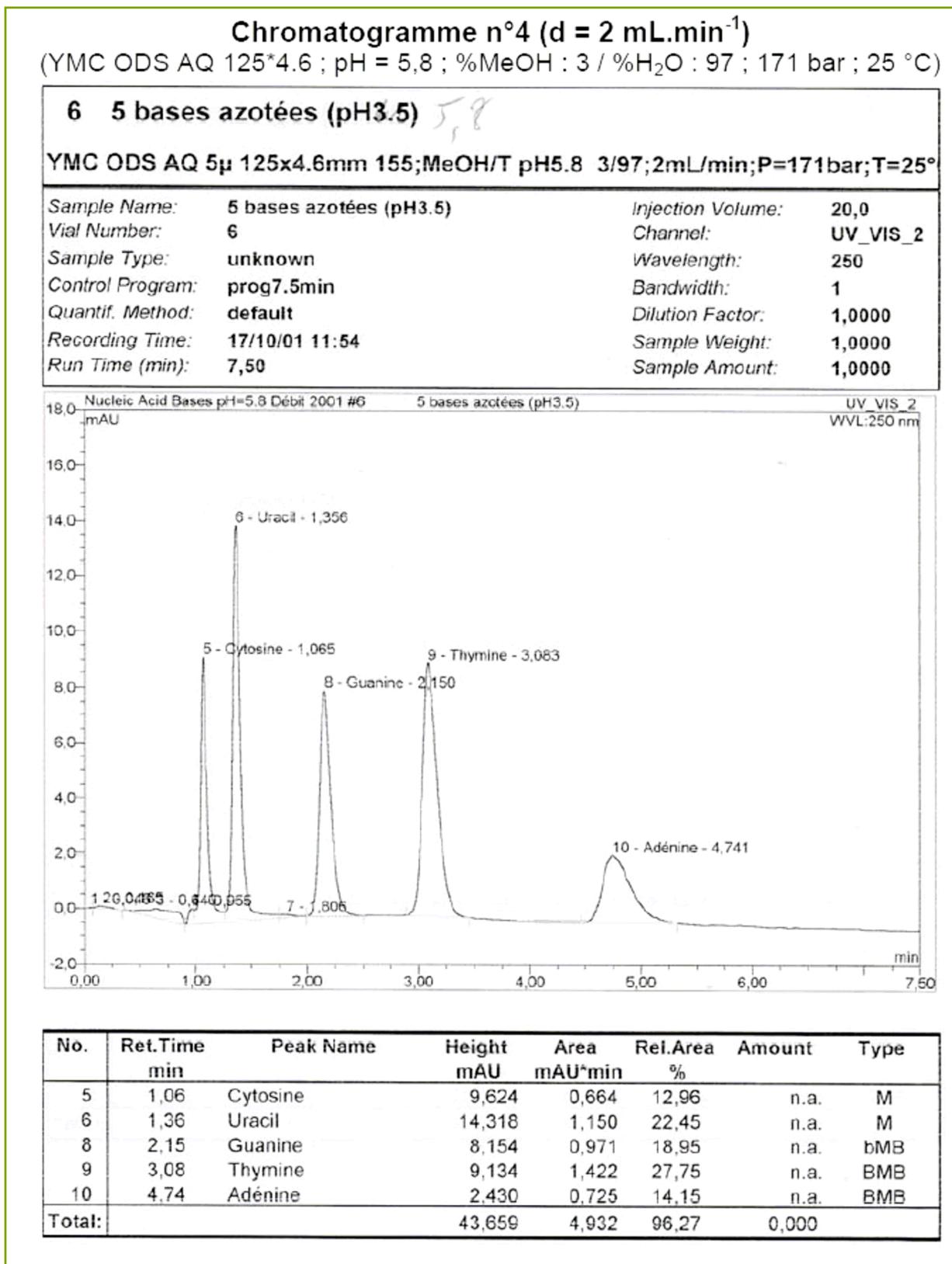
Spectres UV des bases azotées.



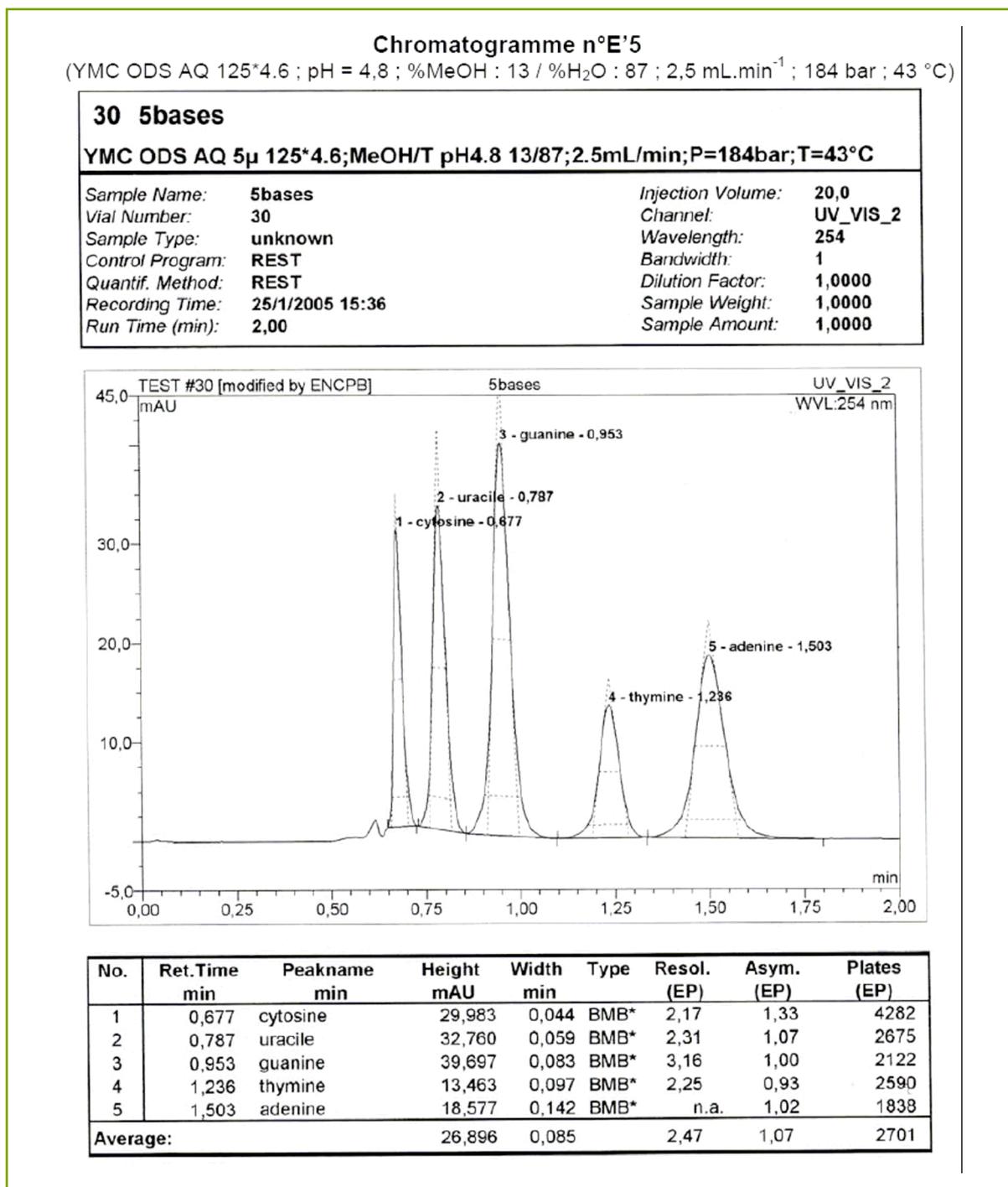
Chromatogramme sur détecteur à barrette de diodes.



Annexe V - Chromatogramme en complément à la figure 4 (influence du débit).



Annexe VI - Chromatogramme n° E'5 en complément à la figure 10 (bilan).



Annexe VII - Préparation des mélanges (partie quantitative)

m mg de chaque base est dissout individuellement dans une fiole de 20 mL. Un volume V de chaque base nucléique est ensuite placé dans une fiole de 20 mL.

Bases	m (mg)	Mélange 1 V (mL)	C ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Mélange 2 V (mL)	C ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
C	13,1	20	655	40	1310
G	13,6	26	884	52	1768
T	12,6	20	630	20	630
A	12,6	20	630	20	630