

«Simulateur de chromatogrammes avec effet de solvant»

Dr Thierry BRIERE - Professeur Agrégé

Département de Chimie - Université de La Réunion

Faculté des sciences et des technologies

15 avenue René Cassin - 97715 -St Denis messagerie- cedex 9

briere@univ-reunion.fr

www2.univ-reunion.fr/~briere

Résumé :

Dans un article précédent (1) nous avons décrit en détail la réalisation d'un simulateur de chromatogrammes, permettant de visualiser les effets des des principaux facteurs chromatographiques (longueur et diamètre interne de la colonne, porosité, taille des particules, facteur de rétention, sélectivité, et débit).

Nous proposons ici une suite tenant compte des effets importants de la composition de l'éluant utilisé, des chromatogrammes avec des éluants différents pourront être simulés et on pourra se rendre compte de l'influence de la teneur en solvant organique sur la séparation.(facteurs et temps de rétention, sélectivité et résolution) On pourra ainsi simuler l'optimisation d'une séparation chromatographique en mode isocratique, c'est a dire en gardant la composition de l'éluant constante pendant toute la durée de l'analyse. Dans un prochain article, nous étudierons la simulation des gradients de solvant, en faisant varier la composition de l'éluant en cours d'analyse.

I. Notions préalables :

Nous nous intéresserons plus particulièrement à la forme de chromatographie, la plus largement utilisée actuellement, la chromatographie liquide haute performance (C.L.H.P)

Dans ce type de chromatographie, l'équilibre utilisé pour la séparation des composés est un équilibre mixte faisant intervenir adsorption et partage.

I-1 : Equilibre de partage :

Un soluté soluble dans deux solvants non miscibles entre eux va se partager entre les deux phases à sa disposition. Il va donc s'établir un équilibre de partage entre les deux phases en présence. Cet équilibre est caractérisé par une constante d'équilibre et obéit à toutes les lois classiques de la thermodynamique. C'est ce type d'équilibre qui est mis en jeu dans les techniques habituelles d'extraction liquide liquide en ampoule à décanter. Généralement, un des solvant utilisé est l'eau et le deuxième est un solvant organique non miscible à l'eau (éther, dichlorométhane, cyclohexane...) L'équilibre de partage s'écrit : $S(aq) = S(org)$ avec $K = C_{org} / C_{aq}$ et C_{aq} et C_{org} sont les molarités respectives du soluté S dans la phase aqueuse et dans la phase organique.

I-2 : Application à la chromatographie

Pour qu'un tel équilibre puisse être utilisé en chromatographie, on imbibe la phase stationnaire qui est un solide poreux par un des deux solvants, et le deuxième solvant est utilisé comme phase mobile. Le soluté dissous initialement dans la phase mobile va lors

de la traversée de la colonne subir une suite d'équilibres d'adsorption et de désorption entre phase mobile et phase stationnaire, un soluté présentant une grande affinité avec l'éluant progressera très vite et aura donc un temps de rétention très court, inversement, un soluté ayant une grande affinité avec le solvant imbibant la phase stationnaire sera fortement retardé et aura donc un temps de rétention important. Cette méthode simple présente l'inconvénient majeur que le solvant imbibant la phase stationnaire aura tendance à la longue à être lui même entraîné par le flux de l'éluant (phénomène de lessivage), la colonne perdra donc petit à petit toute son efficacité. Pour remédier à ce problème, on utilise des phases stationnaires de silice sur lesquelles on a greffé chimiquement des chaînes organiques. Ces chaînes greffées vont se comporter comme un film de liquide mais étant fixées à la phase stationnaire par de "vraies" liaisons chimiques covalentes le phénomène de lessivage ne se produira plus, la colonne pourra être utilisée à de multiples reprises sans perdre de son efficacité. Le soluté pourra donc se dissoudre en partie dans la phase stationnaire et l'équilibre de partage s'établir. La réalité est néanmoins plus complexe, le phénomène d'adsorption sur la surface de la silice intervient également, il s'agit donc d'équilibres mixtes adsorption/partage. On distingue deux types différents selon la polarité de la phase stationnaire et celle de la phase mobile :

I-3 : Chromatographie en phase normale :

La phase stationnaire est très polaire et la phase mobile apolaire, les substances sont alors élués dans l'ordre inverse de leurs polarités propres. Les composants peu polaires ont une plus grande affinité pour la phase mobile et sont donc élués rapidement. Inversement les solutés polaires ont une plus grande affinité pour la phase stationnaire et sont élués lentement.

Principaux greffons utilisés en phase normale :

Il s'agit de greffons comportant des fonctions de nature polaire :
Amine NH_2 ; Nitrile : CN ; Diols : $\text{CH}_2 - \text{CHOH} - \text{CH}_2\text{OH}$

I-4 : Chromatographie en phase inverse :

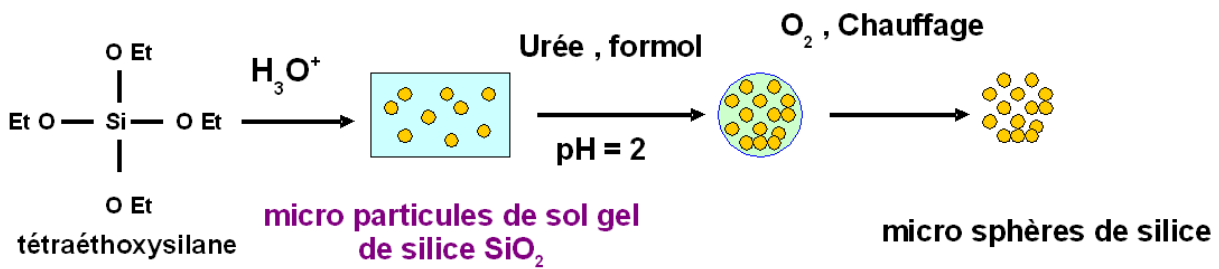
La phase stationnaire est peu polaire et la phase mobile très polaire, les substances sont alors élués dans l'ordre de leurs polarités propres. Les composants polaires ont une plus grande affinité pour la phase mobile et sont donc élués rapidement. Inversement les solutés peu polaires ont une plus grande affinité pour la phase stationnaire et sont élués lentement.

Principaux greffons utilisés en phase inverse :

Il s'agit de greffons comportant des fonctions de nature apolaire :
 C_2 : Diméthylsilylile ; C_8 : Octylsilylile ; C_{18} : Octadécylsilylile ; phénylsilylile

I-5 Obtention des silices greffées :

Le gel de silice est constitué de micro sphères de diamètre sensiblement constant pouvant varier de 2 à 5 μm . Le diamètre doit être le même pour toutes les particules si on veut éviter la création de chemins préférentiels. Ces micro sphères sont obtenues par agglutination en présence d'un liant organique urée/formol de microparticules (appelées sol-gel) elles mêmes obtenues par polymérisation puis hydrolyse contrôlée du tétraéthoxysilane. (voir schéma). Le traitement final est une pyrolyse qui conduit au micro sphères de silice qui seront utilisées pour le garnissage des colonnes.



Une vue agrandie d'une micro sphère ressemblerait à la figure suivante ou l'on voit que ces sphères ne sont en réalité pas homogènes et régulières et qu'il existe des lacunes appelées pores.

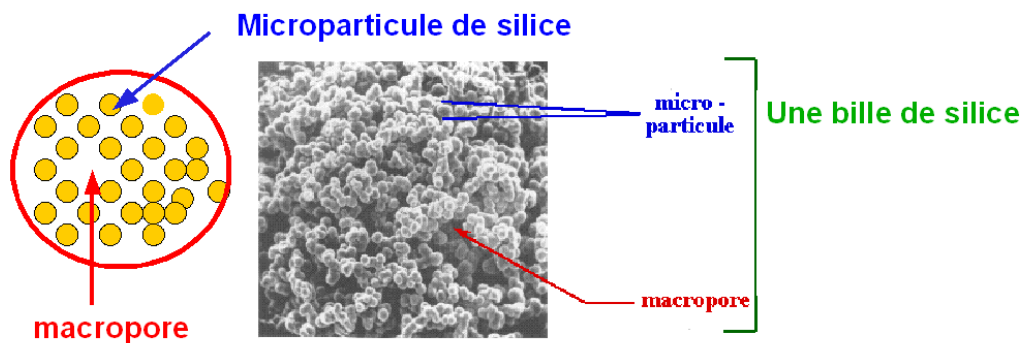
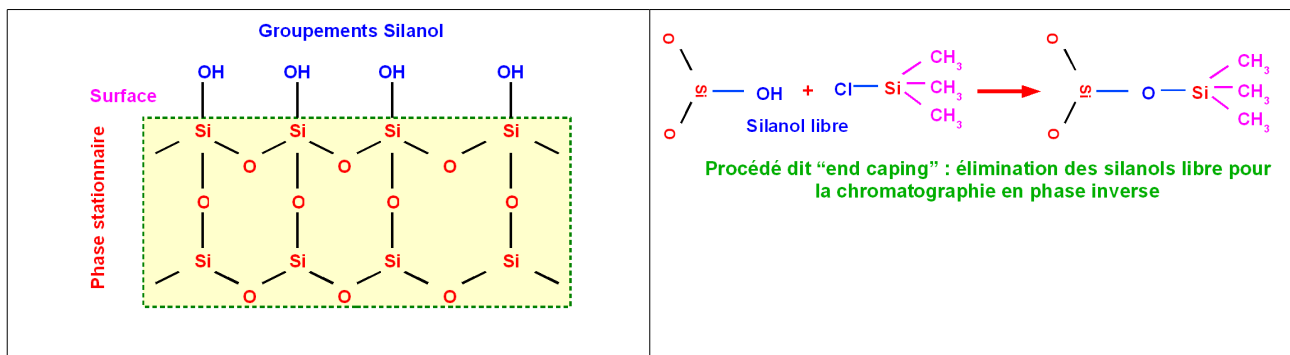


Schéma et photographie d'une bille de silice montrant sa porosité

Ces pores jouent un grand rôle car elles constituent des zones d'adsorption préférentielles. La surface des micro sphères de silice comporte des groupements silanol : $\text{Si} - \text{OH}$ qui sont essentiels au phénomènes d'adsorption en particulier parce qu'il permettent la formation de liaisons hydrogène (chimiesorbtion) et sont responsables de la polarité et de l'acidité de la silice. Les groupements silanols libres sont des sites préférentiels d'adsorption, s'ils sont trop nombreux ils entraînent de trop importantes adsorptions et leur nombre doit être soigneusement contrôlé. Pour de nombreuses application on préfère désactiver une partie de ces sites par hydratation, l'eau est alors prioritairement adsorbée. En chromatographie en phase inverse, ils sont particulièrement gênants, on doit donc les éliminer au maximum. On utilise un procédé nommé "end capping" qui consiste a retraiter la phase greffée par un silane porteur de groupements méthyle. Une grande partie des groupements silanols libres est alors éliminée.



La qualité d'un gel dépend de plusieurs paramètres : taille des grains, porosité ouverte

(dimensions et répartition des pores), résistance à l'écrasement, surface spécifique...
 Les gels courants pour C.L.H.P ont les caractéristiques suivantes : diamètre de 2 à 5 μm ,
 résistance à l'écrasement sous 1000 bars, surface spécifique 350 m^2/g , porosité 0,7 mL/g ,
 taille des pores 10 nm.

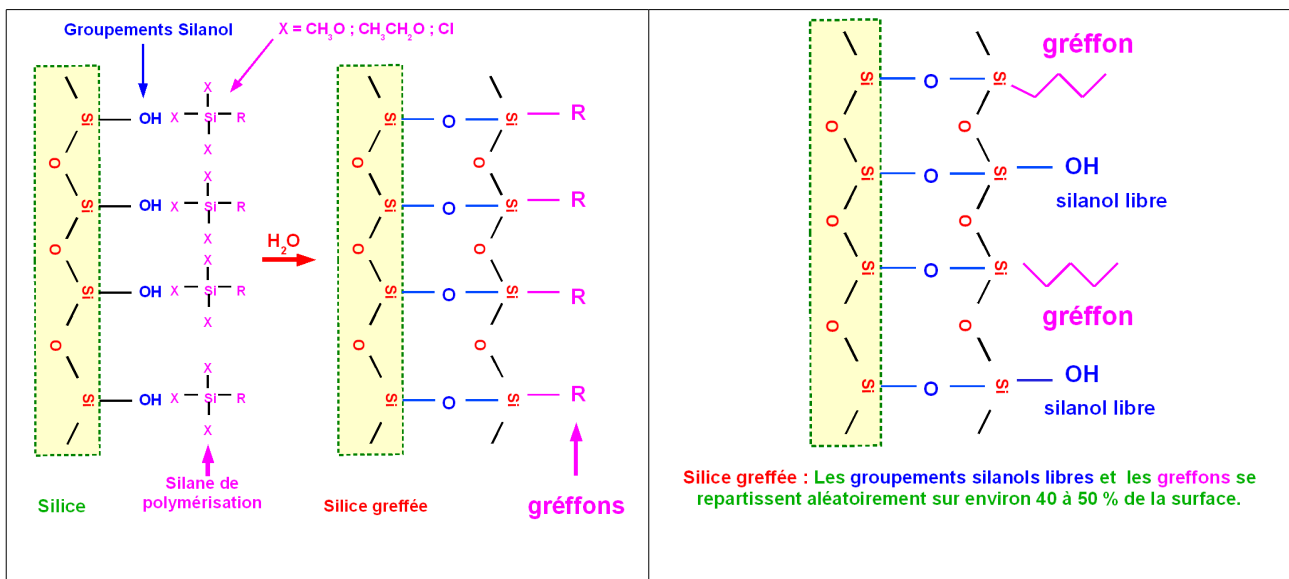
La préparation de ces silices greffées se fait par réaction entre les groupements silanol de surface et un composé portant la fonction qu'on désire greffer à la surface de la silice. On utilise généralement un composé de type méthylchlorosilane ClSiMe_2R ou méthyldichlorosilane Cl_2SiMeR .

Le groupement R représente la fonction greffée : $\text{R} = \text{NH}_2, \text{CN}, \text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}, \text{CH}_3, \text{C}_8\text{H}_{17}, \text{C}_{18}\text{H}_{37}, \text{C}_6\text{H}_5$ etc

Le processus réactionnel est en fait très complexe et nous n'allons pas ici le décrire précisément mais en donner une idée globale simplifiée. Il se produit des réactions de polymérisation plus ou moins importantes qui vont conduire à une structure externe complexe, dans laquelle les groupes silanols initiaux seront en partie reliés entre eux...
 (Voir les figures)

La réaction se produit en surface des grains de silice, le greffage n'est que partiel et se répartit aléatoirement sur toute la surface.

On peut finalement atteindre de l'ordre de 5% en masse de carbone dans la silice finale après greffage, cela représente un greffage de l'ordre de 40 à 50% de la surface totale.

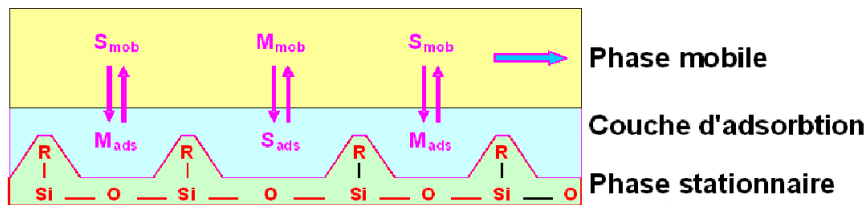


I-6 : Mécanisme de partage liquide/liquide :

Les phases greffées ne sont pas de véritables liquides puisqu'elles sont constituées d'un film liquide de très faible épaisseur (monocouche moléculaire).

Le partage entre phase fixe et phase mobile fait donc intervenir l'adsorption des solutés et du solvant organique sur la couche mono moléculaire du greffon.

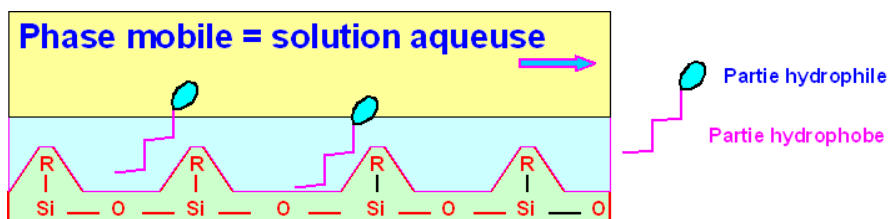
Rappelons que la phase mobile est constituée d'un solvant organique (méthanol ou acétonitrile) et d'eau. Le solvant organique moins polaire a une affinité avec la phase greffée elle-même apolaire. Les solutés qu'on cherche à séparer sont eux-mêmes apolaires et présentent donc une affinité importante avec le greffon apolaire. Le solvant organique M et les solutés S vont donc pouvoir être adsorbés à la surface de la phase stationnaire. Il va s'établir ensuite un équilibre de partage entre les composés adsorbés et les composés restés libres dans la phase mobile.



Il s'établit ainsi une suite d'équilibres successifs entre couche d'adsorption et phase mobile. Les solutés les plus polaires ayant une plus grande affinité pour la phase mobile vont être élués plus rapidement que les moins polaires ayant une plus grande affinité pour la phase stationnaire. Ce mécanisme va être complété par le jeu des interactions entre les solutés et la phase mobile.

Interactions hydrophobes :

Les solutés présentent généralement une extrémité hydrophile et une autre hydrophobe et vont donc s'orienter en présentant leur partie hydrophobe vers la phase stationnaire et leur partie hydrophile vers la phase mobile. C'est en fait la répulsion entre la partie hydrophobe de la molécule de soluté et la phase mobile aqueuse qui oblige le soluté à pénétrer plus ou moins profondément dans la couche d'adsorption ce qui va augmenter son temps de rétention. La géométrie de cette partie hydrophobe joue aussi un rôle important, plus la surface hydrophobe est grande et plus le temps de rétention sera élevé.



La composition de l'éluant et en particulier sa tension superficielle joue aussi un grand rôle, plus la tension superficielle sera forte et plus le temps de rétention sera long. L'eau est de tout les solvants celui qui présente la plus forte tension superficielle, aussi, plus la teneur en eau sera importante et plus les composés seront retenus par la phase stationnaire. On pourra donc jouer sur les séparations en modifiant la teneur en eau une forte proportion en solvant organique diminuera le temps d'analyse mais cela au dépend de la résolution.

I-7 Influence de la teneur en solvant organique dans la phase mobile :

On fait varier la polarité et la tension superficielle de la phase mobile en faisant varier sa teneur en solvant organique. Cela joue à la fois sur les temps de rétention et sur les facteurs de rétention k et modifie donc la qualité de la séparation.

On observe souvent une corrélation linéaire entre les logarithmes des facteurs de rétention et le logarithme de la teneur en solvant organique.

$$\log k = a \log x + b$$

x est la teneur en solvant organique exprimée en fraction volumique, par exemple, $x = 0,5$ pour 50% en volume de solvant organique dans l'éluant.

Cette relation est appelée équation d'Everett et peut être déduite d'une étude théorique des équilibres d'adsorption.

Polarité relative des principales fonctions organiques :

Aussi bien en chromatographie d'adsorption qu'en chromatographie de partage la polarité joue le plus grand rôle, il est donc important de savoir classer les diverses fonctions organiques par ordre de polarité, ce qui permettra de prévoir leur ordre d'éluion relatif.

L'ordre relatif croissant des polarités des principales fonctions est le suivant :



Pour les groupes alkyle (interactions hydrophobes) c'est la longueur de chaîne ou la surface pour les cycles qui fixe la polarité et l'hydrophobicité, plus les chaînes ou les surfaces seront importantes et plus la polarité sera faible et l'hydrophobicité élevée. Quand un composé comporte plusieurs fonctions, c'est la fonction la plus polaire qu'il faut considérer.

La double liaison C = C est très polaire.

II : Réalisation de la simulation :

Nous utiliserons comme base de départ le simulateur de chromatogrammes dont la conception était décrite dans l'article précédent.(1) Il suffit de modifier légèrement la feuille de calcul pour réaliser un nouveau simulateur tenant compte de la composition de l'éluant et permettant de faire varier la teneur organique de celui-ci.

Les deux curseurs de réglages de K_2 et α de l'ancien simulateur seront éliminés et remplacés par le curseur de réglage de la teneur en solvant organique x.

Les facteurs de rétention k_1 et k_2 des deux composés seront évalués en utilisant la relation d'Everett $\log k = a \log x + b$, on fixera les valeurs de a et b pour les deux composés et on pourra donc calculer k_1 et k_2 pour une teneur quelconque en solvant organique.

On prévoira donc les curseurs de réglages correspondants pour a_1, b_1, a_2 et b_2 .

Les plages de variation des paramètres a et b sont les suivantes pour des composés ordinaires et des phases stationnaires habituelles (CN; Diol, C18) et solvant eau/méthanol ou eau/acétonitrile: **$-3 < a < -0,5$ et $-1,5 < b < 0$**

Voici à titre d'exemple les valeurs de a et b pour une colonne CN et un éluant eau/méthanol d'après T.J. Janjic (2).

Composé	pente	ordonnée	Composé	pente	ordonnée
n-propylbenzene	-2,6214	-0,8251	Alcool benzylique	-1,4021	-0,7769
1,2 dichlorobenzene	-2,5139	-0,778	Benzaldéhyde	-1,3789	-0,705
Naphtalène	-2,3625	-0,6686	Benzamide	-1,1072	-0,7365
Bromobenzene	-2,3059	-0,7509	2-Hexanone	-0,9733	-0,5465
Chlorobenzene	-2,253	-0,7682	Acetophenone	-1,4607	-0,6556
2-chlorophénol	-1,9419	-0,8542	Acétanilide	-1,4124	-0,739
p-crésol	-1,8689	-0,858	Phénol	-1,6162	-0,8152
Nitrobenzene	-1,7947	-0,6251	Benzonitrile	-1,539	-0,647
Anisole	-1,7348	-0,6574	2-phenyléthanol	-1,617	-0,788
Alcool benzylique	-1,4021	-0,7769	Benzaldéhyde	-1,3789	-0,705
Benzamide	-1,1072	-0,7365	2-Hexanone	-0,9733	-0,5465

Toujours à titre d'exemple, pour un éluant eau/acétonitrile et une colonne C18, pour les quatre principaux composés aromatiques de la vanille, une détermination expérimentale qui sera l'objet d'un prochain article donne les résultats moyens suivants :

Composé	pente	ordonnée
Acide P.H.B	-1,98	-1,3
Acide vanillique	-2,02	-1,24
Aldéhyde P.H.B	-1,60	-0,72
Vanilline	-1,85	-0,79

Il suffira ensuite de modifier les formules de calcul des paramètres caractéristiques des pics des deux composés, selon le modèle suivant :

Caractéristiques du pic du Composé A :

Facteur de rétention : $k_{retA} = 10^{(aA \cdot \log(x_{org}/100) + bA)}$

Constante de partition : $K_{eqA} = k_{retA} \cdot V_{mort} / V_{stat}$

Volume d'élution en mL : $V_{RA} = V_{mort} + K_{eqA} \cdot V_{stat}$

temps de rétention en min : $t_{RA} = V_{RA} / \text{débit}$

Ecart type du pic : $\sigma_A = t_{RA} / N_{reel}$

Temps de rétention réduit : $t_{RAred} = t_{RA} - t_{mort}$

Efficacité réelle : $N_{effA} = t_{RAred}^2 / \sigma_A^2$

Pour le tracé du chromatogramme, il est intéressant de prévoir deux graphiques différents en effet on pourra observer en faisant varier la composition du solvant une inversion de l'ordre de rétention des deux composés. On fera donc un graphique faisant apparaître les deux pics individuels et un graphique chromatogramme qui sera la somme des deux pics individuels, on se rendra alors compte visuellement du phénomène d'inversion des deux pics.

Le calcul des pics individuels se fera par :

$$1/\sigma \cdot \text{EXP}(-((t_R - t)^2)/2/\sigma^2).$$

Pour obtenir un joli chromatogramme on fera le tracé avec 100 points.

Pour fixer le temps d'arrêt de l'analyse on choisira le temps de rétention du composé le plus retenu augmenté de 30%. On devra donc utiliser la fonction maximum.

$$t_{arr\hat{e}t} = 1,3 \cdot \text{MAX}(t_{R1}; t_{R2})$$

Le temps variera de $t=0$ à $t = t_{arr\hat{e}t}$ avec un pas de variation de $\text{Pas} = t_{arr\hat{e}t}/100$.

On procédera ainsi pour les deux pics individuels puis on fera la somme des deux pics pour obtenir le chromatogramme.

Il faudra également recalculer la sélectivité α de la séparation.

Par définition : $\alpha = k_2/k_1$

avec k_2 = facteur de rétention du composé le plus retenu et k_1 = facteur de rétention du composé le moins retenu.

En raison de l'inversion possible des deux pics on utilisera la fonction SI

SI (test logique; valeur si vrai; valeur si faux)

On posera $\alpha = \text{SI}(k_{ret1} > k_{ret2} ; k_{ret1}/k_{ret2} ; k_{ret2}/k_{ret1})$

On pourra ensuite modifier les calculs de la résolution, toujours en raison de la possible inversion des deux pics on devra utiliser la valeur absolue pour éviter d'obtenir une résolution négative pour R"vraie" et R"approx1", et la fonction MAX pour R"approx2" et R"Purnell" . :

$$R_{\text{vraie}} = \text{ABS}(1/2 \cdot (t_{R1} - t_{R2}) / (\sigma_1 + \sigma_2))$$

$$R_{\text{approx1}} = \text{ABS}(1/2 \cdot N_{vrai}^{0,5} \cdot (t_{R1} - t_{R2}) / (t_{R1} + t_{R2}))$$

$$R_{\text{approx2}} = 1/4 \cdot \text{MAX}(N_{eff1}; N_{eff2})^{0,5} \cdot (\alpha - 1) / \alpha$$

$$R_{\text{Purnell}} = 1/4 \cdot N_{vrai}^{0,5} \cdot (\alpha - 1 / \alpha) \cdot (\text{MAX}(k_{ret1}; k_{ret2}) / (1 + \text{MAX}(k_{ret1}; k_{ret2})))$$

Dans la pratique nous supposons dès le départ que l'efficacité de la colonne est identique

pour tous les composés, la résolution vraie et celle calculées par l'approximation sont donc identiques. L'expression de l'approximation : $R = 1/2 * N_{\text{vrai}}^{0.5} * (t_{R1} - t_{R2}) / (t_{R1} + t_{R2})$ étant plus pratique c'est celle que nous utiliserons par la suite.

La feuille de calcul ainsi réalisée permet de rendre compte aisément de l'effet de la composition de l'éluant et permet facilement de modéliser l'optimisation d'une séparation.

Une première approche "ludique" consiste à faire simplement varier la teneur en solvant pour visualiser en direct l'évolution du chromatogramme, à cet égard l'utilisation d'un tableur avec des barres de défilement permettant la variation rapide est très spectaculaire.

Cette première feuille de calcul EXCEL nommée "simulsolv1" sera téléchargeable à l'adresse <http://www2.univ-reunion.fr/~briere>

Nous allons néanmoins l'améliorer pour en augmenter l'intérêt pédagogique.

III : Optimisation pédagogique :

Nous allons visualiser l'effet de la composition du solvant organique sur les paramètres principaux de la chromatographie,

N : efficacité de la colonne,

α : sélectivité de la séparation

R : résolution du chromatogramme.

L'efficacité N de la colonne, par définition ne dépend pas du solvant utilisé et sera donc constante, en revanche la sélectivité et la résolution seront fortement modifiées par une variation de composition de l'éluant.

Les paramètres de départ se divisent en deux catégories :

Paramètres "physiques" : Porosité, longueur et diamètre interne de la colonne, diamètre des particules de phase stationnaire, débit de l'éluant. Ces paramètres "physiques" n'affectent que l'efficacité de la colonne.

Paramètres "chimiques" : nature de la phase stationnaire et de la phase mobile. Ces paramètres chimiques n'affectent pas l'efficacité de la colonne mais agissent sur l'équilibre de partition et donc sur les facteurs de rétention et la sélectivité.

Le paramètre le plus important, la résolution R est affectée à la fois par les paramètres "physiques" et les paramètres "chimiques".

Rappelons la relation de Purnell qui relie R à N, α et k_2 :

$$R_{\text{Purnell}} = \frac{1}{4} N^{0.5} \left[\frac{1 - \alpha}{\alpha} \right] \left[\frac{k_2}{1 + k_2} \right]$$

Variation des facteurs de rétention k_1 et k_2 :

$$\log k = a \log x + b \text{ et } k = 10^{(a \log x + b)}$$

Il sera intéressant de représenter graphiquement les variations de k et log k avec x.

Selon les valeurs de a_1, b_1, a_2 et b_2 , plusieurs cas de figure sont possibles :

On pose $\Delta a = a_1 - a_2$ et $\Delta b = b_1 - b_2$

- > Si $a_1 = a_2$ et $\Delta a = 0$, les deux droites $\log k = f(\log x)$ sont parallèles, les valeurs de k_1 et k_2 seront toujours différentes et le phénomène d'inversion des pics ne pourra se produire.
- > Si a_1 et a_2 sont différents les deux droites se couperont et le phénomène d'inversion des pics se produira pour une certaine teneur x_1 en solvant organique.
- > Au point d'intersection, les deux facteurs de rétention k_1 et k_2 sont égaux et les

deux pics sont confondus ce qui correspond à $\alpha = 1$ et $R = 0$, pour cette composition du solvant la résolution est nulle. et donc minimale, c'est pourquoi nous la désignerons sous l'appellation x_{mini} :

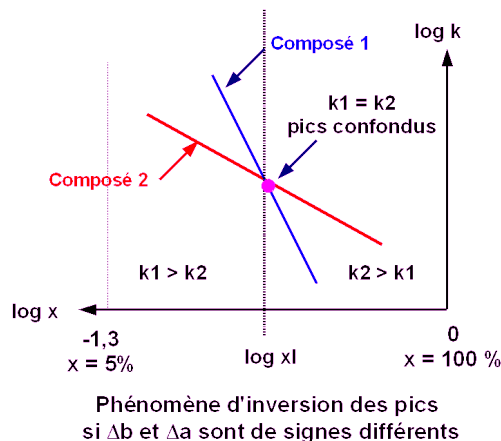
$$a_1 \log x_{\text{mini}} + b_1 = a_2 \log x + b_2$$

$$(a_1 - a_2) \log x = b_2 - b_1$$

$$\log x_{\text{mini}} = (b_2 - b_1) / (a_1 - a_2) = -\Delta b / \Delta a$$

$$x_{\text{mini}} = 10^{-\Delta b / \Delta a}$$

- Si Δb et Δa sont de même signe alors $\log x_{\text{mini}}$ sera négatif et x_{mini} sera inférieur à 1, le phénomène d'inversion des pics sera observable.
- Si Δb et Δa sont de même différents alors $\log x_{\text{mini}}$ sera positif et x sera supérieur à 1, le phénomène d'inversion des pics ne sera pas observable pratiquement, puisqu'il se produirait pour une teneur en solvant organique supérieure à 100%.
- Si $\Delta b = 0$, $\log x_{\text{mini}} = 0$, $x_{\text{mini}} = 1$, les deux pics sont confondus pour $x = 100\%$, le phénomène d'inversion des pics ne sera pas observable pratiquement.



Variation de la sélectivité α :

Si le phénomène d'inversion est observable ($x_{\text{mini}} < 1$) la sélectivité sera minimale et égale à l'unité ($\alpha = k_2 / k_1 = 1$) pour $x = x_{\text{mini}}$.

Variation de la résolution R :

La résolution R est le paramètre le plus important en chromatographie, on considère que la séparation est correcte et utilisable pour un dosage quantitatif si $R > 1,5$.

On devra donc trouver la composition du solvant optimale qui conduira à une résolution supérieure à $R = 1,5$ avec un temps d'analyse le plus court possible, c'est le principe même de l'optimisation de la séparation chromatographique.

La résolution R est définie mathématiquement par :

$$R = \frac{1}{2} (t_{R2} - t_{R1}) / (\sigma_1 + \sigma_2) \text{ avec } t_{R2} > t_{R1}$$

Comme nous l'avons vu plus haut on considère ici que l'efficacité est la même pour les deux composés, dans ces conditions on peut écrire plus simplement :

$$R = \text{ABS}(1/2 * N_{\text{vrai}}^{0,5} * (t_{R1} - t_{R2}) / (t_{R1} + t_{R2}))$$

Exprimons cette résolution en fonction de x

On sait que : $k = (t_R - t_m) / t_m$

soit $t_R = t_m + k t_m = t_m (1+k)$

$t_{R_1} - t_{R_2} = t_m + k_1 t_m - t_m - k_2 t_m = t_m (k_1 - k_2)$

$t_{R_1} + t_{R_2} = t_m + k_1 t_m + t_m + k_2 t_m = t_m (2 + k_1 + k_2)$

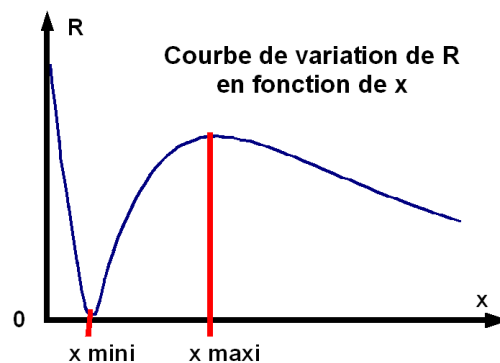
$R = \text{ABS}(1/2 * N_{\text{vrai}}^{0.5} * t_m (k_1 - k_2)) / t_m (2 + k_1 + k_2)$

$R = \text{ABS}(1/2 * N_{\text{vrai}}^{0.5} * (k_1 - k_2)) / (2 + k_1 + k_2)$

On sait exprimer k_1 et k_2 en fonction de x et on peut donc exprimer $R = f(x)$.

On peut donc tracer facilement la courbe de variation de la résolution en fonction de la teneur en solvant x .

On obtient une courbe dont la forme est la suivante :



La position relative des extrema x_{mini} et x_{maxi} sont fonctions des paramètres a_1 , b_1 , a_2 et b_2 des deux composés à séparer.

Position du minimum de la courbe x_{mini} :

La résolution minimale correspond évidemment à la superposition des deux pics pour laquelle $k_1 = k_2$; $\alpha = 1$ et $R = 0$

Nous avons déjà déterminé sa position : $x_{\text{mini}} = 10^{-\Delta b / \Delta a}$

Position du maximum de la courbe x_{maxi} :

Pour déterminer la position de ce point nous allons dériver la fonction $R = f(x)$.

$R = \text{ABS}(1/2 * N_{\text{vrai}}^{0.5} * (k_1 - k_2)) / (2 + k_1 + k_2)$

Pour simplifier cette expression nous allons supprimer la valeur absolue qui n'est là en fait que pour rendre R positif en cas d'inversion des pics, pour situer le maximum elle n'interviendra pas, on pourrait la garder pour pouvoir déterminer le minimum de la courbe mais cela est inutile puisque nous connaissons déjà ce résultat.

$R = 1/2 * N_{\text{vrai}}^{0.5} * (k_1 - k_2) / (2 + k_1 + k_2)$

Le premier terme $1/2 * N_{\text{vrai}}^{0.5}$ ne dépend pas de x et nous pouvons donc l'éliminer.

Nous devons donc dériver la fonction : $g(x) = (k_1(x) - k_2(x)) / (2 + k_1(x) + k_2(x))$

avec $k_1(x) = 10^{(a_1 * \log(x) + b_1)}$ et $k_2(x) = 10^{(a_2 * \log(x) + b_2)}$

Résolution exacte :

Posons $d(x) = k_1(x) - k_2(x) = 10^{b_1} x^{a_1} - 10^{b_2} x^{a_2}$

Dérivons : $d'(x) = a_1 10^{b_1} x^{a_1-1} - a_2 10^{b_2} x^{a_2-1}$

$$\text{Posons } s(x) = 2 + k_1(x) + k_2(x) = 2 + 10^{b_1} x^{a_1} + 10^{b_2} x^{a_2}$$

$$\text{Dérivons : } s'(x) = a_1 10^{b_1} x^{a_1-1} + a_2 10^{b_2} x^{a_2-1}$$

$$g'(x) = d'(x) \cdot s(x) - s'(x) \cdot d(x) / (d(x))^2$$

Nous devons, pour trouver le maxima de la courbe, déterminer la valeur de x pour laquelle cette fonction $g'(x)$ est nulle. Le dénominateur $(d(x))^2 = (2 + k_1 + k_2)^2$ n'est jamais nul puisque k_1 et k_2 sont toujours positifs. Il nous suffit donc de résoudre l'équation $d'(x) \cdot s(x) - s'(x) \cdot d(x) = 0$

$$\text{soit } d'(x) \cdot s(x) = s'(x) \cdot d(x)$$

$$(a_1 10^{b_1} x^{a_1-1} - a_2 10^{b_2} x^{a_2-1}) \cdot (2 + 10^{b_1} x^{a_1} + 10^{b_2} x^{a_2}) = (a_1 10^{b_1} x^{a_1-1} + a_2 10^{b_2} x^{a_2-1}) \cdot (10^{b_1} x^{a_1} - 10^{b_2} x^{a_2})$$

La résolution littérale de cette équation n'est pas réalisable mais sa résolution numérique est tout a fait possible avec une calculatrice. Si on utilise un tableur, on pourra utiliser une macro "valeur cible" pour déterminer x_{maxi} .

Nous pourrions donc si les paramètres a_1, a_2, b_1 et b_2 sont connus déterminer la position du maximum de la courbe $R = f(x)$.

Si N est connu pour pourrions également calculer la résolution correspondante.

Résolution simplifiée :

On peut simplifier quelque peu le problème en faisant une approximation sur la valeur de la fonction $s(x) = 2 + k_1(x) + k_2(x)$.

Si on est en solvant a forte teneur en solvant organique, les composés hydrophobes n'auront pas une grande affinité avec la phase stationnaire, les facteurs de rétention seront très petits et on pourra simplifier $S(x)$ en $S(x) = 2$, les termes k_1 et k_2 étant négligeable devant 2.

Résolution approchée pour de fortes teneurs en solvant organique :

$$\text{Posons : } d(x) = k_1(x) - k_2(x) = 10^{b_1} x^{a_1} - 10^{b_2} x^{a_2}$$

$$\text{Dérivons : } d'(x) = a_1 10^{b_1} x^{a_1-1} - a_2 10^{b_2} x^{a_2-1}$$

$$\text{Posons } s(x) = 2 + k_1(x) + k_2(x) = 2$$

$$\text{Dérivons : } s'(x) = 0$$

$$g'(x) = d'(x) \cdot s(x) - s'(x) \cdot d(x) / (d(x))^2$$

$$g'(x) = d'(x) \cdot 2 / 4 = d'(x) / 2$$

Nous devons pour trouver le maximum de la courbe déterminer la valeur de x pour laquelle cette fonction $g'(x)$ est nulle.

Il nous suffit donc de résoudre l'équation $d'(x) = 0$

$$\text{soit } a_1 10^{b_1} x^{a_1-1} - a_2 10^{b_2} x^{a_2-1} = 0$$

$$a_1 10^{b_1} x^{a_1-1} = a_2 10^{b_2} x^{a_2-1}$$

$$a_1 10^{b_1} / a_2 10^{b_2} = x^{a_2-1} / x^{a_1-1}$$

$$a_1 / a_2 10^{b_1 - b_2} = x^{a_2 - a_1}$$

$$a_1 / a_2 10^{\Delta b} = x^{-\Delta a}$$

$$\log (a_1 / a_2) + \Delta b = -\Delta a \cdot \log x$$

$$\log x = - (\log (a_1 / a_2) + \Delta b) / \Delta a$$

$$\mathbf{x = 10^{- (\log (a_1 / a_2) + \Delta b) / \Delta a}}$$

La valeur approximative obtenue par cette méthode servira de point de départ pour la résolution exacte par une méthode numérique.

Pour des teneurs en solvant organique faibles, aucune approximation simple n'est possible, mais cela n'est pas gênant puisque le maximum sera visible directement, seuls les cas extrêmes pour lesquels ce maxima sera trop proche de $x=0$ ne pourront être décelés mais ces cas ne sont de toute manière pas exploitables en pratiques car ils conduisent à des temps d'analyse prohibitifs.

Il est donc possible de visualiser toute la courbe de variation théorique de la résolution et de vérifier que sa forme est bien celle décrite plus haut. Pour pouvoir visualiser la totalité de la courbe $R = f(x)$, nous prévoyons de pouvoir faire varier x hors de sa plage naturelle de variation $0 < x < 1$, un compromis raisonnable est de faire varier x de $x_{\min}/2$ à $2 x_{\max}$, ce qui permet de visualiser la forme globale de la courbe.

Nous sommes limités en pratique par la plage de variation $0 < x < 1$, et en fonction des paramètres a_1, b_1, a_2 et b_2 choisis on ne percevra pas totalement la courbe de variation de R . Le maxima de la courbe sera souvent atteint pour une valeur de x très nettement supérieure à 1 et ne sera donc pas perceptible. expérimentalement.

Pour vérifier tous ces points une feuille de calcul EXCEL nommée "simsolvR" vous est proposée, téléchargeable à l'adresse suivante : <http://www2.univ-reunion.fr/~briere>

Cette feuille toute prête permet de bien visualiser l'influence de la teneur en solvant organique sur la résolution R .

Les paramètres principaux sont les constantes a_1, b_1, a_2 et b_2 caractéristiques des deux composés à séparer et l'efficacité N de la colonne utilisée. On ne se préoccupe donc pas de l'influence des paramètres "physiques" qui sont globalement inclus par le paramètre N .

Pédagogiquement, cette séparation des facteurs permet une grande simplification en allant à l'essentiel.

Des boutons utilisant des macros permettent d'un simple clic de modifier rapidement la feuille ou de faire certains calculs.

Boutons de changement de plage de variation de x : en cliquant sur ces boutons on se placera soit sur une plage normale de variation de x : $0 < x < 1$ (bouton "x normal") soit sur une plage étendue de x permettant la visualisation complète de la courbe : $\frac{1}{2} x_{\min} < x < 2 x_{\max}$ (bouton "x maximal").

Boutons de calculs :

bouton "Calcul x_{\max} vrai" : permet le calcul du vrai maximum de la courbe $R = f(x)$,

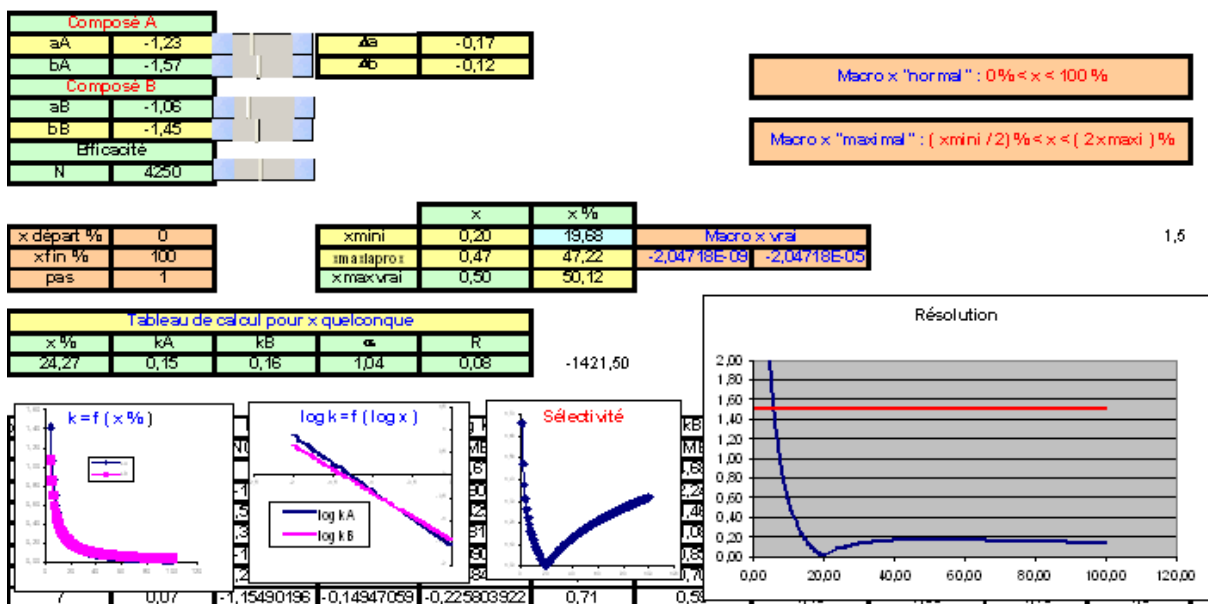
Remarque : En pratique si on clique sur le bouton "x maximal" ce calcul se fera automatiquement même sans cliquer sur "calcul x_{\max} vrai".

Tableau de calcul pour x quelconque : Introduire une valeur pour x et les valeurs de k_A, k_B, α et R seront automatiquement calculées.

Bouton "Calcule $R = 1,5$ " : Ce bouton permet le calcul automatique de la teneur en solvant "idéale" pour laquelle $R = 1,5$ et temps de rétention minimal (voir plus loin).

Boutons "voir $R=1,5$ " et "supprimer $x=1,5$ " : font apparaître ou disparaître l'horizontale de la résolution limite $R = 1,5$ du graphique $R = f(x)$ (voir plus loin).

Aspect de la feuille de calcul :



Optimisation de la séparation :

On peut se placer dans deux cas limites :

Si on est en phase de mise au point de la séparation on aura intérêt à avoir la résolution la plus élevée possible, en effet il se peut que d'autres composés viennent s'intercaler entre les deux pics étudiés, on a donc intérêt à avoir des pics très écartés. Dans ce cas on cherchera à se placer au maximum de la courbe de résolution. Comme les temps de rétention sont très élevés pour des teneurs en eau élevées c'est à $x = x_{\text{maxi}}$ qu'il faudra se placer (si toutefois $x_{\text{maxi}} < 1$!), la détermination de la position de ce point est alors indispensable.

Si la séparation est déjà bien au point et qu'aucun autres composés n'est susceptible de s'intercaler on pourra alors rechercher une optimisation visant à réduire le temps d'analyse et à se placer vers $R=1,5$.

Il convient de déterminer la composition du solvant permettant d'obtenir une résolution supérieure à $R = 1,5$ avec un temps d'analyse le plus court possible.

Le temps d'analyse sera d'autant plus court que la teneur en solvant organique sera importante, le problème revient donc à trouver la teneur en solvant organique la plus élevée conduisant à $R > 1,5$.

Le premier calcul à effectuer sera celui de la résolution pour le solvant organique pur, si celle-ci est supérieure à 1,5, le problème est résolu.

Calcul de la résolution pour $x = 1$:

$$R = \text{ABS}(1/2 * N_{\text{vrai}}^{0,5} * (k_1 - k_2)) / (2 + k_1 + k_2)$$

pour $x=1$

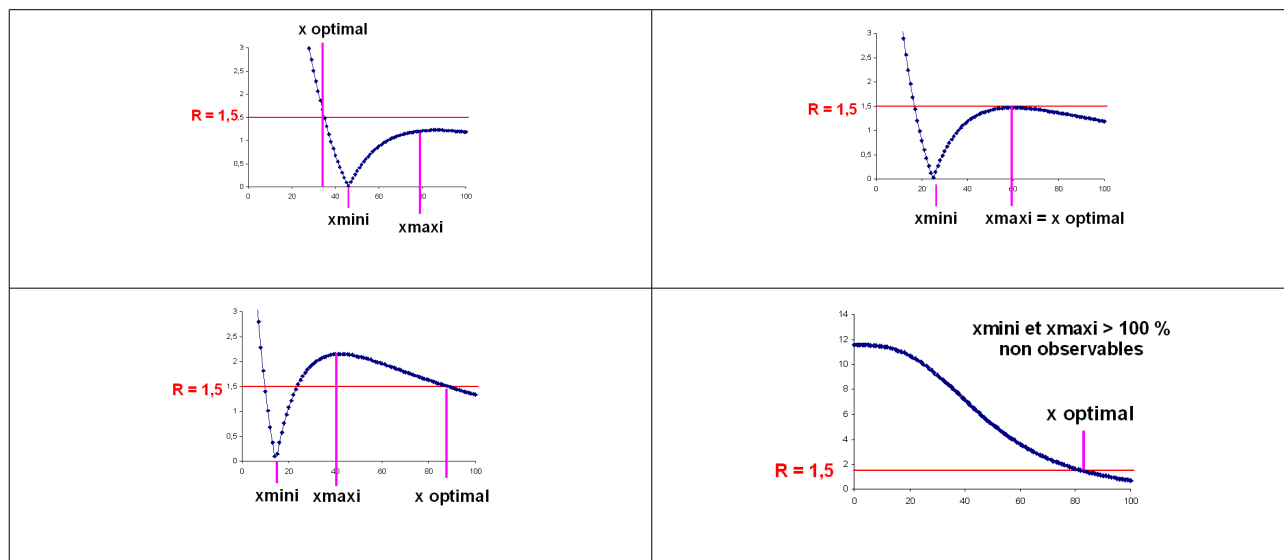
$$\log k_1 = a_1 * \log 1 + b_1 = b_1 \text{ soit : } k_1 = 10^{b_1}$$

$$\text{et } \log k_2 = a_2 * \log 1 + b_2 = b_2 \text{ soit : } k_2 = 10^{b_2}$$

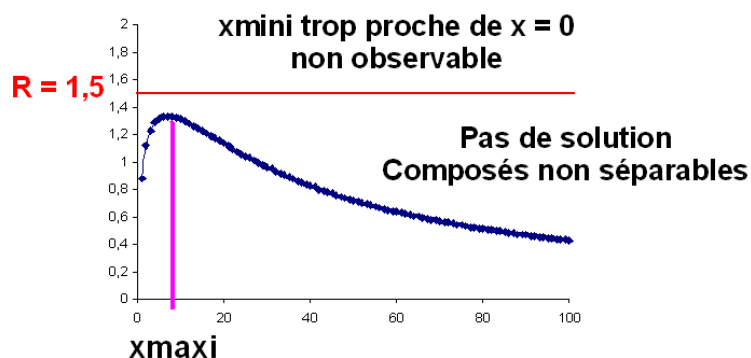
$$R_{100} = \text{ABS}(1/2 * N_{\text{vrai}}^{0,5} * (10^{b_1} - 10^{b_2})) / (2 + 10^{b_1} + 10^{b_2})$$

Si la résolution pour $x = 100\%$ est inférieure à 1,5 on diminuera la teneur en solvant organique jusqu'à obtenir $R = 1,5$.

Pour visualiser cette résolution limite de 1,5 nous tracerons l'horizontale correspondante. Plusieurs cas de figures sont possibles qui sont résumées dans les figures suivantes.



Il est enfin possible que la séparation des deux composés soit impossible à réaliser.



Utilisation pratique du programme et de la feuille de calcul :

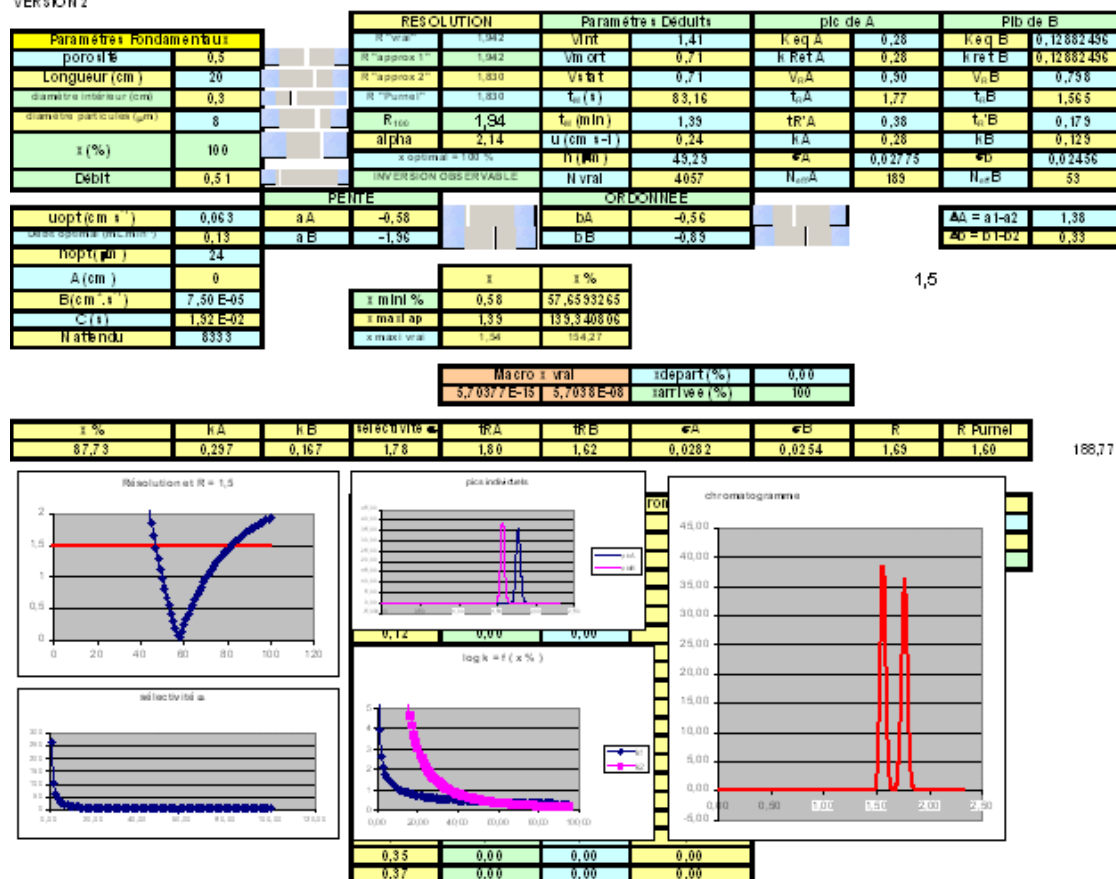
Il n'est bien entendu pas indispensable de visualiser toute la courbe de variation de R, on peut se limiter à la plage naturelle de variation de x ($0 < x < 1$). On pourra donc réaliser deux feuilles de calcul différentes, la première plus simple ne faisant intervenir que l'aspect visuel du chromatogramme sans se préoccuper des aspect théoriques. Une troisième feuille de calcul complète sera utilisée dans un troisième temps. Cette feuille de calcul intégrera un tableau permettant le tracé du graphique de la variation de la résolution avec x. Une feuille de calcul EXCEL toute prête nommée "simsolv2" sera disponible pour téléchargement à l'adresse suivante : <http://www2.univ-reunion.fr/~briere>

Par ailleurs un programme équivalent est proposé pour des calculatrices graphiques type TI89 ou TI92 adaptable pour d'autres calculatrices, ce programme sera téléchargeables à la même adresse.

Aspect de la feuille de calcul EXCEL

Simulateur de chromatogrammes avec effet de solvant par Thierry Briere

VERSION 2



Tous les résultats obtenus sont bien entendus dépendants des paramètres "physiques" choisis : longueur de la colonne, porosité, longueur, diamètre interne, diamètre des particules de phase stationnaire et débit de l'éluant. On pourra donc faire ensuite varier ceux-ci pour optimiser encore la séparation. La modification d'un de ces facteurs modifiera simultanément, le x optimal de la séparation. Le temps d'analyse étant un facteur essentiel, le débit utilisé est un moyen efficace d'optimisation. On choisira au départ de se placer au débit optimal de la colonne utilisée, on déterminera la teneur optimale en solvant organique pour ce débit. On augmentera ensuite le débit pour obtenir un temps d'analyse plus court puis on ajustera la teneur en solvant organique de l'éluant pour ce nouveau débit.

Programme pour calculatrices TI89-TI92

```
()  
Prgm  
NewProb  
setMode("Exact/Approx","APPROXIMATE")  
Dialog  
Title "simul chro"  
Text "simulateur de chromatogrammes"  
Text "avec effet de solvant"  
Text " par Thierry Briere"  
EndDlog  
lbl debut  
Text "donnees fondamentales"  
Input "porosité",poro  
Input "longueur en cm",long  
Input "diametre interne en cm",dint  
Input "diametre particules en µm",dpart  
dialog  
text "choix de a et b"  
text "-3 <a< -0.5 et -1,5<b<0"  
EndDlog  
Input "a1",a1  
Input "b1",b1  
Input "a2",a2  
Input "b2",b2  
.5/dpart»uopt  
CE*dint^2/4*long»vint  
poro*vint»vmort  
vmort*uopt*60/long»dopt  
Disp "uopt "&string(uopt)&"cm/s"  
Disp "debit optimal "&string(dopt)&"mL/min"  
Input "debit en ml.min-1",debit  
vint-vmort»vstat  
vmort/debit»tmort  
long/tmort/60»umoy  
3*dpart/10000»hopt  
7.5-a5/umoy+3.-a4*dpart^2*umoy»hreel  
long/hreel»nreel  
Dialog
```

```
Title "Données déduites"  
Text "volume interne "&string(vint)&" mL"  
Text "volume mort "&string(vmort)&" mL"  
Text "volume stationnaire "&string(vstat)&" mL"  
Text "temps mort "&string(tmort)&" min"  
EndDlog  
Dialog  
Title "Données déduites"  
Text "u optimal "&string(uopt)&" cm/s"  
Text "h optimal "&string(hopt)&" cm"  
Text "u moy reelle "&string(umoy)&" cm/s"  
Text "h reelle "&string(hreel)&" cm"  
Text "efficacite "&string(nreel)&" pltx"  
EndDlog  
0.5*nreel^0.5»nr  
(10^b1-10^b2)/(2+10^b1+10^b2)»rb100  
abs(nr*rb100)»R100  
disp "résolution pour x=100%",R100  
pause  
If R100>1.5  
Then  
disp "x optimal = 100 % !"  
dialog  
text "Xoptimal = 100 %"  
EndDlog  
EndIf  
a1-a2»da  
b1-b2»db  
10^a(db/da)»xmini  
disp "xmini = 10^-(db/da)",xmini  
pause  
10^a((log(a1/a2)+db)/da)»xmaxap  
disp "xmax ap= 10^-(log(a1/a2)+db)/da",xmaxap  
pause  
popup {"calculer xmax vrai ?", "non"},stopxmax  
If stopxmax=1  
Then  
10^(a1*log(x)+b1)»k1(x)  
10^(a2*log(x)+b2)»k2(x)
```


<pre> k1(x)-k2(x)»d(x) 2+k1(x)+k2(x)»s(x) abs(nr*d(x)/s(x))»r(x) fMax(r(x),x) x>xmini»xmaxvrai disp "xmax vrai =",xmaxvrai pause Endlf dialog text " courbe de résolution" text "repérer xopt approx pour R=1,5" EndDlog {.05,.1,.15,.2,.25,.3,.35,.4,.45,.5,.55,.6,.65,.7,.75,.8,.85,.9,.95,1}»li stx 10^(a1*log(listx)+b1)»listk1 10^(a2*log(listx)+b2)»listk2 abs(listk1-listk2)/(2+listk1+listk2)*nreel^(.5)*.5»listreso listx/listx*1.5»listr15 lbl b NewPlot 3,2,listx,listr15,,,,5 NewPlot 2,2,listx,listreso,,,,2 ZoomData trace dialog text "résolution numérique de r(x)=1,5" enddlog input "xopt approx pour R=1,5 = ?",xap nsolve(r(x)=1.5,x=xap)»solr disp "x vrai %",100*solr Lbl a Input "xorg %",xorg 10^(a1*log(xorg/100)+b1)»kret1 10^(a2*log(xorg/100)+b2)»kret2 kret1*vmort/vstat»keq1 kret2*vmort/vstat»keq2 vmort+keq1*vstat»vr1 vr1/debit»tr1 tr1/nreel^(.5)»sigma1 tr1-tmort»tred1 (tred1/sigma1)^2»neff1 Dialog Title "Compose 1" Text "kret 1 "&string(kret1) Text "Keq 1 "&string(keq1) Text "VR 1 "&string(vr1)&" mL" Text "tR 1 "&string(tr1)&" min" </pre>	<pre> Text "sigma 1 "&string(sigma1)&" min" Text "N eff 1 "&string(neff1)&" pltx" EndDlog kret2*vmort/vstat»keq2 vmort+keq2*vstat»vr2 vr2/debit»tr2 tr2/nreel^(.5)»sigma2 tr2-tmort»tred2 (tred2/sigma2)^2»neff2 Dialog Title "Compose 2" Text "kret 2 "&string(kret2) Text "Keq 2 "&string(keq2) Text "VR 2 "&string(vr2)&" mL" Text "tR 2 "&string(tr2)&" min" Text "tred 2 "&string(tred2)&" min" Text "sigma 2 "&string(sigma2)&" min" Text "N eff 2 "&string(neff2)&" pltx" EndDlog .5*abs(tr2-tr1)/(sigma1+sigma2)»rvrai Dialog Title "Résolution" Text "R vrai "&string(rvrai) EndDlog PopUp {"autre xorg","voir chromatogramme","revoir courbe R","changer paramètres","fin"},stopa If stopa=1 goto a if stopa=3 goto b if stopa=4 goto debut if stopa=5 goto fin if tr2>tr1 tr2»tfin if tr1>tr2 tr1»tfin seq(t,t,0,1.3*tfin,tfin/50)»listt 1/sigma2*—^(a(listt-tr2)^2/2/sigma2^2)»picb 1/sigma1*—^(a(listt-tr1)^2/2/sigma1^2)»pica pica+picb»listchro NewPlot 1,2,listt,listchro,,,,5 ZoomData trace lbl fin EndPrgm </pre>
---	--

Conclusion : Ce simulateur de chromatogramme avec effet de solvant est un bon outil pédagogique permettant de bien comprendre et surtout de visualiser les effets sur le chromatogramme de la modification de la teneur en solvant organique de l'éluant. Par son aspect ludique il permet d'approcher, la mise au point ou l'optimisation d'une séparation en mode isocratique. Un prochain article sera consacré à la simulation des gradients de solvant pour laquelle la composition de l'éluant varie en cours d'analyse.

Bibliographie

(1) T. Brière - Bulletin de l'Union des Physiciens – Vol 99 – Décembre 2005

(2) T.J. Janjic et cols - J.Serb.Chem.Soc 66(10)671-683(2001)