

# Simulations de chromatogrammes en Chromatographie Liquide Haute Performance

## I. Influence des paramètres

---

Ce document illustre la feuille de calcul *simulation\_clhp\_v1.0.xls*. Cette feuille permet de mettre en évidence l'influence des différents facteurs sur une séparation en CLHP. Notre simulation fonctionne en phase inverse et est illustrée par l'étude d'un mélange constitué d'adénine, de thymine, de guanine, d'uracile et de cytosine et de phénol.

Les résultats sont connus :

$$\left( \frac{\epsilon \nu^2}{d} \left( 1 + e^{\left( a_i \cdot \phi_{s.org} + \frac{b_i}{T} + c_i \right)} \right) \times \frac{dp}{n_c} \right)^2 \left[ \left( A \times \frac{\epsilon \nu^2}{d} \left( 1 + e^{\left( a_i \cdot \phi_{s.org} + \frac{b_i}{T} + c_i \right)} \right) \times \frac{dp}{n_c} \right)_i \right]$$

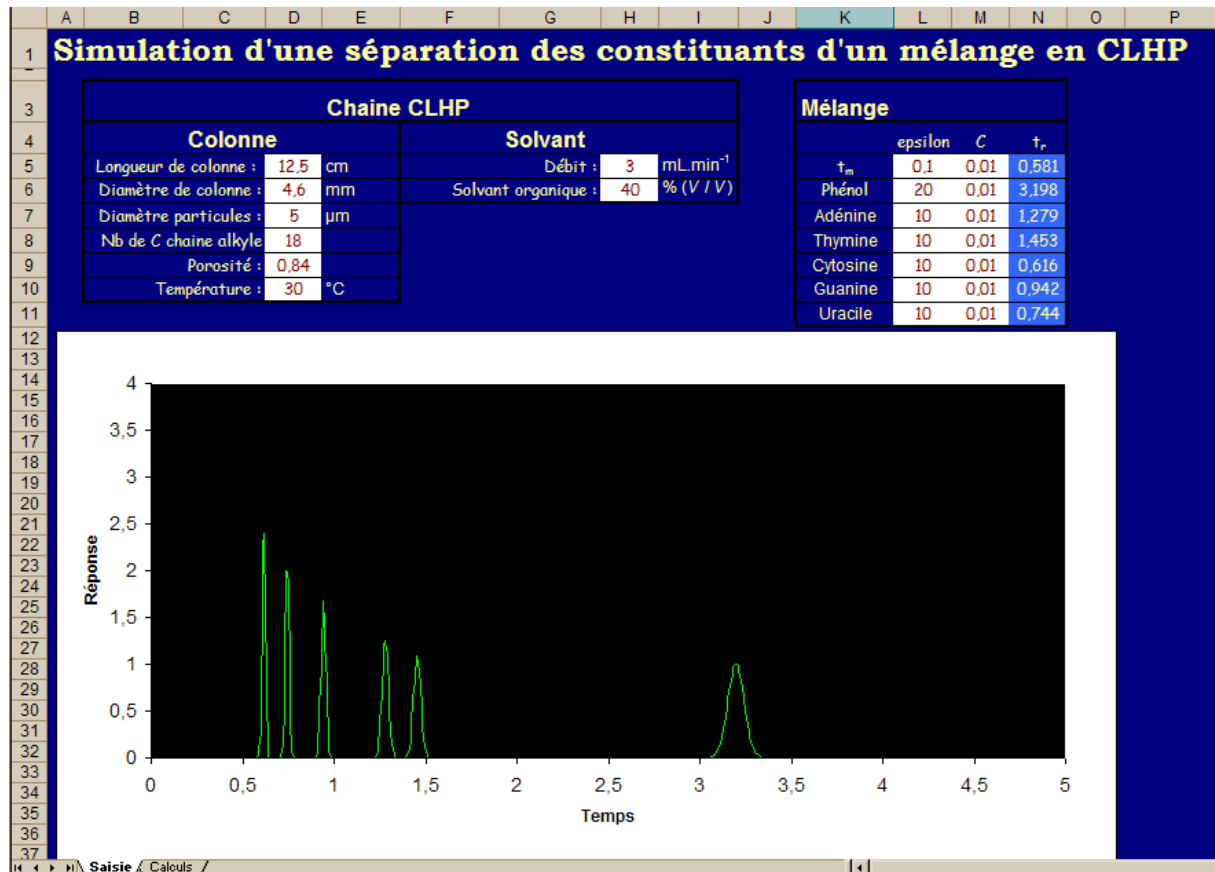
- les produits sont d'autant plus longs à sortir que la colonne est longue et large,
- les pics sont d'autant plus fins ( $N_{th}$  plus élevé,  $h_p$  plus faible) que les billes de silice sont petites et régulières, et que les chaînes alkyles qui les tapissent sont longues,
- les produits sortent d'autant plus vite que la température, le débit et la proportion de solvant organique sont élevés.

---

Feuille de calcul .....	2
Visualisation de l'influence des différents facteurs .....	3
Influence de la colonne .....	4
1. Influence de la longueur de la colonne .....	4
2. Influence du diamètre de la colonne .....	5
3. Influence du diamètre des particules .....	6
4. Influence de la longueur de la chaîne alkyle .....	7
5. Influence de la température .....	8
6. Influence du débit .....	9
7. Influence de la proportion en solvant organique .....	10
Comment ça marche ? .....	11
$f_i(t)$ 1. Le temps mort ( $t_m$ ) et la porosité de la colonne ( $\epsilon$ ) .....	12
2. Le facteur de rétention ( $k'$ ) .....	12
3. La largeur à mi-hauteur ( $w_{1/2}$ ) .....	14
4. Equation $f_i(t)$ .....	15
Note .....	16
Annexe I. Isothermes de van't Hoff .....	17

# Feuille de calcul

Elle prend la forme suivante :



Les cases colorées en blanc sont modifiables et les valeurs figurant dans les cases bleues résultent d'un calcul. Il est possible de paramétrer la colonne :

$$f_i(t) = \frac{0,94}{\left( A \times \frac{\epsilon l \nu^2}{d} \cdot \left( 1 + e^{\left( a_i \cdot \phi_{s,org} + \frac{b_i}{T} + c_i \right)} \right) \right)^2} \cdot \left( 1 + e^{\left( a_i \cdot \phi_{s,org} + \frac{b_i}{T} + c_i \right)} \right) \times \frac{dp}{n_c}_i$$

Colonne	
Longueur de colonne :	12,5 cm
Diamètre de colonne :	4,6 mm
Diamètre particules :	5 µm
Nb de C chaîne alkyle	18
Porosité :	0,84
Température :	30 °C

l'éluant<sup>1</sup> :

Solvant	
Débit :	3 mL.min <sup>-1</sup>
Solvant organique :	40 % (V / V)

<sup>1</sup> Nous avons paramétré cette feuille en utilisant comme éluant l'**acétonitrile**, préféré au **méthanol**, plus toxique.

*Acétonitrile* : F ; XN ; R11, 20/21/22, 36 ; S16, 36/37.

*Méthanol* : F ; T ; R11, 23/24/25, 39/23/24/25 ; S7, 16, 36/37, 45.

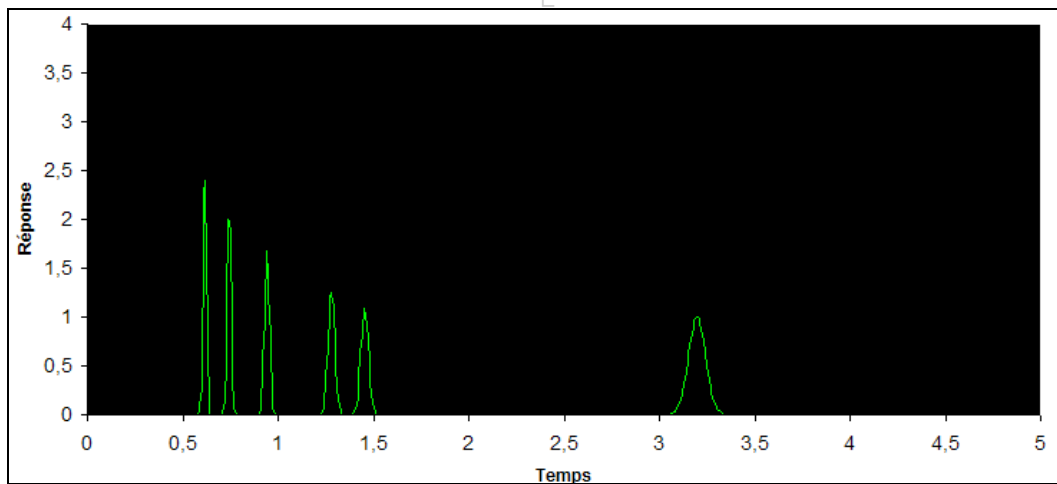
De façon à simplifier la prise en main de la feuille de calcul, nous avons également fait le choix de ne pas faire intervenir le pH.

ainsi que les concentrations des produits tout comme leur coefficient de réponse, appelé ici epsilon :

Mélange			
	epsilon	C	t <sub>r</sub>
t <sub>m</sub>	0.1	0.01	0.581
Phénol	20	0.01	3.198
Adénine	10	0.01	1.279
Thymine	10	0.01	1.453
Cytosine	10	0.01	0.616
Guanine	10	0.01	0.942
Uracile	10	0.01	0.744

## Visualisation de l'influence des différents facteurs

Voici le chromatogramme de départ :



Nous considérerons comme données de références les conditions suivantes :

Simulation d'une séparation des constituants d'un mélange en CLHP			
Colonne		Solvant	
Longueur de colonne :	12.5 cm	Débit :	3 mL.min <sup>-1</sup>
Diamètre de colonne :	4.6 mm	Solvant organique :	40 % (V/V)
Diamètre particules :	5 µm		
Nb de C chaîne alkyle :	18		
Porosité :	0.84		
Température :	30 °C		

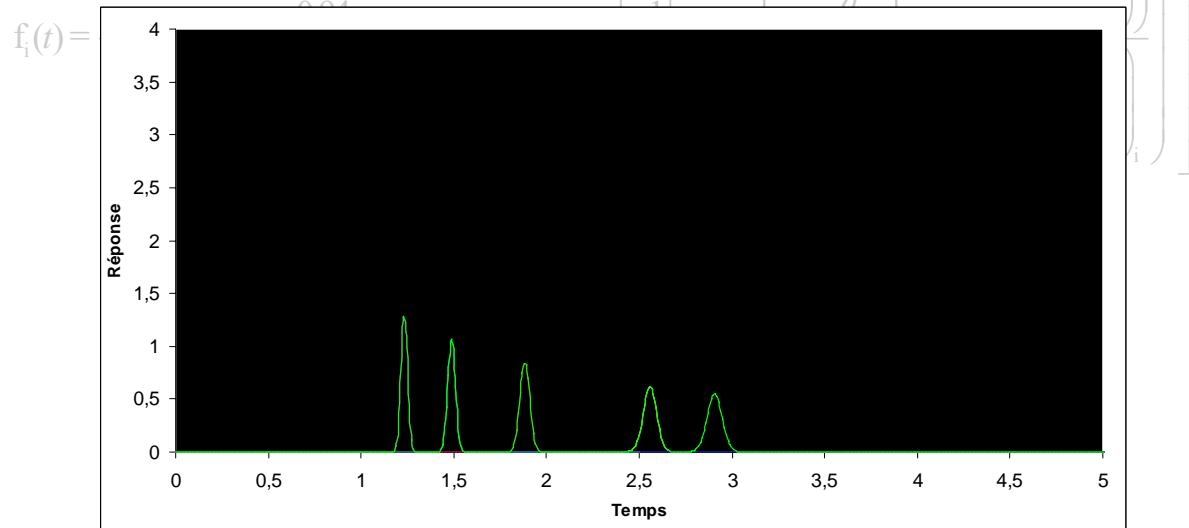
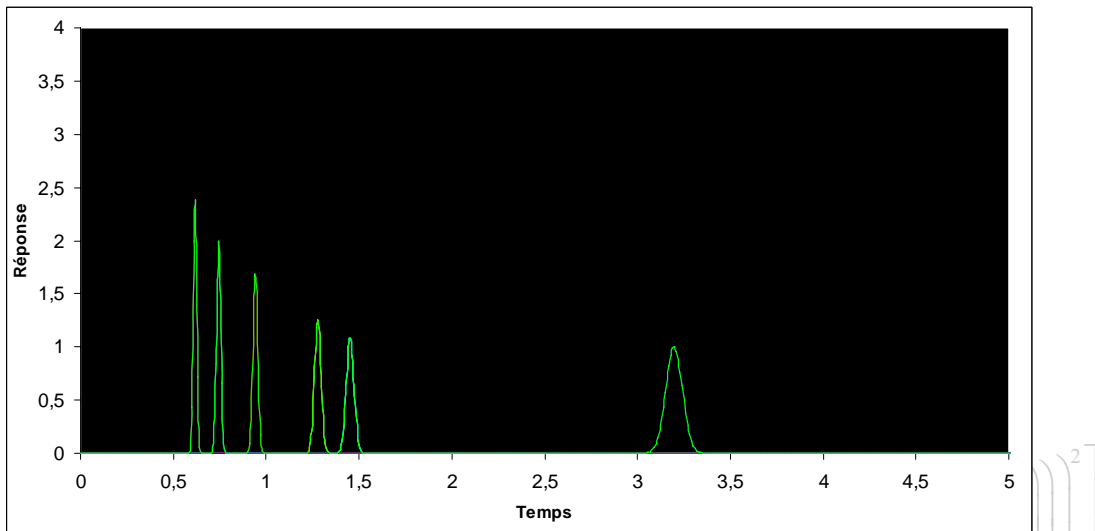
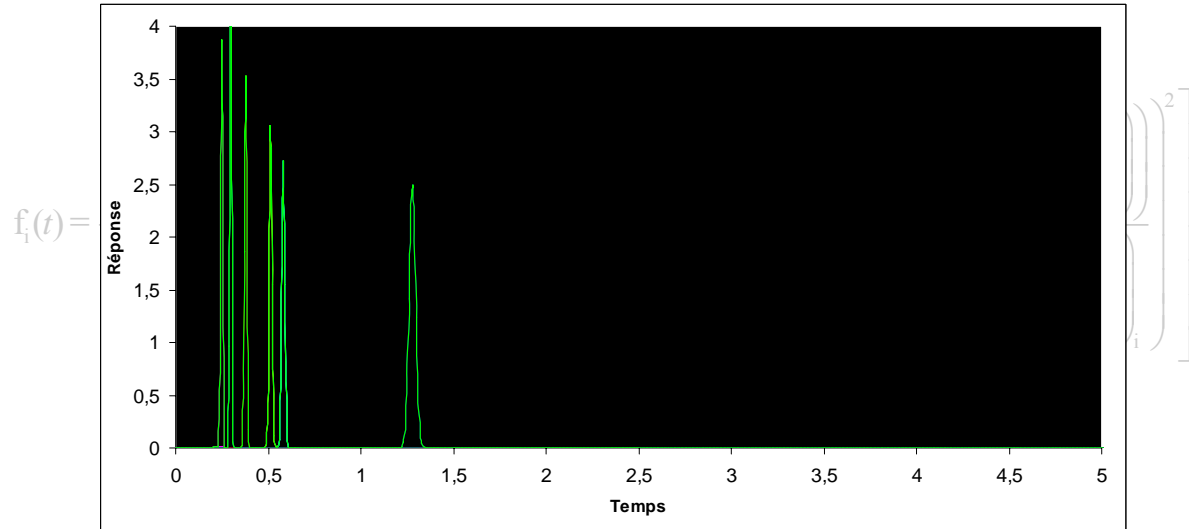
Mélange			
	epsilon	C	t <sub>r</sub>
t <sub>m</sub>	0.1	0.01	0.581
Phénol	20	0.01	3.198
Adénine	10	0.01	1.279
Thymine	10	0.01	1.453
Cytosine	10	0.01	0.616
Guanine	10	0.01	0.942
Uracile	10	0.01	0.744

Nous allons faire varier chaque paramètre individuellement.

## Influence de la colonne

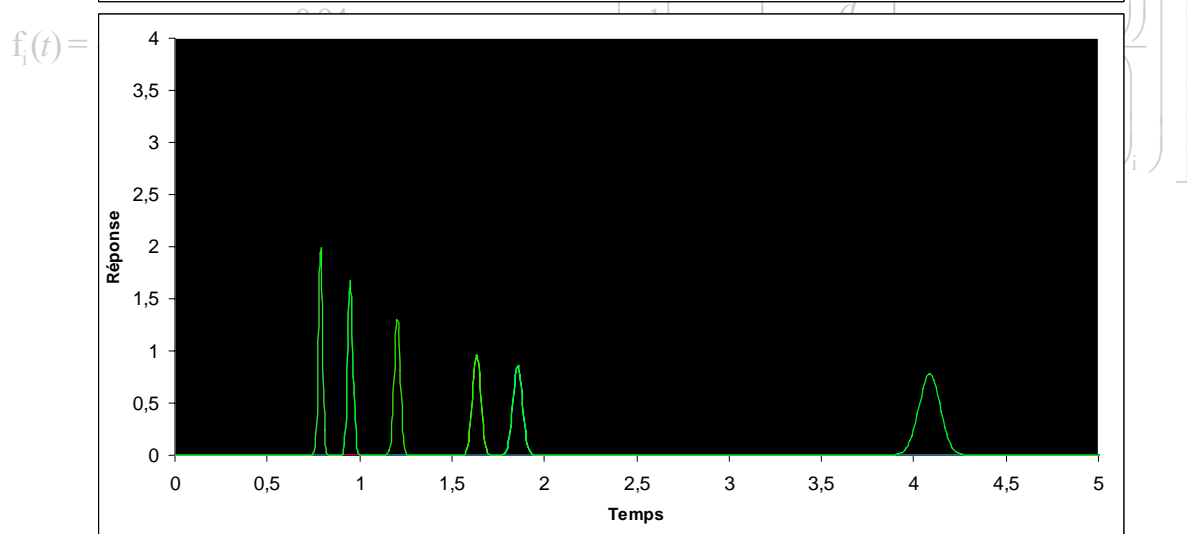
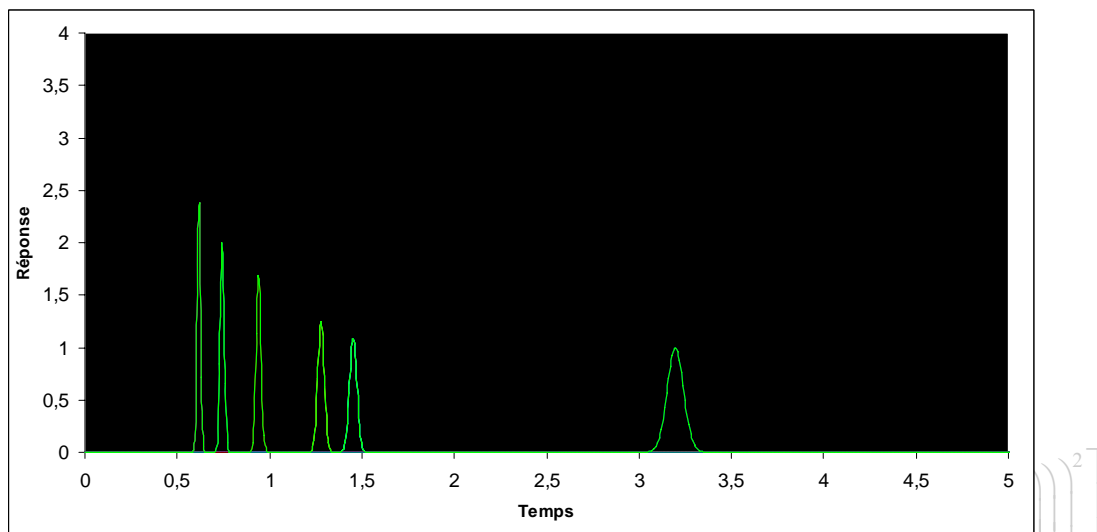
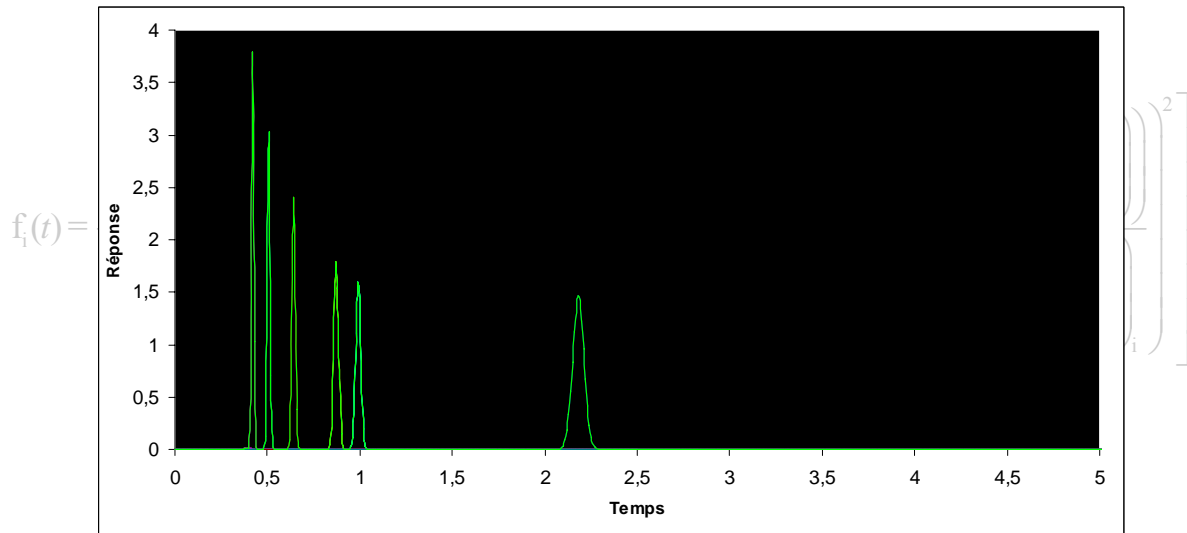
### 1. Influence de la longueur de la colonne

Voici les trois chromatogrammes, respectivement pour des longueurs de 5, 12,5 et 25 cm :



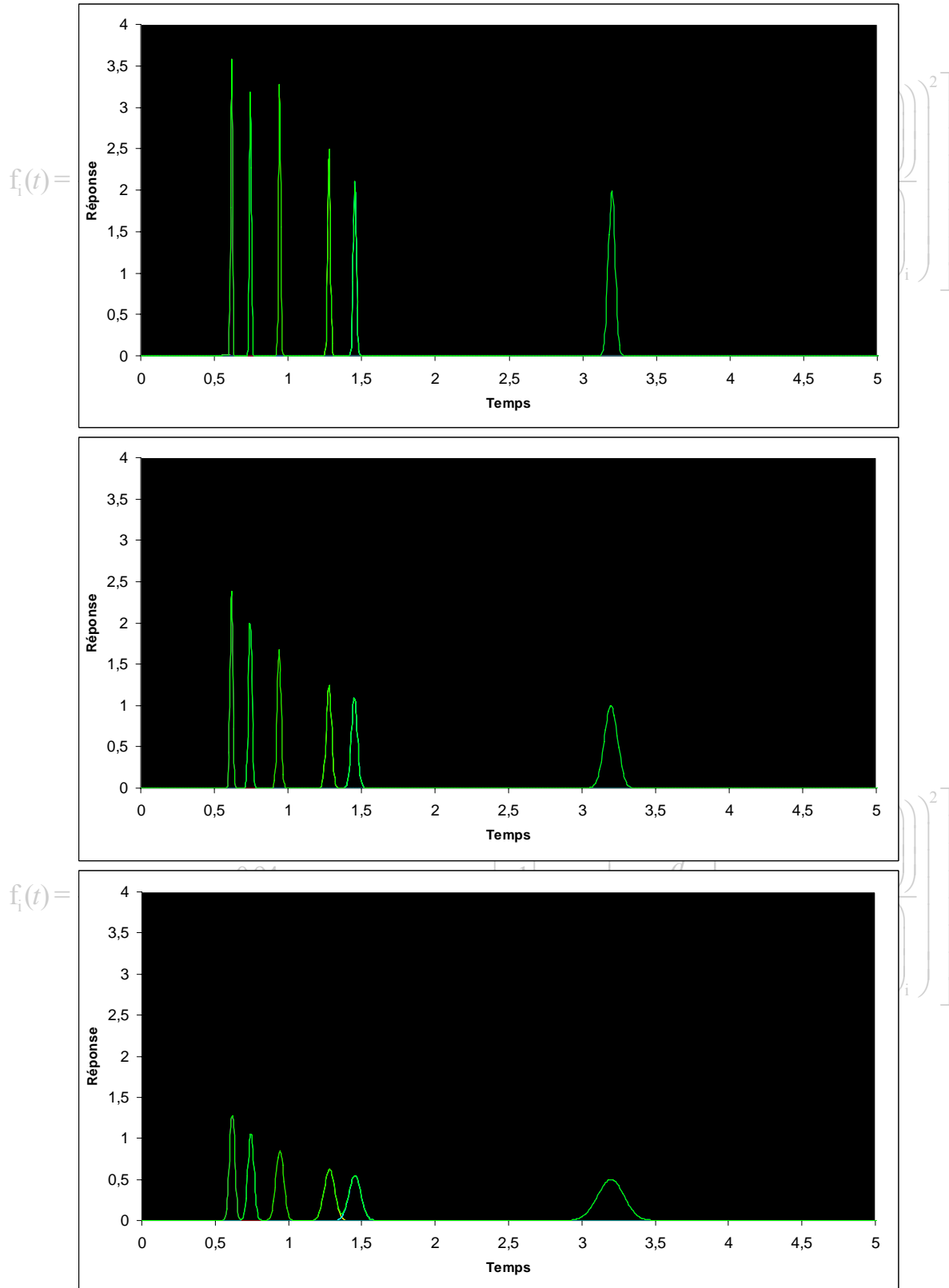
## 2. Influence du diamètre de la colonne

Voici les trois chromatogrammes, respectivement pour des diamètres internes de 3,8, 4,6 et 5,2 mm :



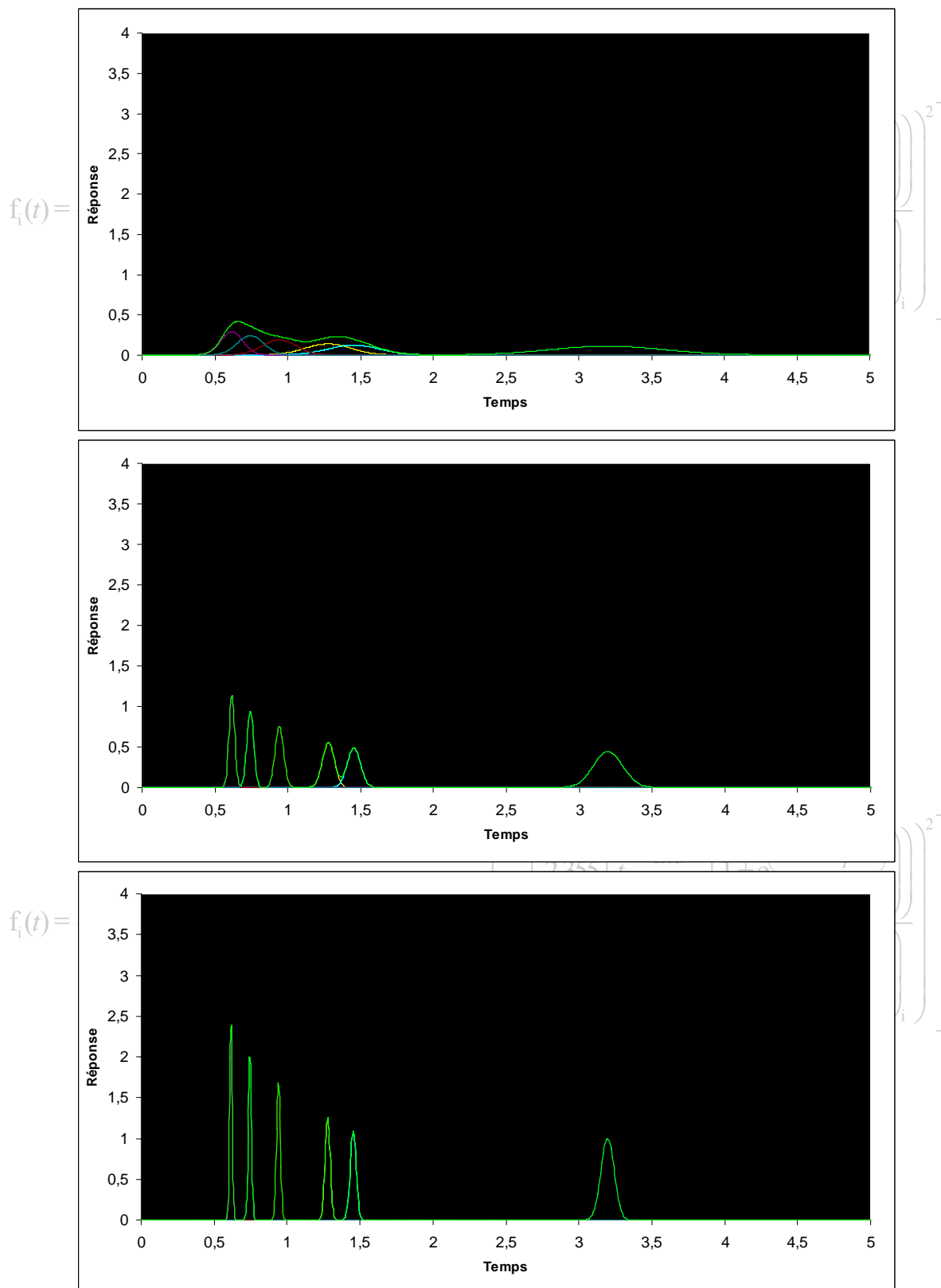
### 3. Influence du diamètre des particules

Voici les trois chromatogrammes, respectivement pour des diamètres de 2,5, 5 et 10  $\mu\text{m}$  :



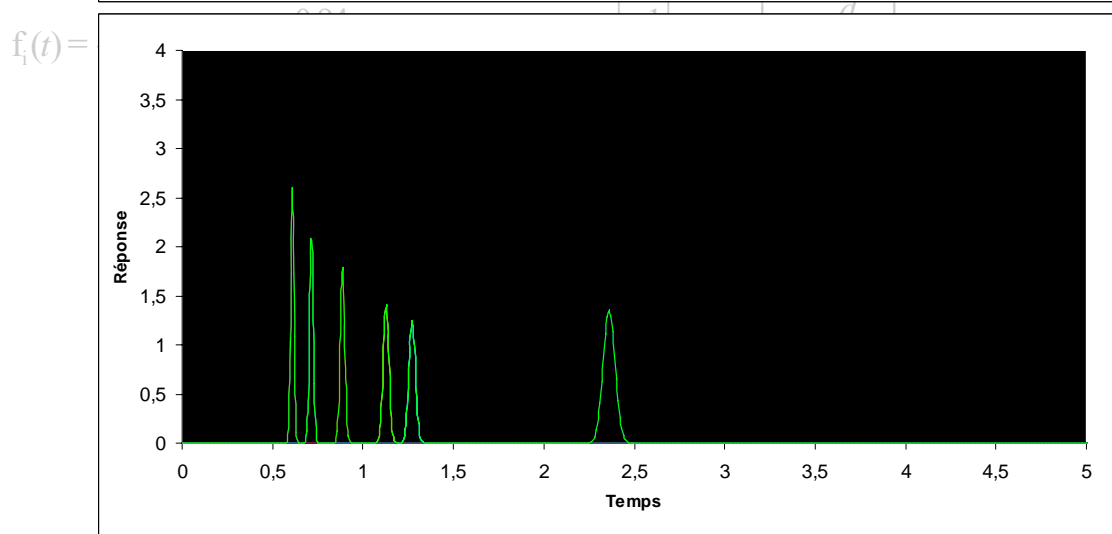
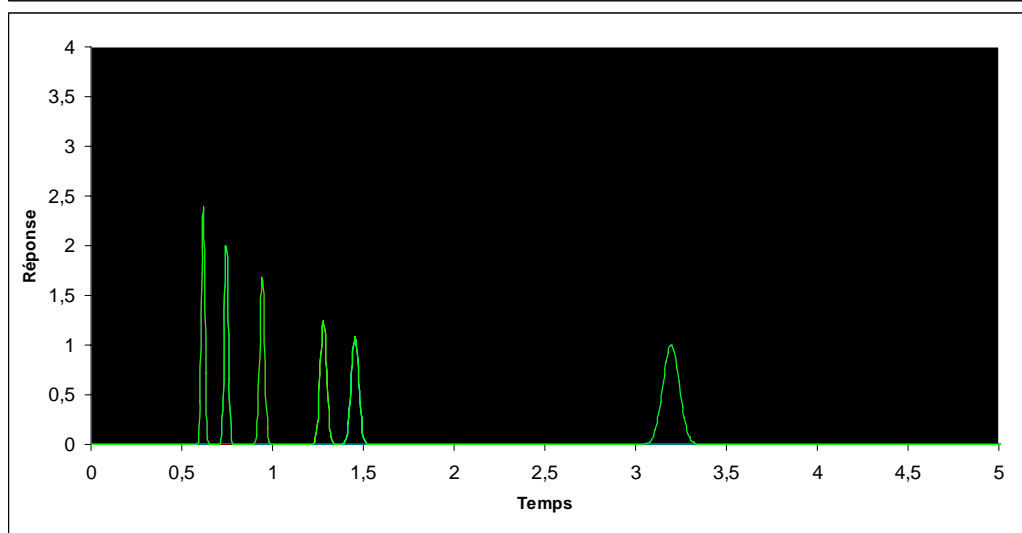
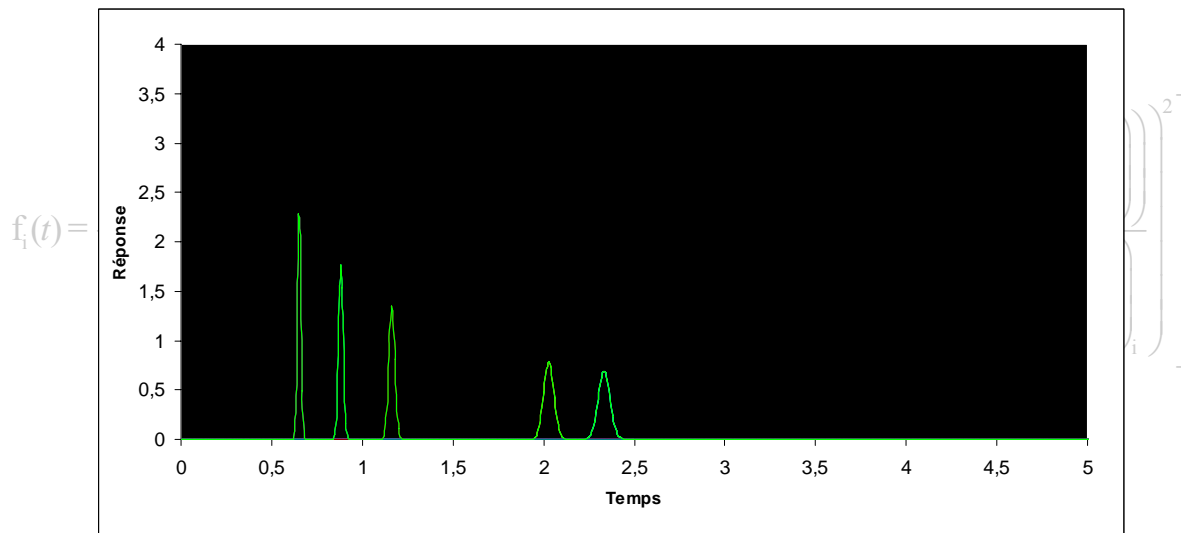
#### 4. Influence de la longueur de la chaîne alkyle

Voici les trois chromatogrammes, respectivement pour des chaînes alkyles comportant 2, 8 et 18 atomes de carbone :



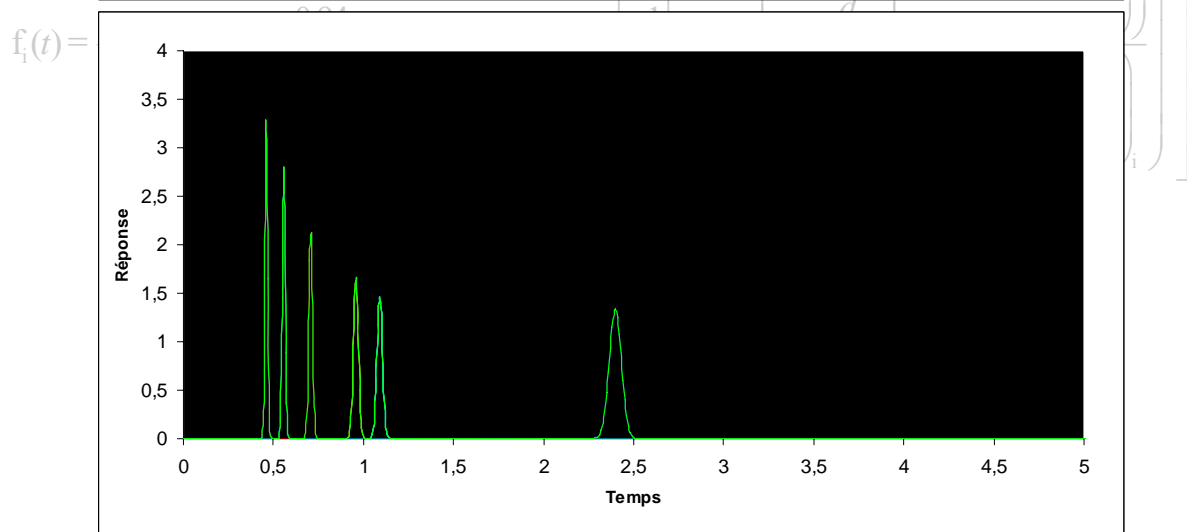
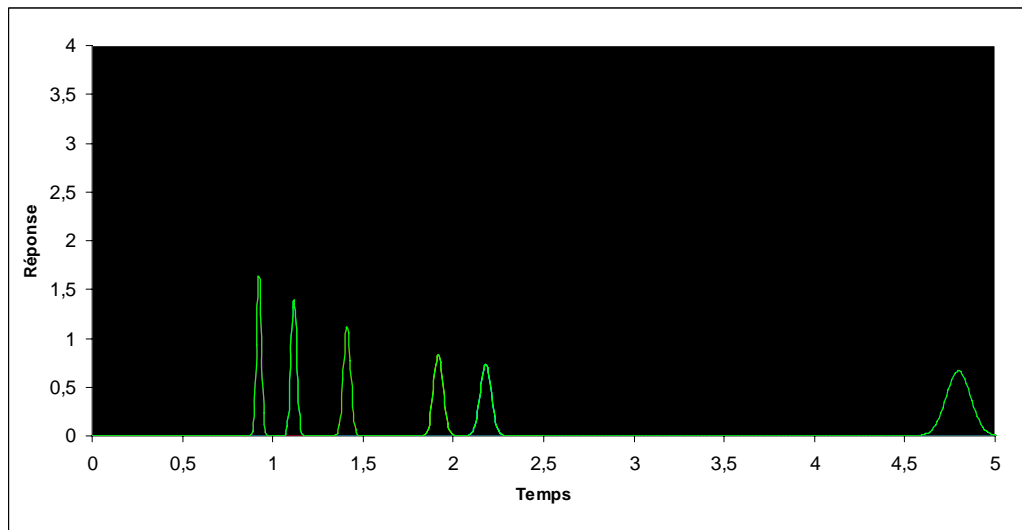
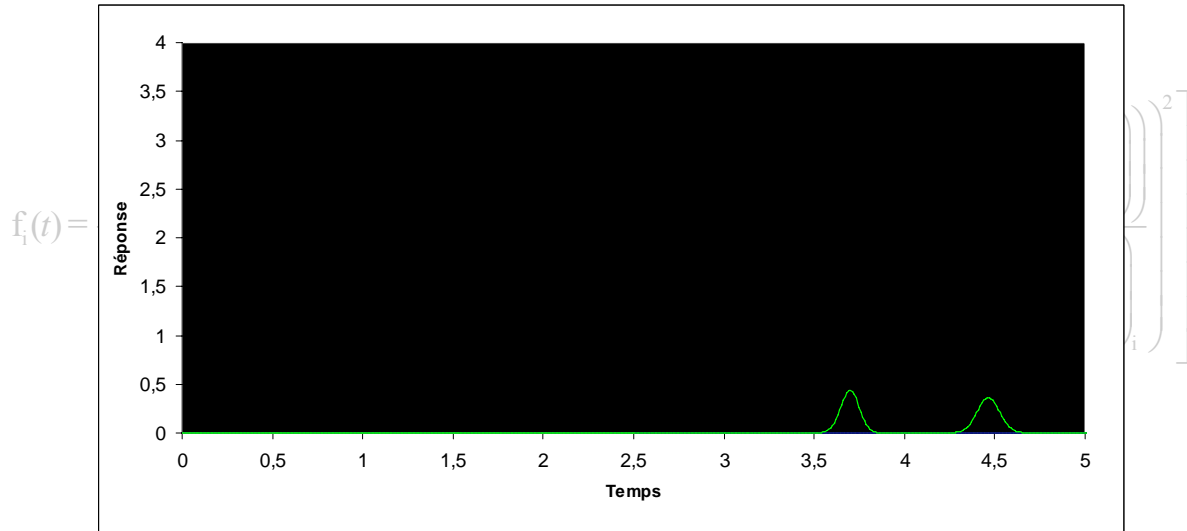
## 5. Influence de la température

Voici les trois chromatogrammes, respectivement pour des températures de 15, 30 et 45°C :



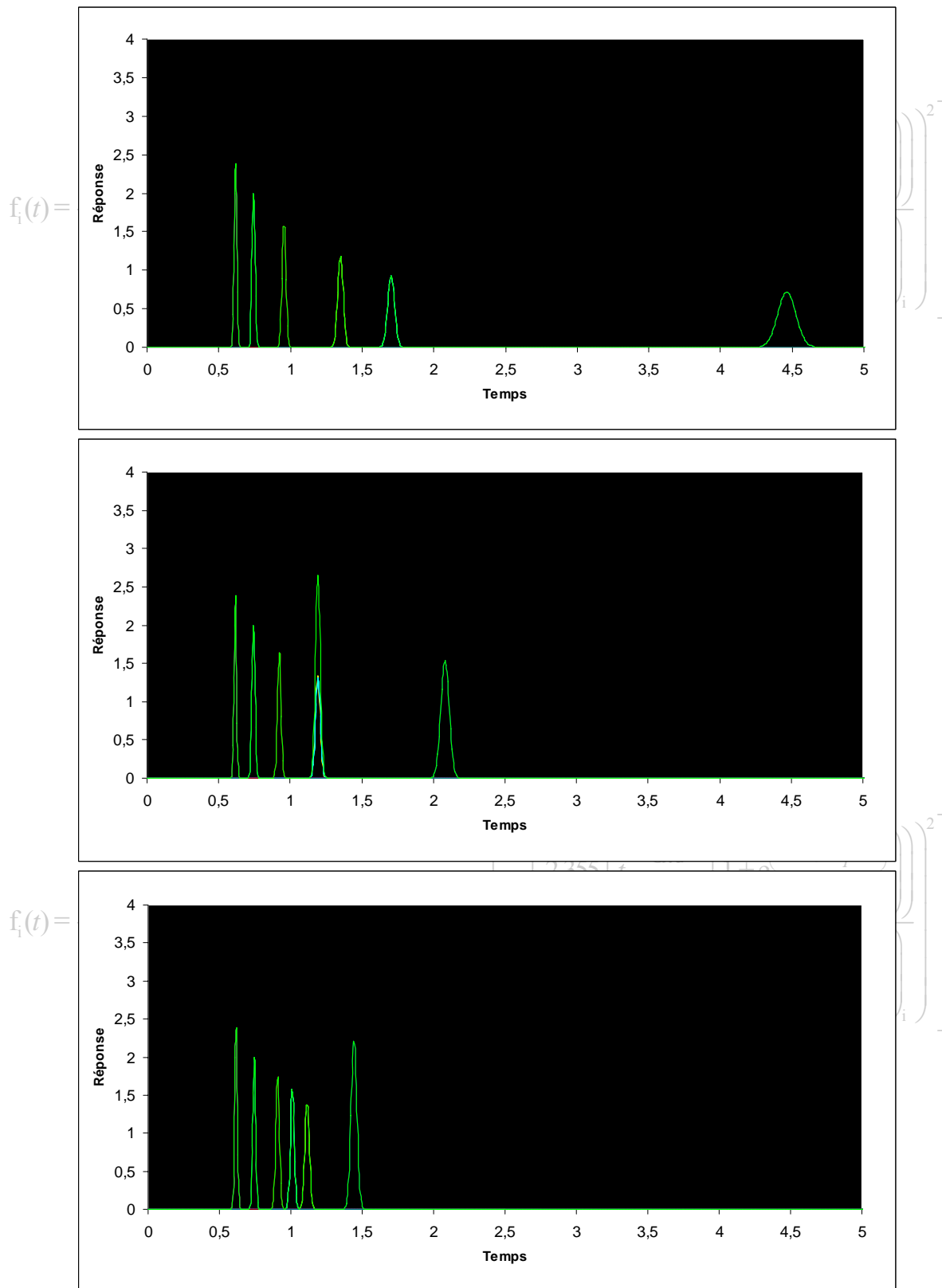
## 6. Influence du débit

Voici les trois chromatogrammes, respectivement pour des débits d'éluant de 0,5, 2 et 4 mL.min<sup>-1</sup> :



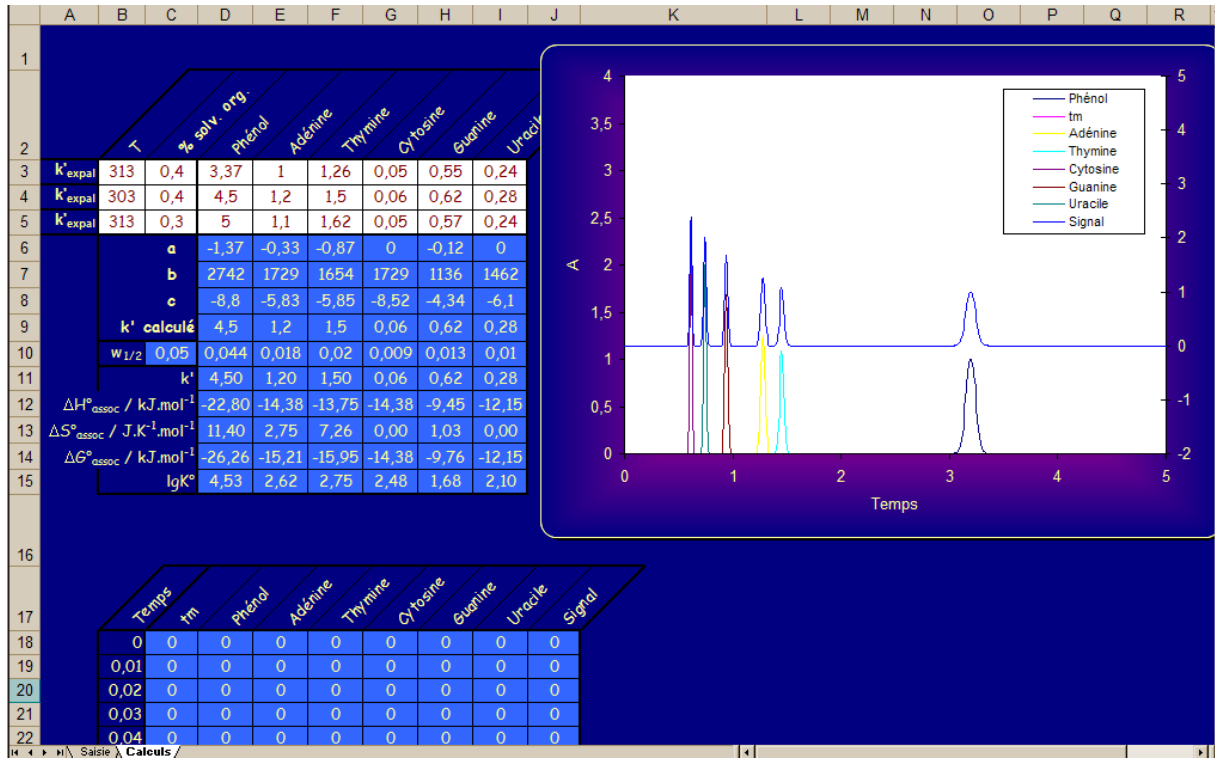
## 7. Influence de la proportion en solvant organique

Voici les trois chromatogrammes, respectivement pour des proportions de 30, 60 et 90 % en solvant organique :



# Comment ça marche ?

Les calculs sont effectués sur l'onglet « calculs » :



Seuls deux paramètres fixent l'allure du chromatogramme : la **largeur à mi-hauteur**,  $w_{1/2}$  et le **facteur de rétention**,  $k'$ .

On rappelle que le facteur de rétention est défini par :

$$k'_i = \frac{t_{r,i} - t_m}{t_m} \left[ \frac{1}{2,355} \left( t - \frac{\epsilon l \pi^2}{d} \left( 1 + e^{\left( a_i \cdot \phi_{s,org} + \frac{b_i}{T} + c_i \right)} \right) \right)^2 \right]$$

où  $t_{r,i}$  est le temps de rétention du composé  $i$  et  $t_m$  le temps mort, le temps que met une particule pour traverser la colonne sans y être retenu.

Comme nous considérerons les pics comme gaussiens<sup>2</sup>, ils seront définis par :

$$f(t) = \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \left( \frac{t-t_r}{\sigma} \right)^2} = \frac{2\sqrt{2\ln(2)}}{w_{1/2} \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \left( \frac{2\sqrt{2\ln(2)} \cdot (t-t_r)}{w_{1/2}} \right)^2}$$

<sup>2</sup> Nous avons choisi de ne pas faire intervenir ici de facteur d'asymétrie.

Soit :

$$f(t) = \frac{0,94}{w_{1/2}} \cdot e^{-\frac{1}{2} \left( \frac{2,355 \cdot (t-t_i)}{w_{1/2}} \right)^2}$$

Comme  $t_{r,i} = t_m \cdot (1 + k'_i)$ , la fonction pour un composé  $i$  sera :

$$f_i(t) = \frac{0,94}{(w_{1/2})_i} \cdot e^{-\frac{1}{2} \left( \frac{2,355 \cdot (t - t_m \cdot (1 + k'_i))}{(w_{1/2})_i} \right)^2}$$

## 1. Le temps mort ( $t_m$ ) et la porosité de la colonne ( $\varepsilon$ )

Le temps mort se calcule ou se détermine expérimentalement. Expérimentalement, on le voit sur le chromatogramme. Il se calcule si on connaît la **porosité** de la colonne. Le lien entre les temps mort et porosité est :

$$\varepsilon = \frac{V_{\text{éluant}}}{V_{\text{colonne vide}}} = \frac{d / \text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1} \times t_m / \text{min}}{l / \text{cm} \times \pi \times r^2 / \text{cm}^2}$$

Dans la feuille, le calcul du temps mort se fait à partir de la valeur de la porosité :

$$t_m = \frac{\varepsilon l \pi r^2}{d}$$

On constate que le **temps mort** dépend des caractéristiques de la **colonne** : la **longueur** ( $l$ ), son **diamètre** ( $2r$ ), sa **porosité** ( $\varepsilon$ ) et du **débit** imposé par la pompe ( $d$ ).

## 2. Le facteur de rétention ( $k'$ )

C'est par le facteur de rétention que l'on détermine le temps de rétention des constituants du mélange selon :  $t_{r,i} = t_m \cdot (1 + k'_i)$

Nous voulons que le facteur de rétention dépende de la température, de la proportion de solvant organique dans l'éluant. On utilise pour cela un modèle simplifié suivant (pour en savoir plus, voir annexe I):

$$\ln(k'_i) = a_i \cdot \ln(\phi_{S.org.}) + \frac{b_i}{T} + c_i.$$

Où  $\phi_{S.org.}$  est défini comme le pourcentage en volume de solvant organique dans l'éluant :

$$\phi_{S.org.} = \frac{V_{Solv.org.}}{V_{Solv.org.} + V_{eau}}$$

Il faut donc déterminer les constantes  $a_i$ ,  $b_i$  et  $c_i$ , spécifiques à un produit  $i$  donné. Deux techniques sont possibles : la **méthode empirique** une utilisant des **paramètres expérimentaux**, l'autre utilisant une **modélisation** de ces paramètres à l'aide de **données physico-chimiques**. Dans le cas de la première méthode, on est réduit à simuler des chromatogrammes de produits sur lesquels on a des informations. Les résultats sont de bonne qualité. L'intérêt de la seconde méthode est que l'on peut réaliser des simulations pour des produits que l'on n'a jamais analysés. Bien évidemment, les chromatogrammes générés sont beaucoup plus approximatifs. Nous proposons ici la première technique. Un article fera prochainement l'objet de la seconde.

Pour déterminer  $a_i$ ,  $b_i$  et  $c_i$ , il faut donc trois valeurs de  $k'_i$  à deux températures ( $T_1$  et  $T_2$ ) et deux proportions de solvants organiques différentes ( $\phi_{S.org.1}$  et  $\phi_{S.org.2}$ ).

Comme :

$$\ln \left[ k'_i(\phi_{S.org.j}, T_j) \right] = a_i \cdot \ln(\phi_{S.org.j}) + \frac{b_i}{T_j} + c_i$$

Alors :

$$\ln \left[ k'_i(\phi_{S.org.1}, T_1) \right] - \ln \left[ k'_i(\phi_{S.org.2}, T_2) \right] = \frac{b_i}{T_1} - \frac{b_i}{T_2}$$

Donc :

$$b_i = \frac{T_1 \cdot T_2}{T_2 - T_1} \times \left[ \ln \left[ k'_i(\phi_{S.org.1}, T_1) \right] - \ln \left[ k'_i(\phi_{S.org.2}, T_2) \right] \right]$$

De même :

$$a_i = \frac{\ln \left[ k'_i(\phi_{S.org.1}, T_1) \right] - \ln \left[ k'_i(\phi_{S.org.2}, T_2) \right]}{\ln(\phi_{S.org.1}) - \ln(\phi_{S.org.2})}$$

Et :

$$c_i = \ln \left[ k'_i(\phi_{S.org.j}, T_j) \right] - a_i \cdot \ln(\phi_{S.org.j}) - \frac{b_i}{T_j}$$

### Saisie des valeurs expérimentales

	T	% Al. org.	Phénol	Adénine	Thymine	Cytosine	Guanine	Uracil
$k'_{\text{exp.1}}$	313	0,4	3,37	1	1,26	0,05	0,55	0,24
$k'_{\text{exp.2}}$	303	0,4	4,5	1,2	1,5	0,06	0,62	0,28
$k'_{\text{exp.3}}$	313	0,3	5	1,1	1,62	0,05	0,57	0,24
a			-1,37	-0,33	-0,87	0	-0,12	0
b			2742	1729	1894	1729	1136	1462
c			-8,8	-5,83	-5,85	-8,52	-4,34	-6,1

### Calculs des paramètres a, b, c et k'

k' expal	313	0,3	5	11	162	0,05	0,57	0,24
a	-1,37	-0,33	-0,87	0	-0,12	0		
b	2742	1729	1654	1729	1136	1462		
c	-8,8	-5,83	-5,85	-8,52	-4,34	-6,1		
k' calculé	4,5	1,2	1,5	0,06	0,62	0,28		

### Report dans la colonne des calculs

c	-8,8	-5,83	-5,85	-8,52	-4,34	-6,1		
k' calculé	4,5	1,2	1,5	0,06	0,62	0,28		
w <sub>1/2</sub>	0,05	0,044	0,018	0,02	0,009	0,013	0,01	
k'	4,50	1,20	1,50	0,06	0,62	0,28		
ΔH° <sub>assoc</sub> / kJ.mol <sup>-1</sup>	-22,80	-14,38	-13,75	-14,38	-9,45	-12,15		
ΔS° <sub>assoc</sub> / J.K <sup>-1</sup> .mol <sup>-1</sup>	11,40	2,75	7,26	0,00	1,03	0,00		
ΔG° <sub>assoc</sub> / kJ.mol <sup>-1</sup>	-26,26	-15,21	-15,95	-14,38	-9,76	-12,15		
lgK°	4,53	2,62	2,75	2,48	1,68	2,10		

### 3. La largeur à mi-hauteur (w<sub>1/2</sub>)

De façon à mettre en évidence l'influence de la **taille des particules** et de la **longueur de la chaîne alkyle**, nous avons opté pour le modèle **très simplifié** suivant :

$$(w_{1/2})_i = A \times t_{r,i} \times \frac{dp / \mu\text{m}}{n_c}$$

A étant une constante définie de façon arbitraire<sup>3</sup>, dp le diamètre des particules et n<sub>c</sub> le nombre d'atomes de carbone de la chaîne alkyle. Le temps de rétention intervient de façon à avoir un nombre de plateaux théoriques constants. Il s'agit d'une approximation. En effet :

$$f_i(t) = \frac{N_{th} \cdot \left( \frac{t_{r,i}}{w_{1/2}} \right)^2}{0,94 \cdot \left( A \times \frac{\varepsilon l v^2}{d} \cdot \left( 1 + e^{\left( a_i \cdot \phi_{S,org} + \frac{b_i}{T} + c_i \right)} \right) \times \frac{dp}{n_c} \right)} \cdot \exp \left[ - \frac{2 \cdot \left( \frac{t_{r,i}}{A \times t_{r,i} \times \frac{dp}{n_c}} \right)^2}{\left( A \times \frac{\varepsilon l v^2}{d} \cdot \left( 1 + e^{\left( a_i \cdot \phi_{S,org} + \frac{b_i}{T} + c_i \right)} \right) \times \frac{dp}{n_c} \right)} \right]$$

<sup>3</sup> Il permet de fixer la valeur du nombre de plateaux théoriques, selon :  $A = \frac{5,54 \times n_c}{N_{th} \times dp}$

#### 4. Equation $f_i(t)$

L'équation définitive est :

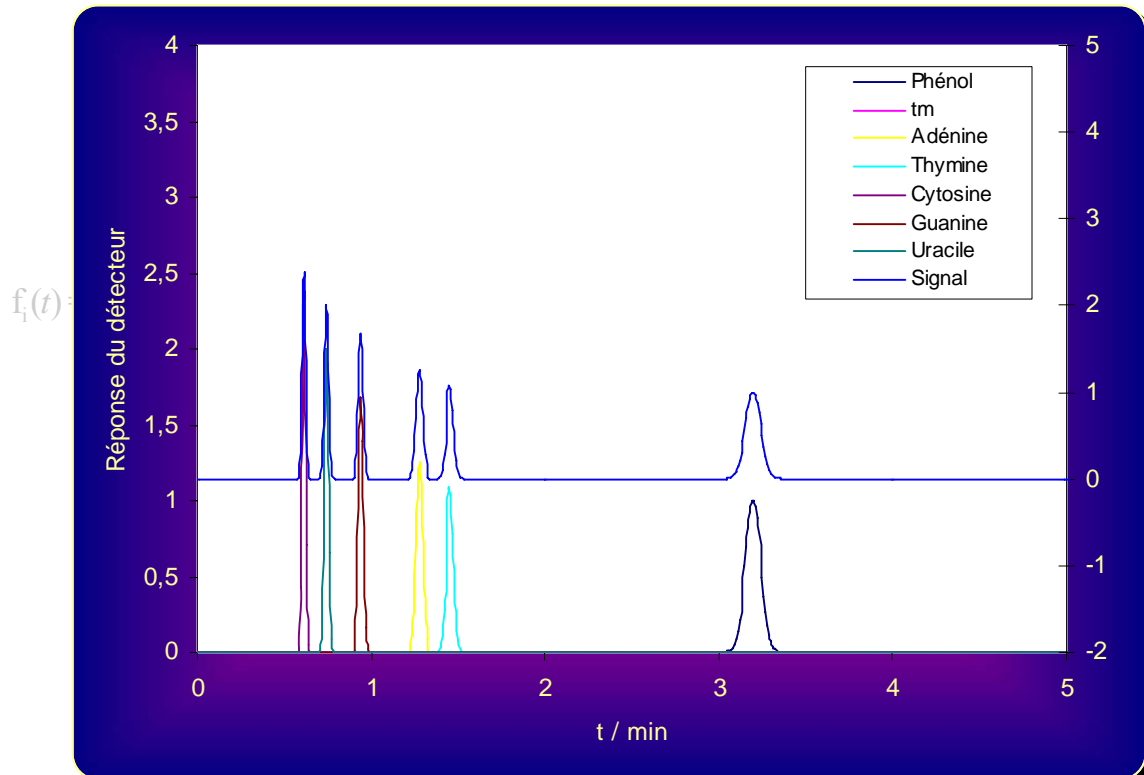
$$f_i(t) = \frac{0,94}{\left( A \times \frac{\varepsilon l \pi r^2}{d} \cdot \left( 1 + e^{\left( a_i \cdot \phi_{S,org} + \frac{b_i}{T} + c_i \right)} \right) \times \frac{dp}{n_c} \right)} \cdot \exp \left[ -\frac{1}{2} \left( \frac{2,355 \cdot \left( t - \frac{\varepsilon l \pi r^2}{d} \cdot \left( 1 + e^{\left( a_i \cdot \phi_{S,org} + \frac{b_i}{T} + c_i \right)} \right) \right)}{\left( A \times \frac{\varepsilon l \pi r^2}{d} \cdot \left( 1 + e^{\left( a_i \cdot \phi_{S,org} + \frac{b_i}{T} + c_i \right)} \right) \times \frac{dp}{n_c} \right)_i} \right)^2 \right]$$

Dans la feuille de calcul, chaque produit a sa propre colonne et la colonne **signal** est la somme de chaque fonction :

$$\text{Signal}(t) = \sum_i f_i(t)$$

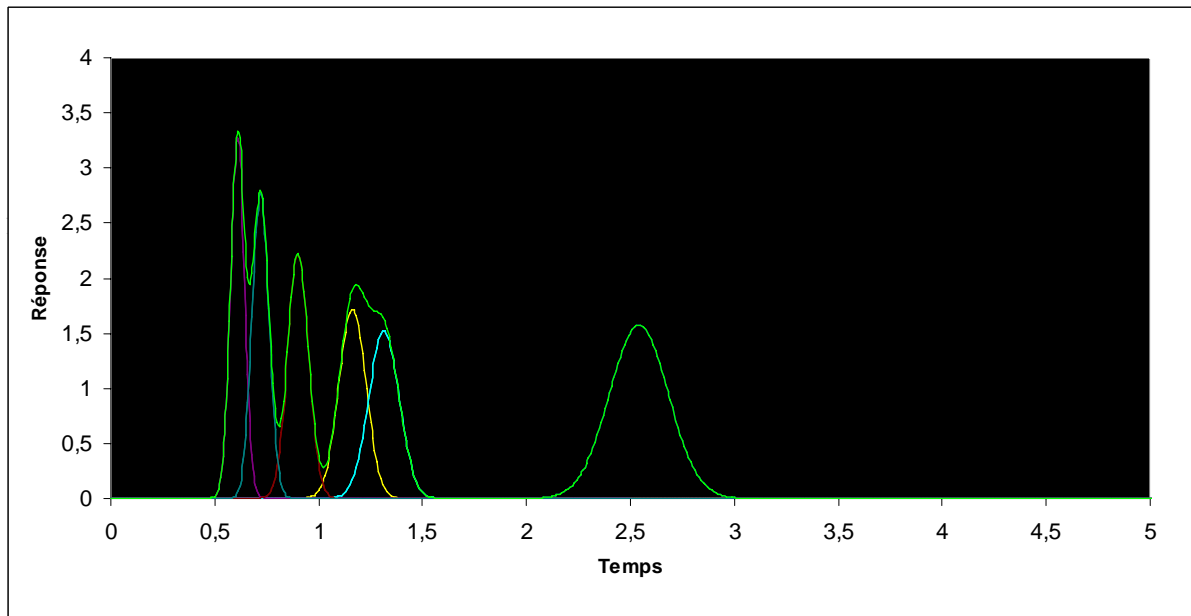
Temps	Phénol	Adénine	Thymine	Cytosine	Guanine	Uracile	Signal
0	0	0	0	0	0	0	0
0,01	0	0	0	0	0	0	0

Pour des raisons de lisibilité, nous avons choisi de faire figurer, sur le graphique de la feuille « calculs », séparément chaque fonction et le signal.



## Note

Sur la feuille de saisie, il est possible de visualiser les différents pics qui contribuent au signal :



$$f_i(t) = \frac{0,94}{\left( A \times \frac{\varepsilon l \nu^2}{d} \cdot \left( 1 + e^{\left( a_i \cdot \phi_{S,org} + \frac{b_i}{T} + c_i \right)} \right) \times \frac{dp}{n_c} \right)} \cdot \exp \left[ -\frac{1}{2} \frac{\left( 2,355 \cdot \left( t - \frac{\varepsilon l \nu^2}{d} \cdot \left( 1 + e^{\left( a_i \cdot \phi_{S,org} + \frac{b_i}{T} + c_i \right)} \right) \right) \right)^2}{\left( \left( A \times \frac{\varepsilon l \nu^2}{d} \cdot \left( 1 + e^{\left( a_i \cdot \phi_{S,org} + \frac{b_i}{T} + c_i \right)} \right) \right) \times \frac{dp}{n_c} \right)_i} \right]$$

## Annexe I. Isothermes de van't Hoff

Le modèle que nous utilisons permettant de relier le facteur de rétention à la température et la proportion de solvant organique est :

$$\ln(k'_i) = a_i \cdot \phi_{S.org.} + \frac{b_i}{T} + c_i.$$

Cette équation peut aussi se mettre sous la forme suivante :

$$f_i(t) = \frac{0,94}{\left( A \times \frac{\varepsilon l \nu^2}{d} \cdot \left( 1 + e^{\left( a_i \cdot \phi_{S.org.} + \frac{b_i}{T} + c_i \right)} \right) \times \frac{dp}{n_c} \right)} \cdot \exp \left[ \frac{1}{2} \frac{\left( 2,355 \cdot \left( t - \frac{\varepsilon l \nu^2}{d} \cdot \left( 1 + e^{\left( a_i \cdot \phi_{S.org.} + \frac{b_i}{T} + c_i \right)} \right) \right) \right)^2}{\left( A \times \frac{\varepsilon l \nu^2}{d} \cdot \left( 1 + e^{\left( a_i \cdot \phi_{S.org.} + \frac{b_i}{T} + c_i \right)} \right) \times \frac{dp}{n_c} \right)_i} \right]$$

Elle porte alors le nom d'isotherme de van't Hoff. Elle permet de déterminer les valeurs de l'enthalpie, de l'entropie et de l'enthalpie libre et donc de la constante thermodynamique associée au phénomène de rétention, comme l'illustre les calculs suivants :

	$k'$ calculé	4,5	1,2	1,5	0,06	0,62	0,28
10	$w_{1/2}$	0,05	0,044	0,018	0,02	0,009	0,013
11	$k'$	4,50	1,20	1,50	0,06	0,62	0,28
12	$\Delta H^{\circ}_{assoc} / \text{kJ.mol}^{-1}$	-22,80	-14,38	-13,75	-14,38	-9,45	-12,15
13	$\Delta S^{\circ}_{assoc} / \text{J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$	11,40	2,75	7,26	0,00	1,03	0,00
14	$\Delta G^{\circ}_{assoc} / \text{kJ.mol}^{-1}$	-26,26	-15,21	-15,95	-14,38	-9,76	-12,15
15	$\lg K^{\circ}$	4,53	2,62	2,75	2,48	1,68	2,10

$$f_i(t) = \frac{0,94}{\left( A \times \frac{\varepsilon l \nu^2}{d} \cdot \left( 1 + e^{\left( a_i \cdot \phi_{S.org.} + \frac{b_i}{T} + c_i \right)} \right) \times \frac{dp}{n_c} \right)} \cdot \exp \left[ -\frac{1}{2} \frac{\left( 2,355 \cdot \left( t - \frac{\varepsilon l \nu^2}{d} \cdot \left( 1 + e^{\left( a_i \cdot \phi_{S.org.} + \frac{b_i}{T} + c_i \right)} \right) \right) \right)^2}{\left( A \times \frac{\varepsilon l \nu^2}{d} \cdot \left( 1 + e^{\left( a_i \cdot \phi_{S.org.} + \frac{b_i}{T} + c_i \right)} \right) \times \frac{dp}{n_c} \right)_i} \right]$$