

# Simulations de chromatogrammes en CLHP

## II. Simulation complète, version 2.1

---

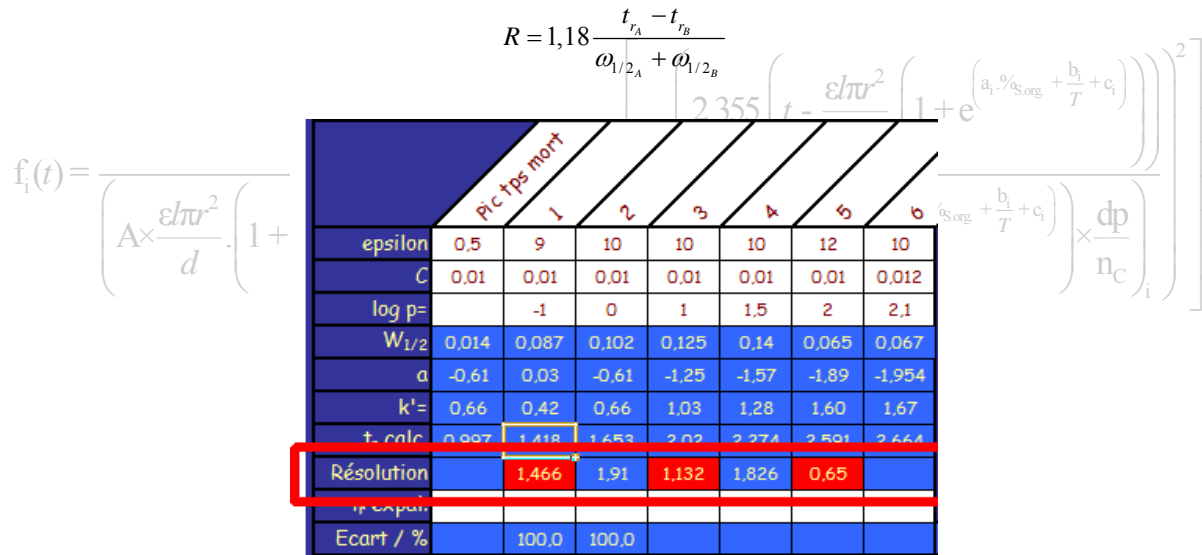
Ce document illustre la feuille de calcul *simulation\_clhp\_v2.1.xls*. Celle-ci permet de simuler des chromatogrammes ainsi que mettre en évidence l'influence des différents facteurs sur une séparation en CLHP. Cette simulation fonctionne en phase inverse et est applicable à n'importe quelle espèce.

Le principe de la simulation repose d'une part sur le paramétrage de la colonne et de l'éluant et de la nature des constituants du mélange à analyser. La première partie ayant déjà été traitée, nous insisterons sur la seconde.

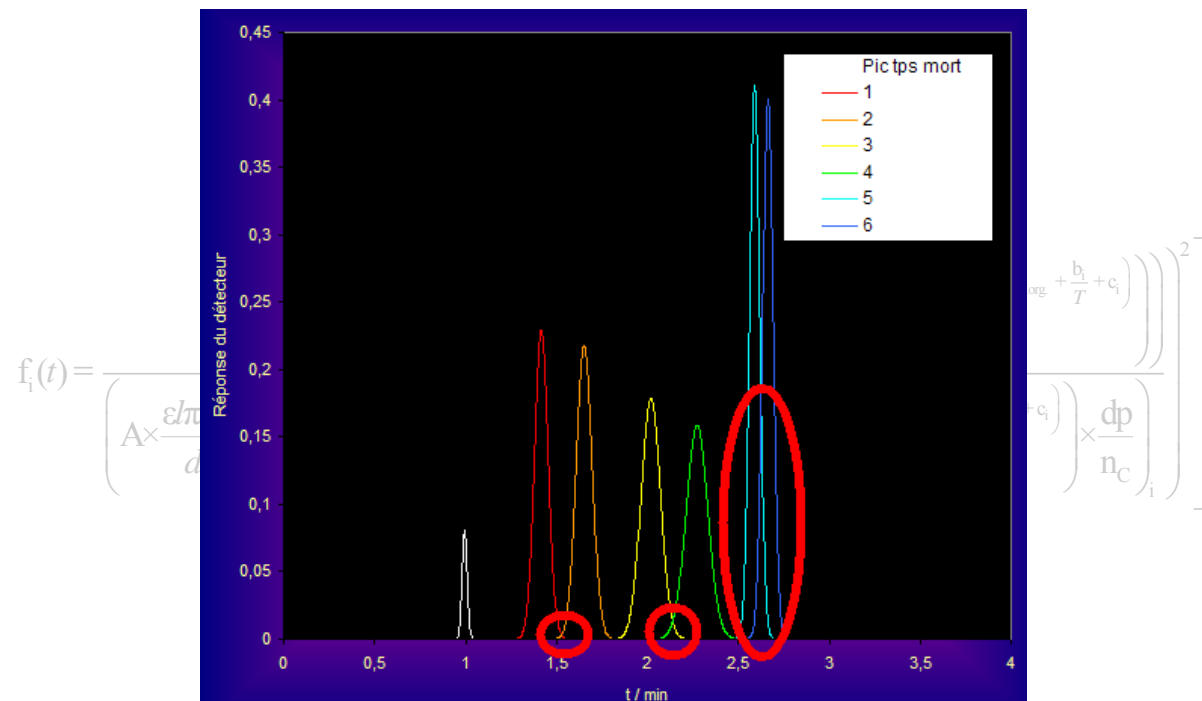
Nouveautés de la version 2.1.....	2
Nature de la modélisation.....	4
Feuille de calcul .....	5
Optimisation de la simulation .....	8
Optimisation de la séparation.....	8
Exemples d'applications .....	9
Mélange phénacétine, triphénylcarbinol, benzophénone et benzoate de méthyle .....	9
Mélange paracétamol, phénacétine et 4-nitrobenzoate d'éthyle .....	10
Mélange caféine, $\alpha$ -chlorodiméthylacétanilide, diméthylaniline et lidocaïne .....	11
Mélange paracétamol et hydrobenzoïne.....	12
Mélange 1,3-diphénylacétone, benzaldéhyde et tétracyclone.....	13
Mélange paracétamol et 1,3-dinitrobenzène .....	14
Mélange paracétamol, acide 2-aminobenzoïque et acide 2-chlorobenzoïque.....	15
Conclusion.....	16
Comment ça marche ? .....	16
Annexe I. Simulation des logP sous ChemsSketch v.10 (ACDLABS).....	17
Annexe II. Simulation des logP sous Spartan V.04 / 06 (Wavefunction).....	21
LogP par la méthode de Villar.....	21
LogP par la méthode Ghose, Pritchett et Crippen.....	22

## Nouveautés de la version 2.1.

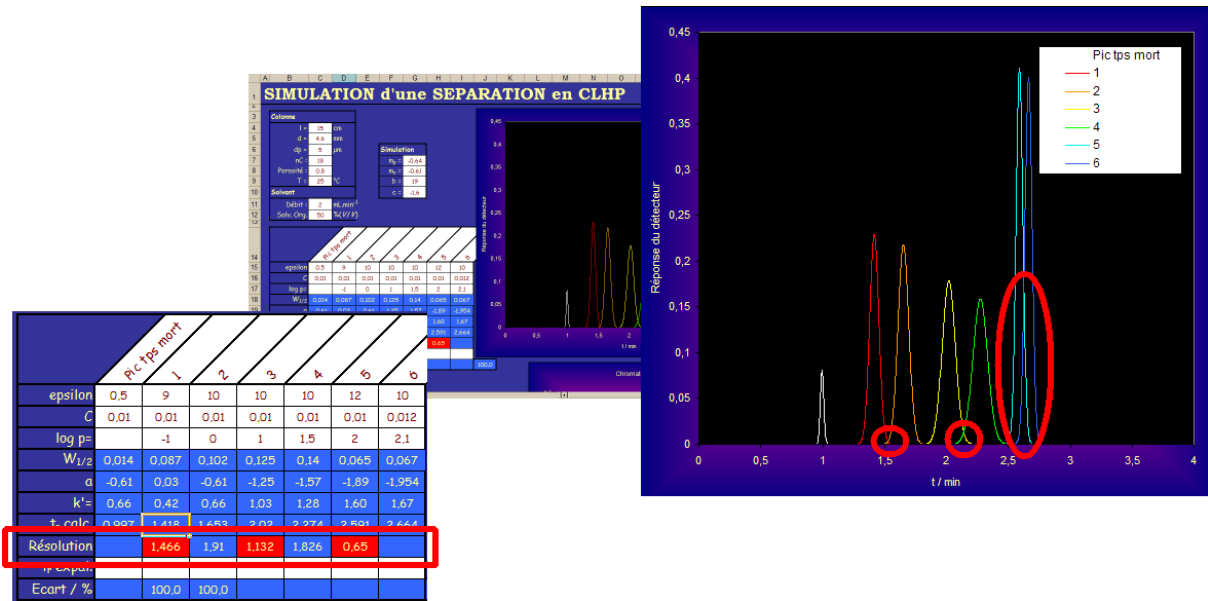
Sur la version *simulation\_clhp\_v2.1.xls*, une correction a été effectuée sur l'influence de la taille des particules. A été ajouté le calcul de la résolution<sup>1</sup> mettant en évidence l'éventuelle superposition des pics chromatographiques selon :



Ce coefficient vaut 1,5 si deux pics chromatographiques successifs sont accolés, est inférieur à 1,5 si les pics se chevauchent et supérieur à 1,5 si les pics sont correctement dissociés.



<sup>1</sup> Les calculs effectués sont valables seulement si les produits sont placés par priorité d'ordre de sortie.



Nous rappelons également que cette feuille de calcul ne prend pas en compte l'influence du débit sur la HEPT (hauteur équivalence en plateaux théoriques), et donc sur le nombre de plateaux théoriques. Une intégration de la courbe de Knox peut être envisagée.

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

## Nature de la modélisation

Simuler le temps de rétention d'un produit en CLHP n'a rien, *a priori*, de facile. De nombreux modèles ont été proposés, plus ou moins simples à mettre en œuvre. Nous avons choisi ici de modéliser la rétention à partir du logP, la constante de partage eau-octanol (voir plus loin).

Pour une molécule donnée, il y a deux façons de connaître le logP. Soit on le trouve dans un « Handbook », soit on le simule. Pour la simulation, nous avons testé trois approches et nous garderons les valeurs données par le logiciel *CHEMSKETCH* de chez ACDLABS<sup>2</sup>. Voir en Annexe I quelques exemples. Nous proposons également dans l'annexe 2 des simulations de logP par le logiciel *SPARTAN (wavefunction)*.

Nous avons vu précédemment que le temps de rétention  $t_{r,i}$  se calcule connaissant le temps mort  $t_m$  et le facteur de rétention,  $k'_i$  :

$$t_{r,i} = t_m \cdot (1 + k'_i)$$

Le temps mort dépend des caractéristiques de la colonne (**longueur**,  $l$ , **diamètre**,  $2r$ , **porosité**,  $\epsilon$ ) et du **débit** imposé par la pompe ( $d$ ) :

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

Le facteur de rétention dépend de la température et de la proportion d'éluant selon le modèle simplifié suivant :

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

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

$$f_i(t) = \frac{0,94 \cdot \exp\left(-\frac{\epsilon l \pi r^2}{d} \cdot \left(1 + e^{\left(a_i \cdot \ln(\phi_{S.org.}) + \frac{b_i}{T} + c_i\right)}\right)\right)}{\exp\left(-\frac{\epsilon l \pi r^2}{d} \cdot \left(1 + e^{\left(a_i \cdot \ln(\phi_{S.org.}) + \frac{b_i}{T} + c_i\right)}\right)\right) + \exp\left(-\frac{\epsilon l \pi r^2}{d} \cdot \left(1 + e^{\left(a_i \cdot \ln(\phi_{S.org.}) + \frac{b_i}{T} + c_i\right)}\right)\right)}$$

Nous avons considéré que le terme  $a_i$  est le plus « sensible » au logP<sub>i</sub> et que les valeurs de  $b_i$  et  $c_i$  seront considérées comme indépendantes du logP<sub>i</sub><sup>(3)</sup>.

Nous avons également choisi de faire varier linéairement  $a_i$  en fonction de logP<sub>i</sub> selon :

$$a_i = m_p \cdot \log P_i + m_o$$

<sup>2</sup> Chems sketch v.10, disponible sur : <http://www.acdlabs.com/download/chemsk.html>, consulté le 29/12/07. Le module permettant de calculer le logP se télécharge à : <http://www.acdlabs.com/download/logp.html>, consulté le 29/12/07.

Les deux autres logiciels utilisés ont été ChemDraw / ChemUltra (voir note 7) et Spartan (<http://www.wavefun.com/>, consulté le 29/10/07).

<sup>3</sup> Une analyse plus fine montre que le terme  $b$  varie assez peu avec logP, ce qui n'est pas le cas de  $c$ .

Le facteur de rétention se calcule donc par :

$$\ln(k'_i) = \left[ m_p \cdot \log P_i + m_o \right] \cdot \ln(\phi_{S.org.}) + \frac{b}{T} + c$$

La détermination des paramètres  $m_p$ ,  $m_o$ ,  $b$  et  $c$  est ici purement empirique<sup>4</sup>. L'analyse de nombreux chromatogrammes amène à proposer comme valeurs de départ :

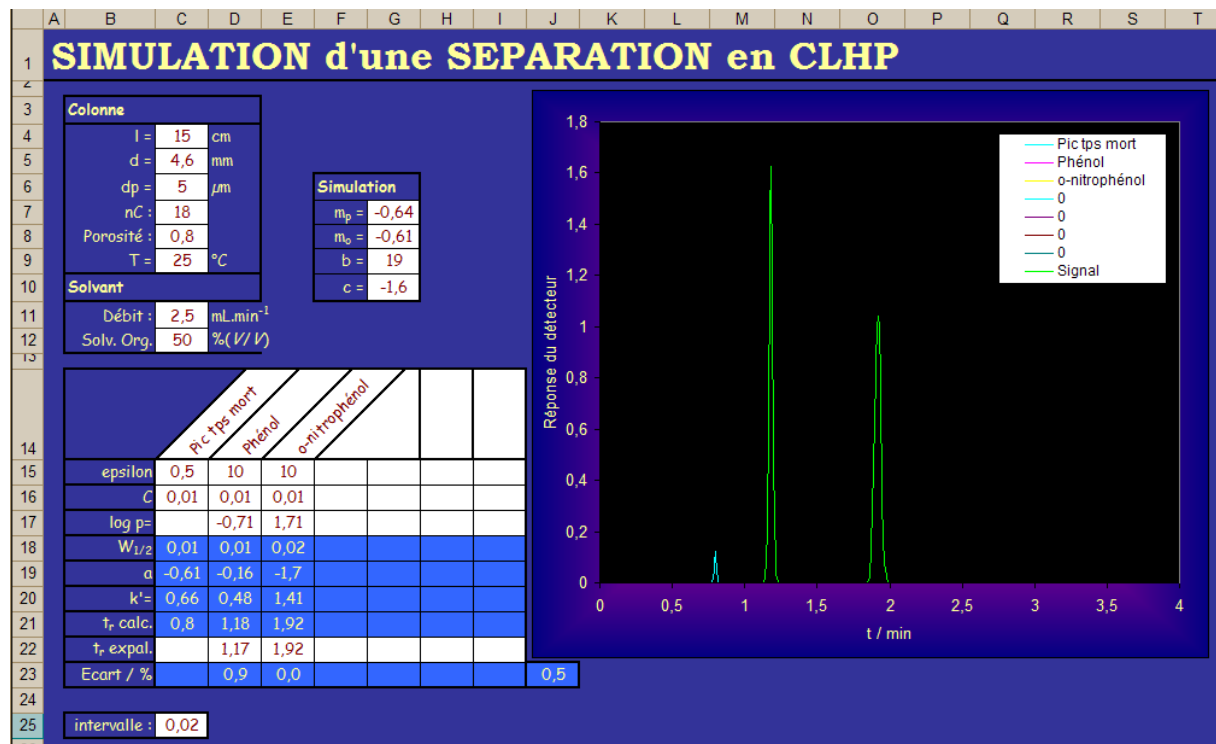
$$m_p = -0,64, \quad m_o = -0,61, \quad b = 19, \quad c = -1,6.$$

Ces valeurs sont bien sûr modifiables sur la feuille de calcul.

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

## Feuille de calcul

Elle prend la forme suivante :



Le mélange de cet exemple est constitué de phénol et d'*o*-nitrophénol. Les cases colorées en blanc sont modifiables, et les valeurs figurant dans les cases bleues résultent d'un calcul.

<sup>4</sup> Une analyse théorique est envisageable mais dépasse très largement le cadre de l'enseignement de niveau Bac + 2.

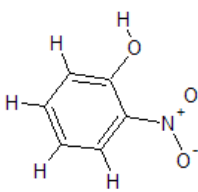
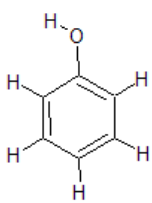
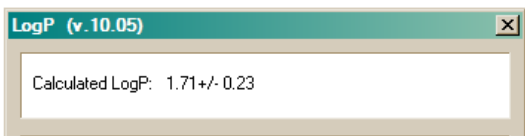
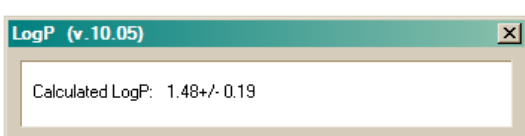
Il est possible de paramétrer la colonne et l'éluant<sup>5</sup> :

Colonne		
l =	15	cm
d =	4,6	mm
dp =	5	µm
nC :	18	
Porosité :	0,8	
T =	25	°C
Solvant		
Débit :	2,5	mL.min <sup>-1</sup>
Solv. Org.	50	%(V/V)

ainsi que pour les produits, leur concentration, leur coefficient de réponse et bien sûr les logP<sub>i</sub> simulés dans Chems sketch :

	Pic tps mort	Phénol	o-nitrophénol			
epsilon	0,5	10	10			
C	0,01	0,01	0,01			
log p=		-0,71	1,71			

### Simulations des logP<sub>i</sub> sous Chems sketch

<u>o</u> -nitrophénol	Phénol
	
	

Nous proposons par défaut les valeurs du paramétrage :

Simulation	
m <sub>p</sub> =	-0,64
m <sub>o</sub> =	-0,61
b =	19
c =	-1,6

<sup>5</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.

La feuille calcule les facteurs de rétention ainsi que le temps de rétention

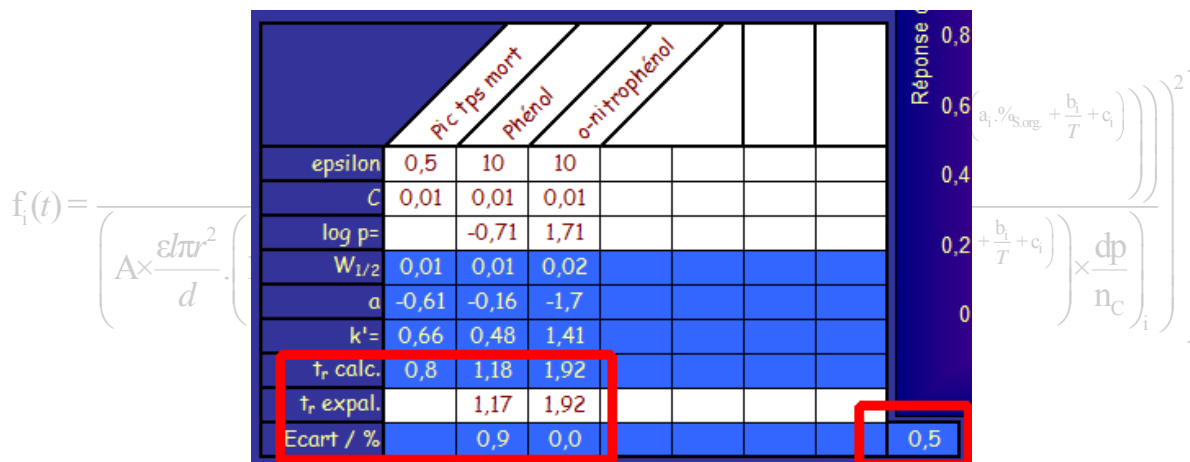
	Pic tps mort	Phénol	o-nitrophénol					Réponse
epsilon	0,5	10	10					0,8
C	0,01	0,01	0,01					0,6
log p=		-0,71	1,71					0,4
W <sub>1/2</sub>	0,01	0,01	0,02					0,2
a	-0,61	-0,16	-1,7					0
k'	0,66	0,48	1,41					
t <sub>r</sub> calc.	0,8	1,18	1,92					
t <sub>r</sub> expai.		1,17	1,92					
Ecart / %		0,9	0,0					0,5

Le tableau de calcul commence à la ligne 27. Le paramètre d'intervalle permet d'ajuster le graphique.

	Temps / min	Pic tps mort	Phénol	o-nitrophénol					Signal
24									
25	intervalle :	0,02							
26									
27	0	0	0	0					0
28	0,015	0	0	0					0
29	0,03	0	0	0					0
30	0,045	0	0	0					0
31	0,06	0	0	0					0
32	0,075	0	0	0					0
33	0,09	0	0	0					0
34	0,105	0	0	0					0
35	0,12	0	0	0					0
36	0,135	0	0	0					0
37	0,15	0	0	0					0
38	0,165	0	0	0					0
39	0,18	0	0	0					0
40	0,195	0	0	0					0
41	0,21	0	0	0					0
42	0,225	0	0	0					0
43	0,24	0	0	0					0
44	0,255	0	0	0					0
45	0,27	0	0	0					0
46	0,285	0	0	0					0
47	0,3	0	0	0					0
48	0,315	0	0	0					0
49	0,33	0	0	0					0
50									

## Optimisation de la simulation

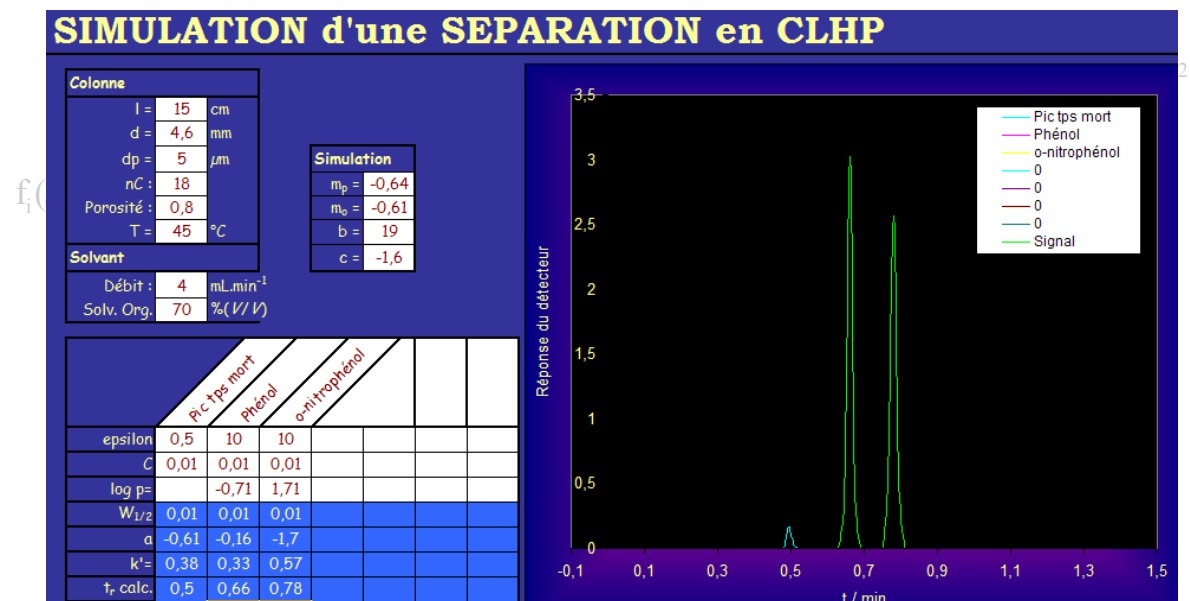
Il est possible, si on possède des chromatogrammes expérimentaux de calculer l'écart relatif entre les temps de rétention expérimentaux et les temps de rétention simulés :



Ici, l'écart est de 0,9 % pour le phénol et de 0,0 % pour l'*o*-nitrophénol, soit une moyenne arrondie de 0,5%.

## Optimisation de la séparation

Une fois les paramètres  $m_p$ ,  $m_o$ ,  $b$  et  $c$  validés, il est possible d'optimiser la séparation. Dans l'exemple qui suit, le temps d'analyse est passé de 2 min à 0,8 min<sup>6</sup> en augmentant la température de 25 à 45°C, le débit de 2,5 à 4 mL.min<sup>-1</sup> et la proportion de solvant organique de 50 à 70 %.

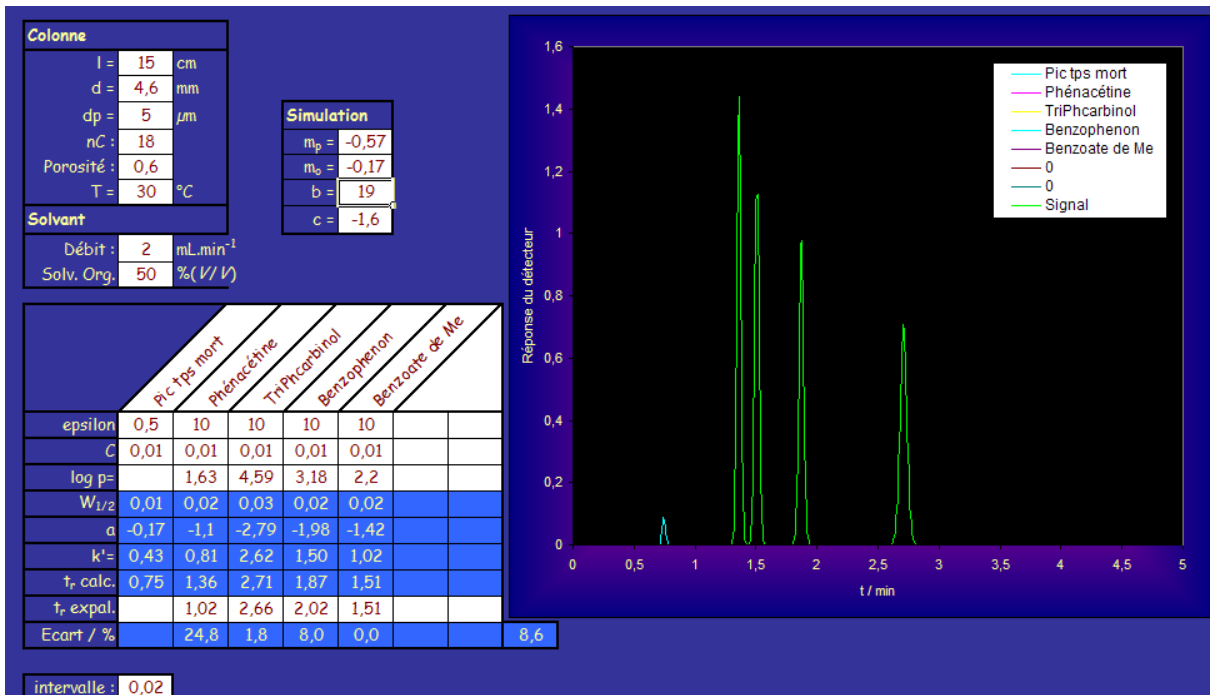
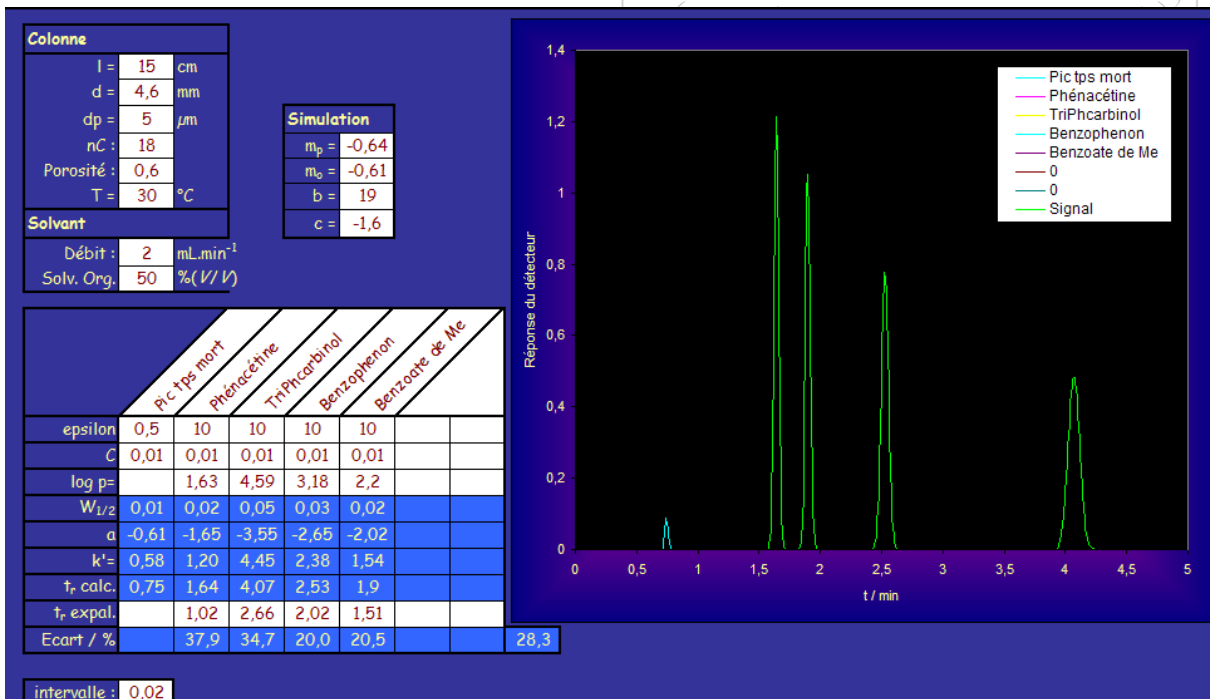


<sup>6</sup> Ces paramètres d'optimisation, notamment la température et le débit, sont exploitables selon les caractéristiques du matériel.

# Exemples d'applications

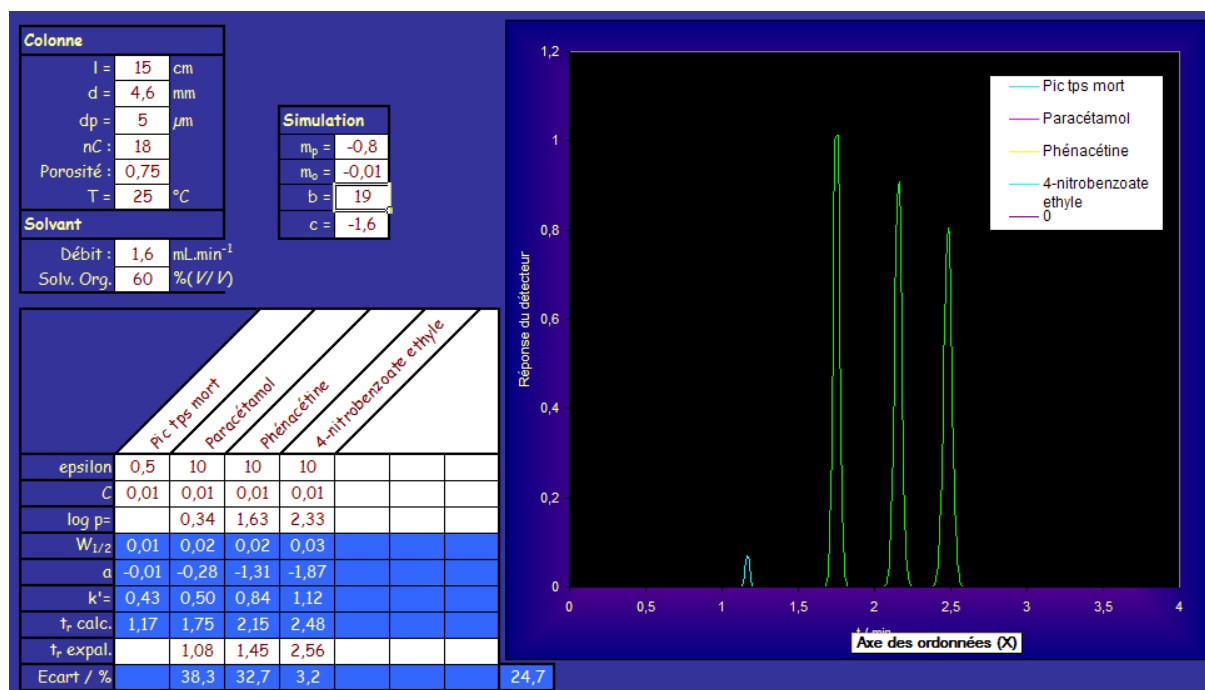
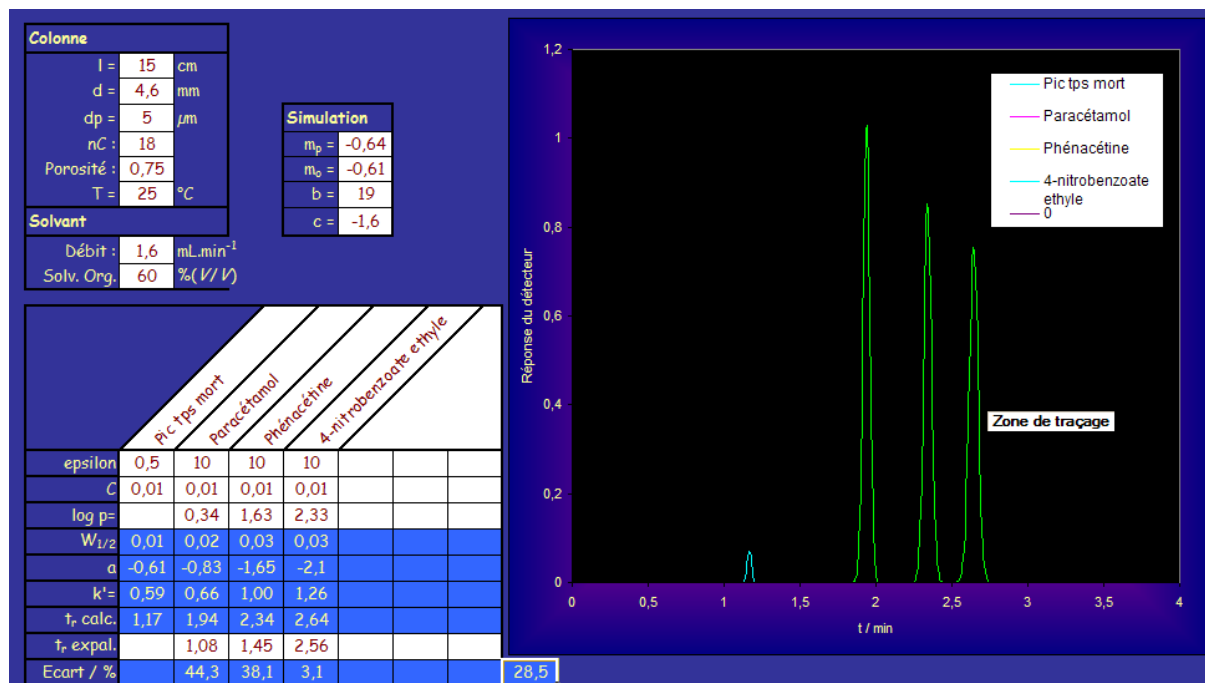
## Mélange phénacétine, triphénylcarbinol, benzophénone et benzoate de méthyle

Avec les paramètres par défaut, l'écart moyen est de 28 %. En affinant, on tombe à 9%.



## Mélange paracétamol, phénacétine et 4-nitrobenzoate d'éthyle

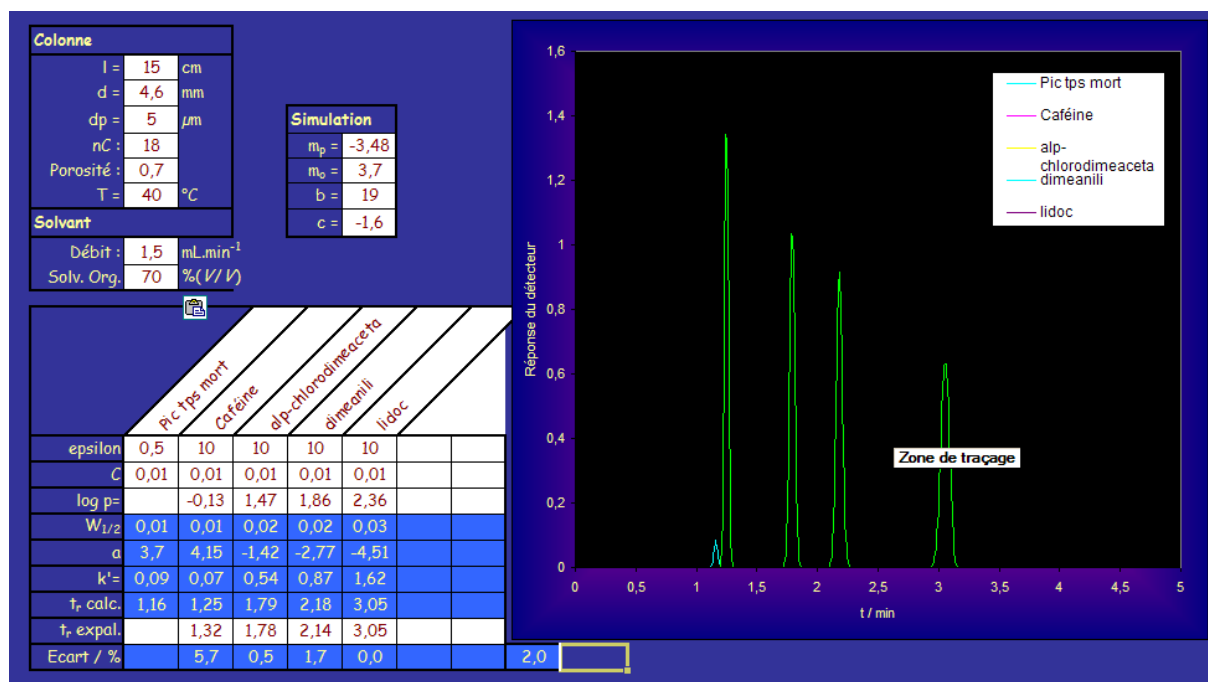
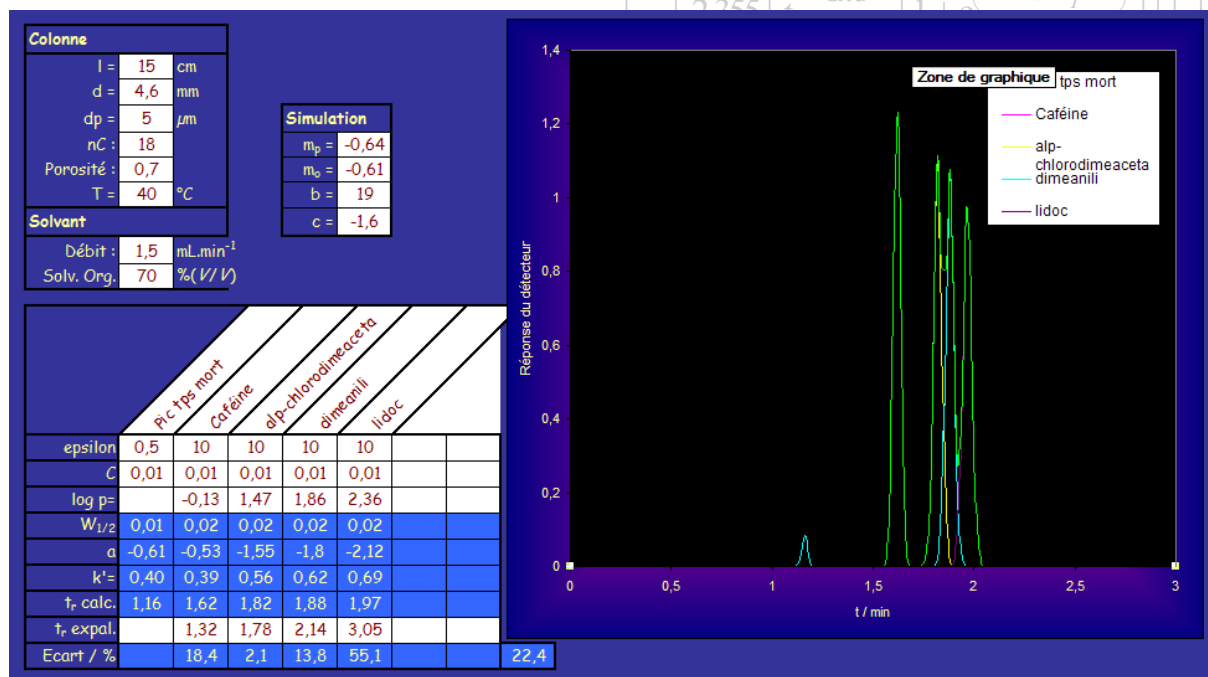
Avec les paramètres par défaut, l'écart moyen est de 29 %. En affinant, on baisse difficilement à 25 %.



## Mélange caféine, $\alpha$ -chlorodiméthylacétanilide, diméthylaniline et lidocaïne

Avec les paramètres par défaut, l'écart moyen est de 22 %. En affinant, on tombe à 2 %.

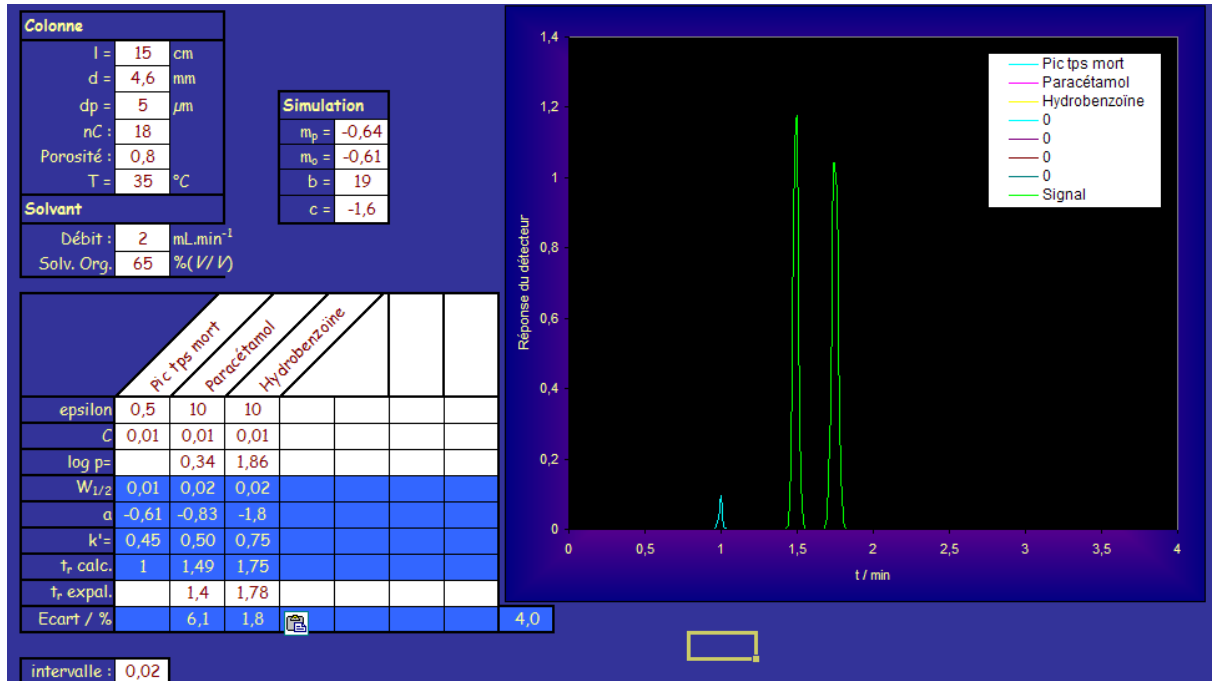
Notons ici que le logP de l' $\alpha$ -chlorodiméthylacétanilide calculé par Chemskech est de 2,55. En utilisant un autre logiciel (ChemUltra, de chez CambridgeSoft<sup>7</sup>), on obtient 1,47. On a gardé cette valeur.



<sup>7</sup> <http://www.cambridgesoft.com/>, consulté le 29/12/2007.

## Mélange paracétamol et hydrobenzoïne

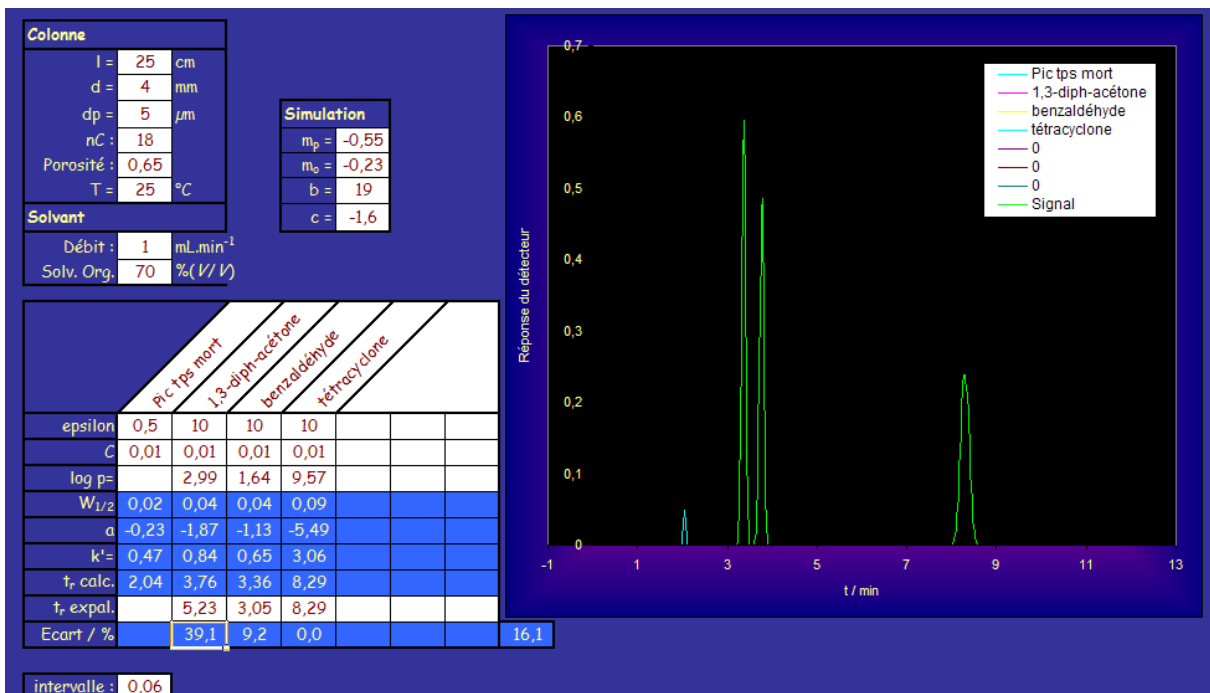
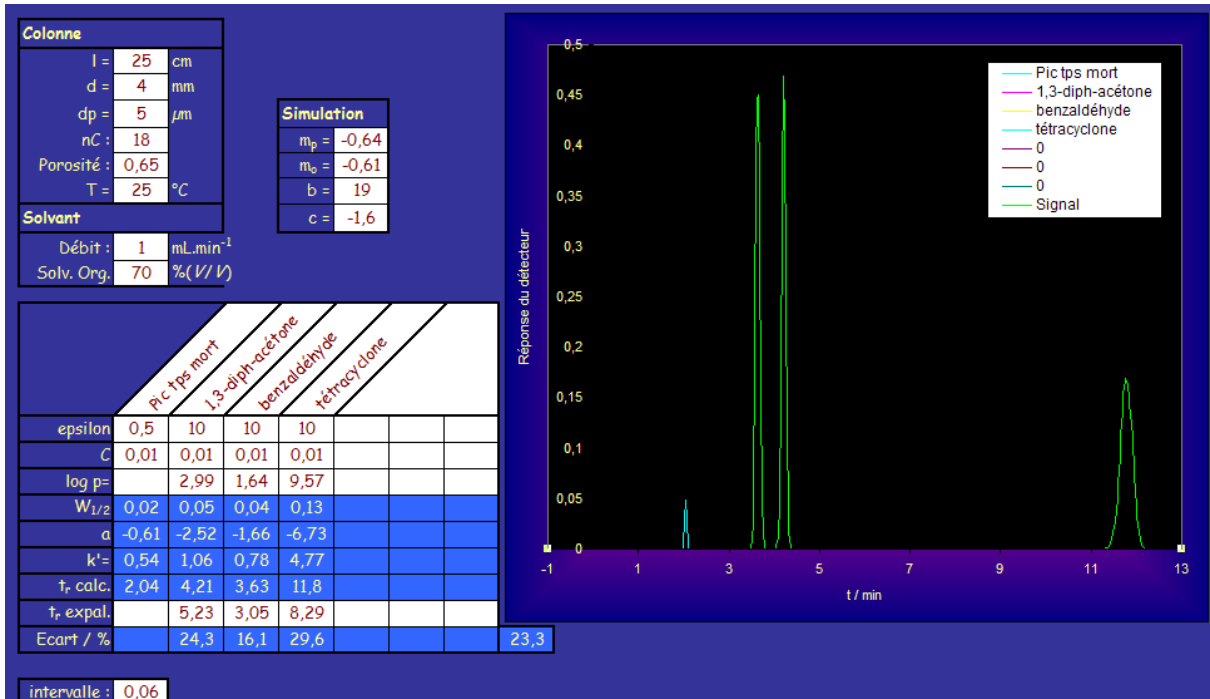
Avec les paramètres par défaut, l'écart moyen est de 4 %. Il n'est donc pas nécessaire d'affiner.



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

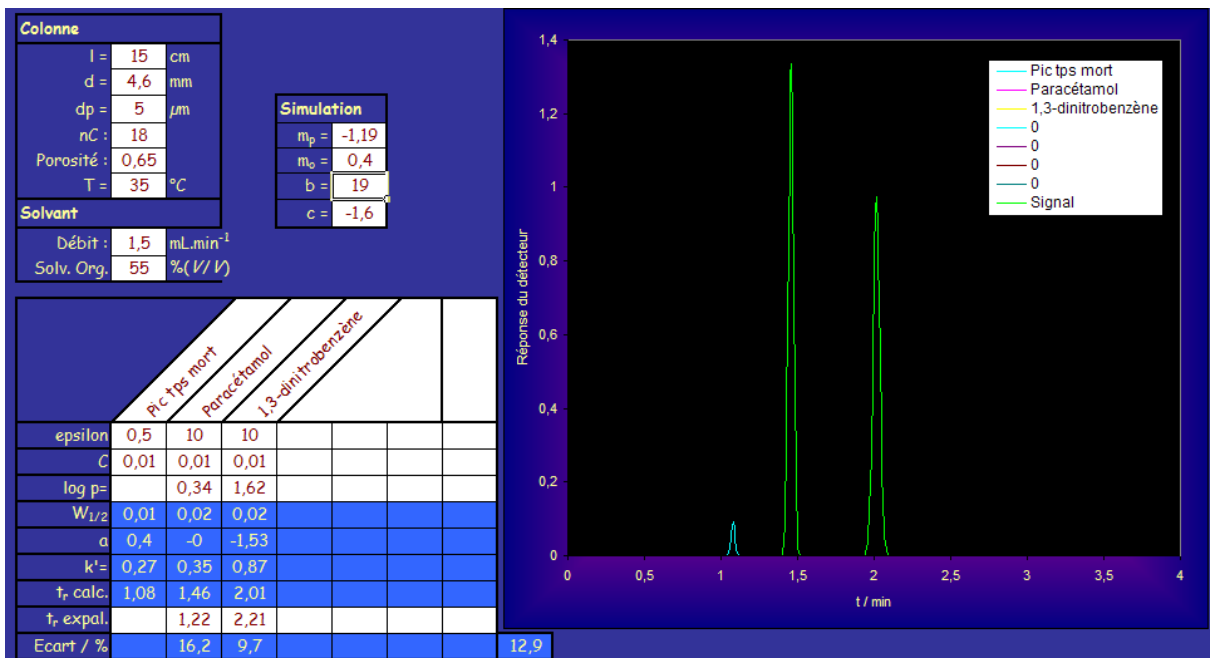
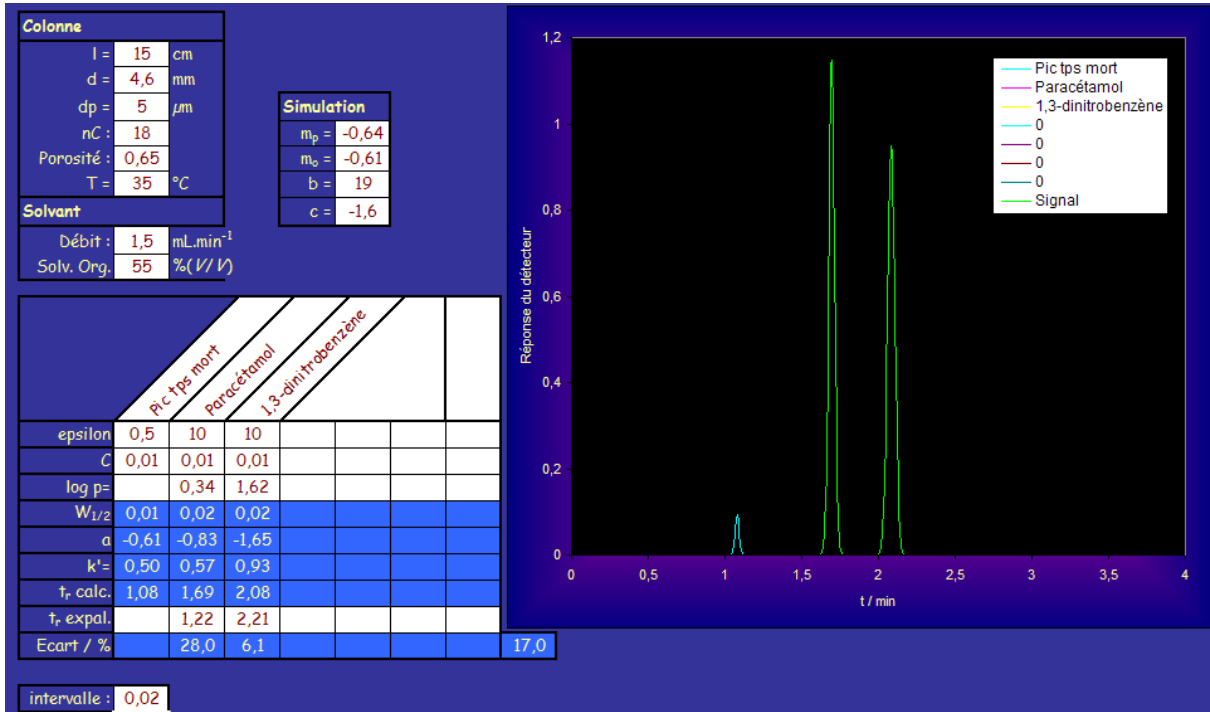
## Mélange 1,3-diphénylacétone, benzaldéhyde et tétracyclone

Avec les paramètres par défaut, l'écart moyen est de 23 %. En affinant, on tombe à 16%, ce qui reste important.



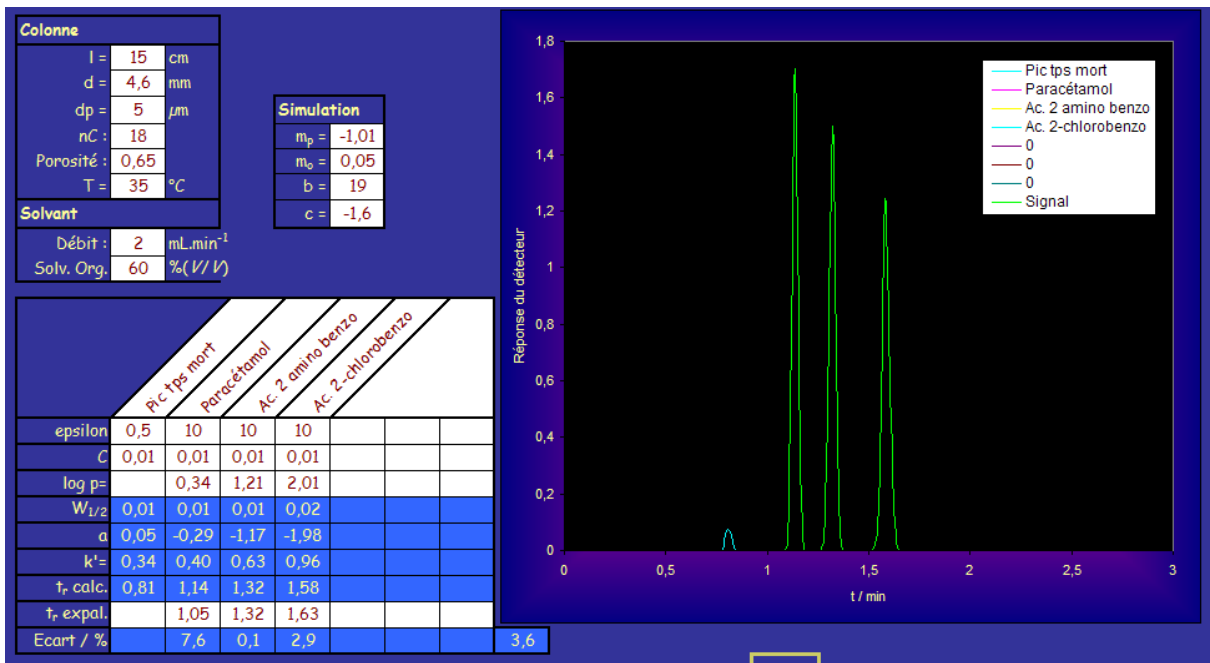
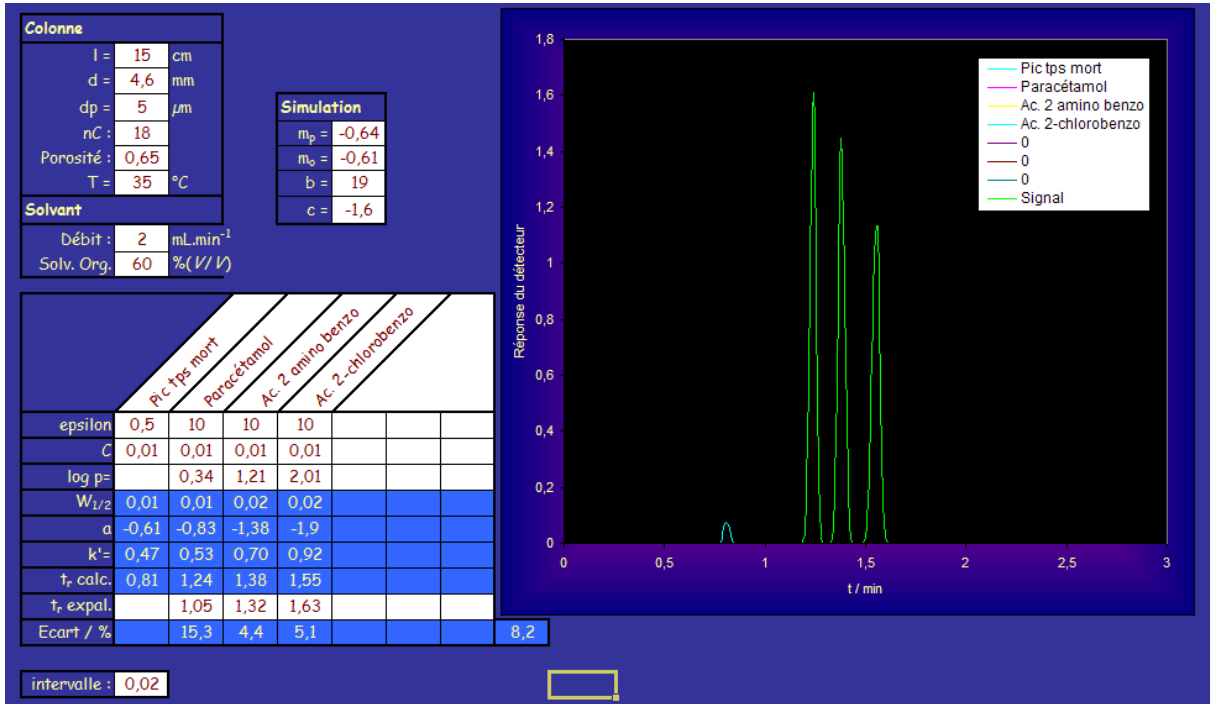
## Mélange paracétamol et 1,3-dinitrobenzène

Avec les paramètres par défaut, l'écart moyen est de 17 %. En affinant, on tombe à 13 %.



# Mélange paracétamol, acide 2-aminobenzoïque et acide 2-chlorobenzoïque

Avec les paramètres par défaut, l'écart moyen est de 8 %. En affinant, on tombe à 4 %.



## Conclusion

Quelle utilisation peut-on faire de cette feuille de calcul ? Même si les valeurs sont grossières, cette feuille permet de simuler l'ordre de sortie des produits et les temps de rétention à  $\pm 20\%$ . L'approche quantitative n'est pas abordée ici et une nouvelle feuille de calcul intégrant l'analyse des chromatogrammes (calcul de la résolution, méthode de l'étalon interne, des ajouts dosés etc.) peut être envisagée.

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

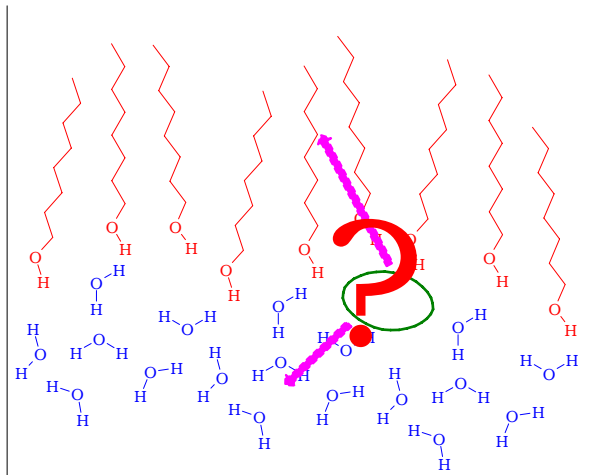
**Comment ça marche ?**

Les calculs sont basées sur le « logP », la constante de partage eau-octanol définie

$$\text{par : } P_i = \frac{C_{i,\text{octanol}}}{C_{i,\text{eau}}}$$

Cette caractéristique physico-chimique permet de mettre en évidence le caractère plus ou moins lipophile d'une espèce.

En effet, un logP positif met en évidence une espèce lipophile ( $\log P_i = 4$  signifiant  $C_{i,\text{octanol}} = 10\,000 \times C_{i,\text{eau}}$ ).



De même, un logP négatif met en évidence une espèce plutôt hydrophile

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

# Annexe I. Simulation des logP sous ChemsSketch v.10 (ACDLABS)

ACD/ChemSketch Freeware - [noname01.sk2]

File Edit Pages Tools Templates Options Documents Add-Ons I-Lab ACD/Labs Help

Structure Draw [Icons] 100% [Icons] PubChem eMolecules LogP

mm 0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230

LogP (v. 10.05)

Calculated LogP: 2.39 +/- 0.24

Interested how this value was calculated? Want to compare it with experimental data?

[Learn more about ACD/LogP DB](#)

Does your compound contain ionizable groups? You should consider using the pH dependent octanol-water distribution coefficient, logD

[Learn more about ACD/LogD](#)

Visit our Web site: [www.acdlabs.com](http://www.acdlabs.com)

Ok

ChemSketch Database ChemCoder

I-Lab Login NONAME01.SK2 Modified Page 1/1 Sel. Fragments: 1 C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub> FW: 153.13538 Formula Weight

Adénine

LogP (v. 10.05)

Calculated LogP: -0.03 +/- 0.27

LogP (v. 10.05)

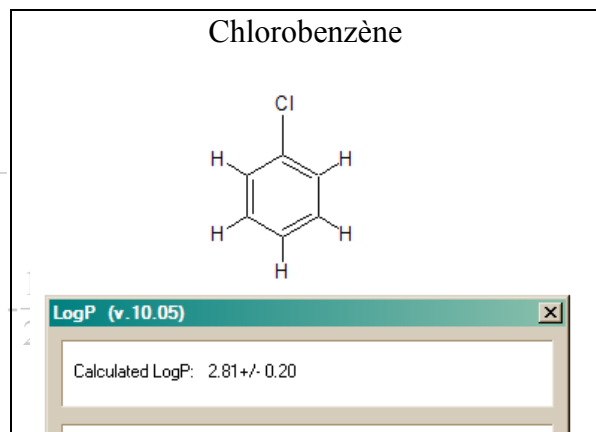
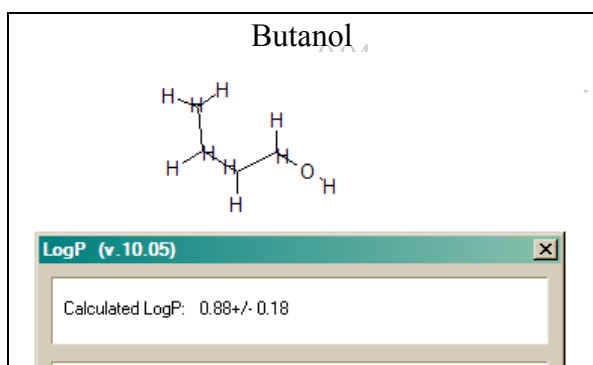
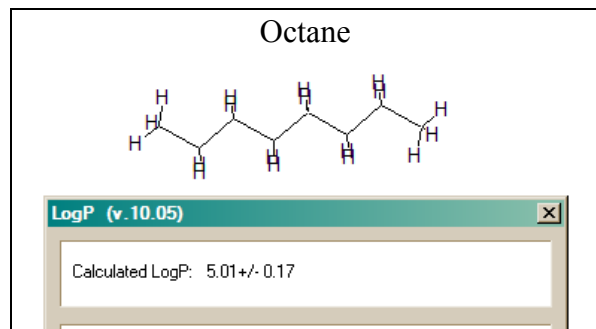
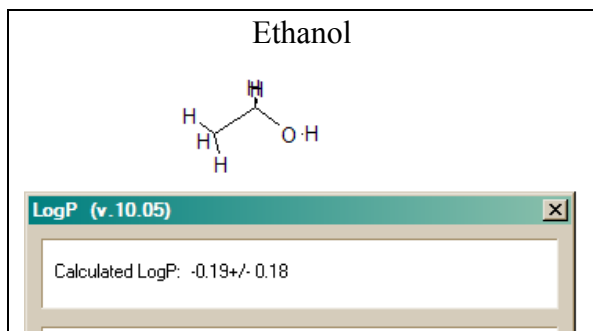
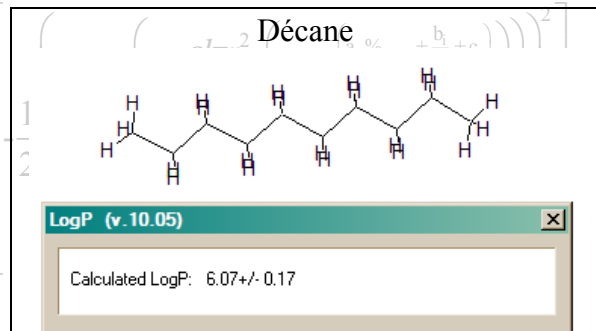
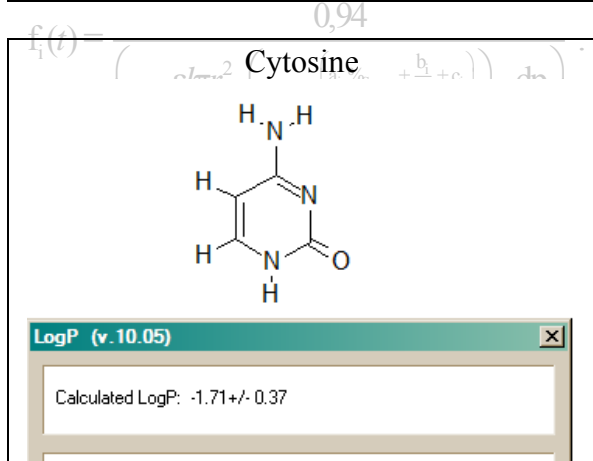
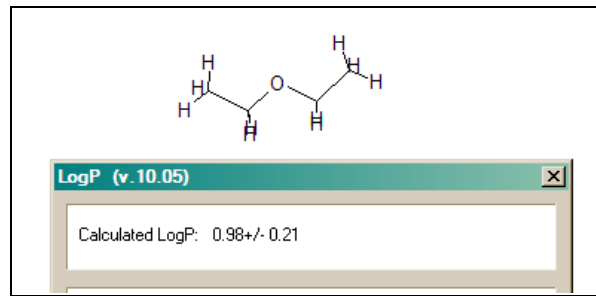
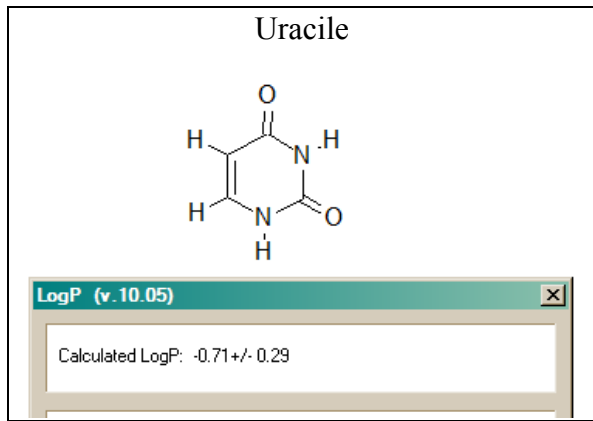
Calculated LogP: -0.12 +/- 0.29

Guanine

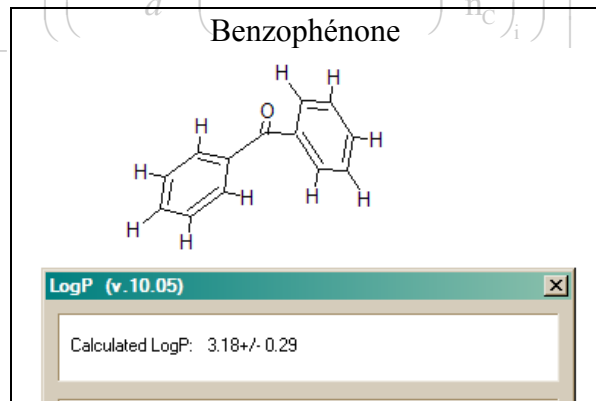
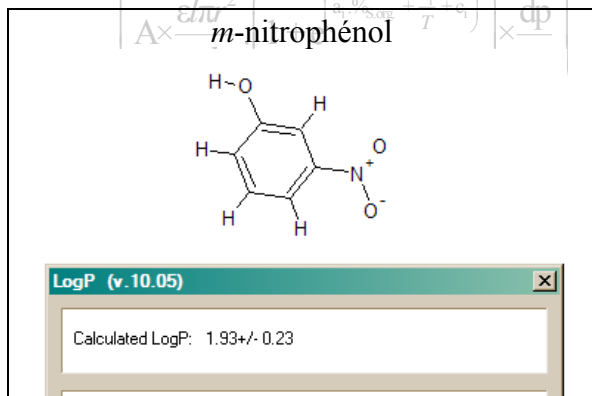
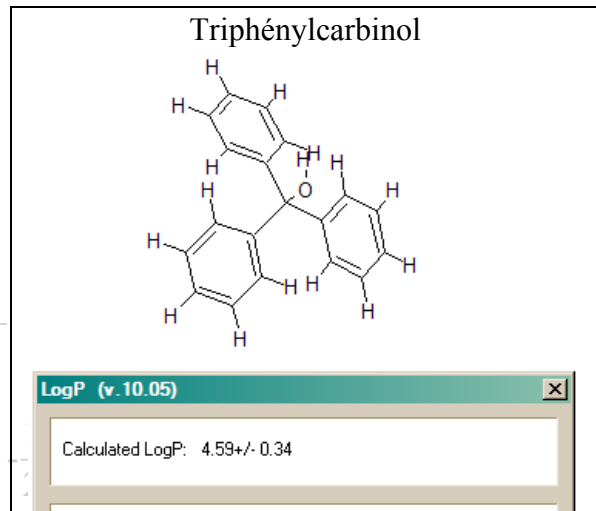
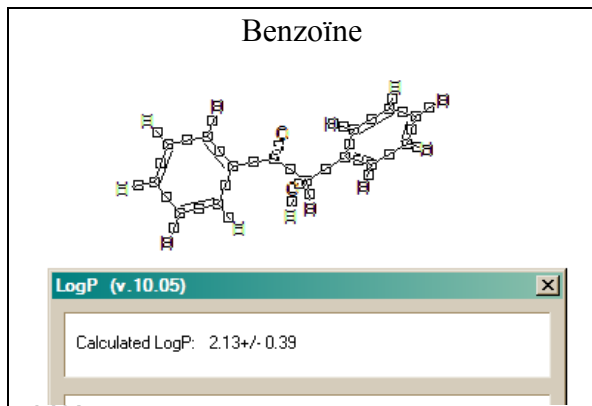
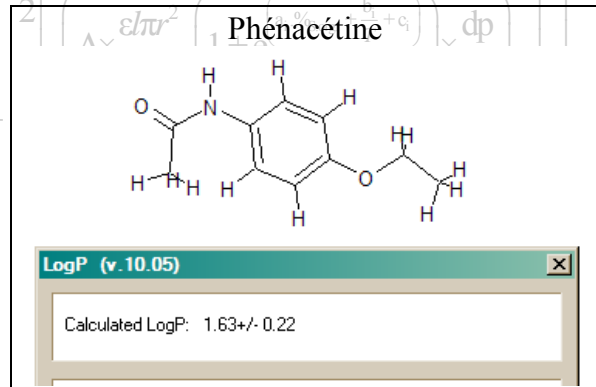
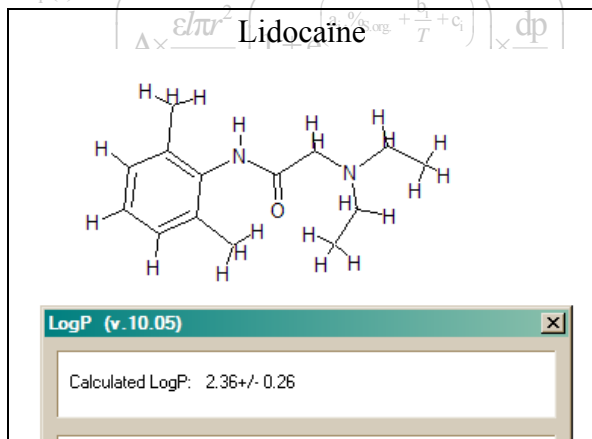
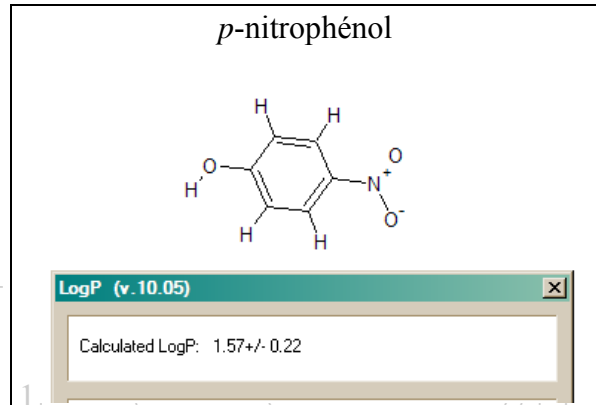
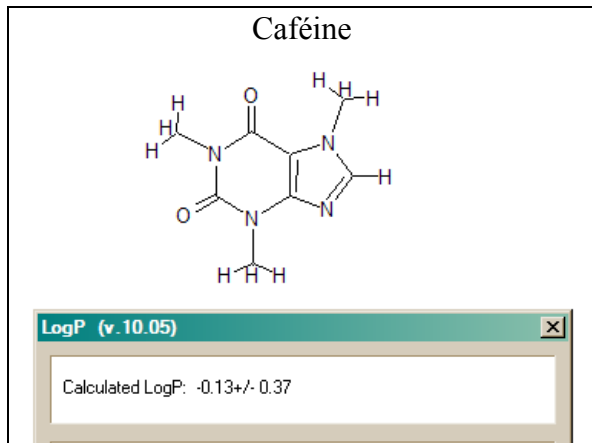
LogP (v. 10.05)

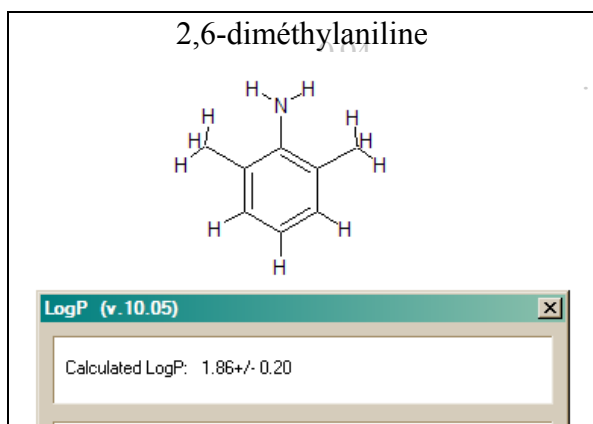
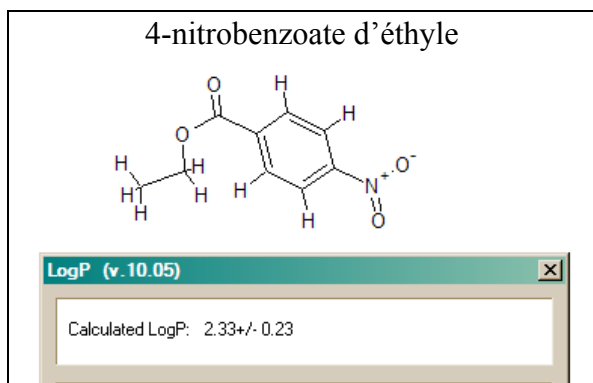
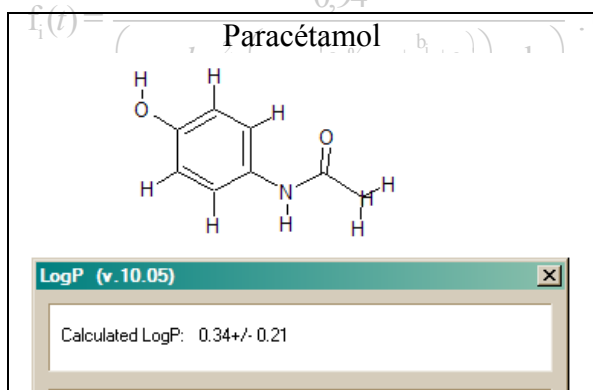
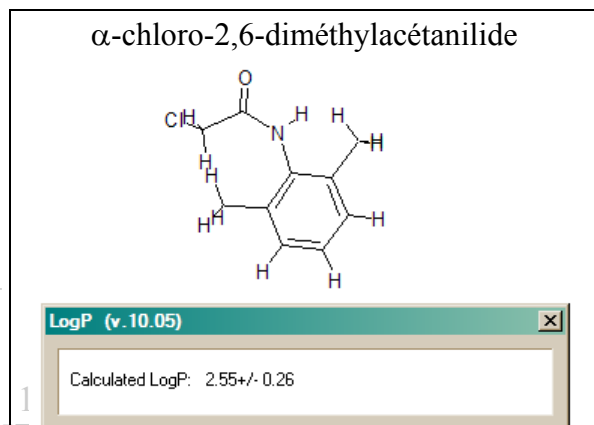
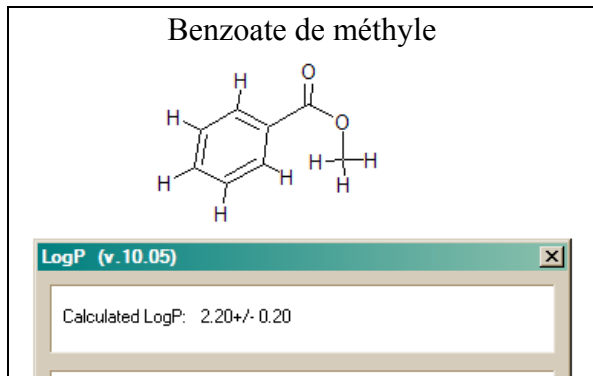
Calculated LogP: -0.98 +/- 0.38

Thymine



**Ether**



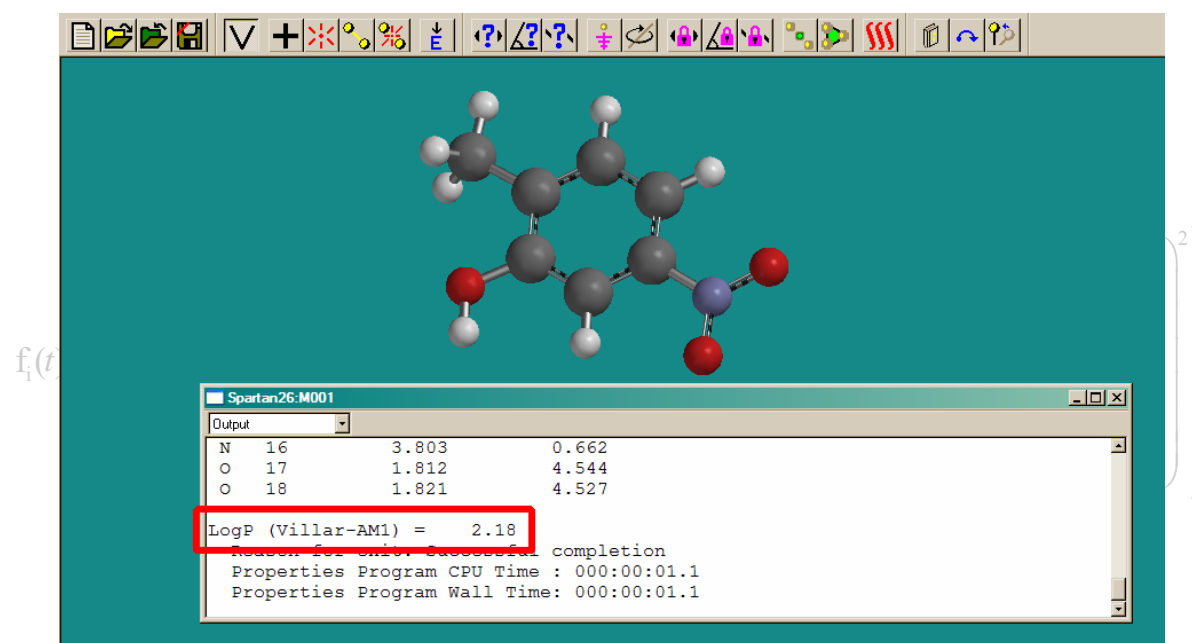
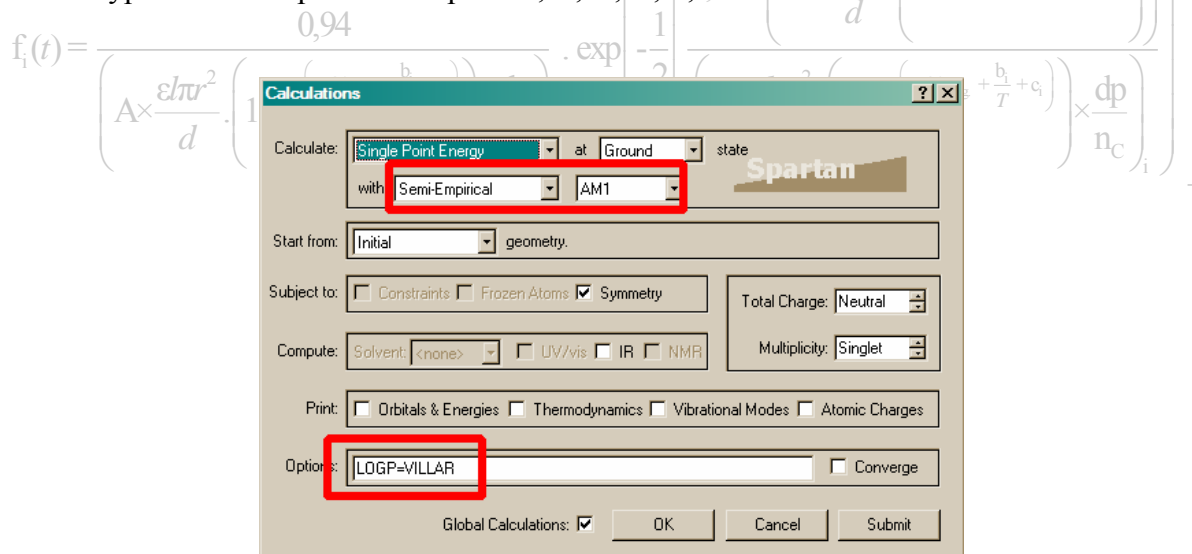


$$f_1(t) = \frac{1}{2} \exp \left[ \frac{1}{2} \left( \frac{2,355 \cdot \left( t - \frac{\epsilon l \pi^2}{d} \cdot \left( 1 + e^{\left( a_1 \cdot \%S_{org} + \frac{b_1}{T} + c_1 \right)} \right) \right)^2}{\left( A \times \frac{\epsilon l \pi^2}{d} \cdot \left( 1 + e^{\left( a_1 \cdot \%S_{org} + \frac{b_1}{T} + c_1 \right)} \right) \right) \times \frac{dp}{n_C} \right)_i} \right]$$

## Annexe II. Simulation des logP sous Spartan V.04 / 06 (Wavefunction)

### LogP par la méthode de Villar

La méthode de Villar<sup>8</sup> est disponible en semi-empirique (AM1), et ne tient pas compte des OA de type d. Elle est paramétrée pour H, C, N, O, F, S et Cl.



<sup>8</sup> Ibon Alkorta, Hugo O. Villar, *Int. J. Quant. Chem.* Vol. 44, 203-218 (1992), Angelina Kantola, Hugo O. Villar, Gilda H. Loew, *J. Comp. Chem.* vol. 12, No. 6, 681-689 (1991)

## LogP par la méthode Ghose, Pritchett et Crippen

La méthode de Ghose-Crippen<sup>9</sup> fonctionne quelque soit le mode de calcul (mécanique moléculaire, semi-empirique, Hartree-Fock, DFT etc.).

The screenshot displays the Spartan software interface. On the left, a 3D ball-and-stick model of a molecule is shown. On the right, the 'Calculations' dialog box is open, showing the following settings:

- Calculate: Single Point Energy at Ground state
- with: Hartree-Fock 3-21G(\*)
- Start from: Initial geometry.
- Subject to:  Constraints  Frozen Atoms  Symmetry
- Compute: Solvent: <none>  UV/vis  IR  NMR
- Print:  Orbitals & Energies  Thermodynamics  Vibrational Modes
- Options: LOGP=GHOSE

Below the dialog, the 'Output' window shows the following text:

```
Spartan26:M001
Output
Semi-Empirical Program Wall Time: 000:00:0
Spartan '04 Properties Program: (PC/x86)
LogP (Ghose-Crippen): 2.17
Properties Program CPU Time : 000:00:01.3
Properties Program Wall Time: 000:00:01.3
```

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

<sup>9</sup> Ghose, Pritchett and Crippen *J. Comput. Chem.*, 9, 80 (1988).