

## Le bon sens de la chromatographie en phase liquide

**Résumé** La modélisation du processus chromatographique, nécessaire à la mise au point raisonnée d'une méthode de séparation, s'appuie sur l'utilisation de plusieurs relations mathématiques entre différentes grandeurs, ces dernières pouvant être associées à des paramètres opératoires (la longueur de la colonne...) ou à des caractéristiques de qualité du résultat (la résolution chromatographique...). Pour pouvoir anticiper les conséquences d'une modification d'un paramètre opératoire, il est donc essentiel de bien identifier les relations de cause à effet entre grandeurs opératoires et grandeurs de qualité. Si les ouvrages d'enseignement présentent effectivement les relations reliant les grandeurs entre elles, l'usage de ces relations n'est pas forcément structuré autour d'une logique de lien de cause à effet, ce qui rend l'appropriation du système très complexe pour l'étudiant. Cet article présente quelques relations fondamentales de la chromatographie en phase liquide en les associant à un schéma systémique d'implication, montrant comment celui-ci peut permettre de mieux appréhender le processus de développement de méthode.

**Mots-clés** Schématisation, modélisation, chromatographie, enseignement.

Face à un échantillon qui contient plusieurs espèces chimiques, l'obtention d'un signal que l'on souhaiterait spécifique du composé que l'on cherche à quantifier (appelé analyte) est bien souvent interféré par la présence d'un ou plusieurs autres composés. Cette interférence va très souvent conduire à une surestimation de la concentration de l'analyte et à un résultat qui ne sera pas juste ! Pour arriver à quantifier de façon exacte (juste et fidèle) cet analyte, il va donc être nécessaire de séparer les molécules de l'analyte et les molécules des composés interférents, c'est le rôle de la chromatographie que nous connaissons bien. Les laboratoires d'analyses mettent très souvent en œuvre une séparation chromatographique en utilisant une phase mobile liquide ou gazeuse, avec un très fort attrait ces dernières années pour la chromatographie en phase liquide à polarité de phases inversée (RPLC). Le développement très rapide de cette technique est lié d'une part à une demande croissante d'analyse d'échantillons dont les constituants ne sont pas volatils – c'est très souvent le cas pour les composés à usage pharmaceutique –, et d'autre part à la grande robustesse de la méthode et à la large gamme de solutés pouvant être séparés par ce mode de séparation comparé à la chromatographie en phase normale ou à la chromatographie d'interaction hydrophile. Ainsi, les colonnes remplies de particules de silice greffées avec des groupements de type chaîne alkyle (souvent octadécyle,  $C_{18}$ ) sont les plus largement commercialisées à ce jour. Doté d'une chaîne HPLC (CLHP en français) et d'une colonne type  $C_{18}$ , le chimiste se lance alors dans le développement d'une méthode de séparation. Pour ce faire, il s'appuie sur les concepts fondamentaux de la chromatographie qui sont présentés dans de nombreux ouvrages. Mais si les concepts associés à la chromatographie sont effectivement tous présentés dans les livres, la méthodologie de développement de méthode en est toutefois bien souvent absente. En effet, les éléments du système chromatographique sont majoritairement très bien décrits – voir la *figure 1* qui représente sous forme de carte conceptuelle les éléments du système chromatographique dans un but d'optimisation –, mais il nous manque généralement le lien entre les grandeurs opératoires (les caractéristiques de la colonne, de la phase mobile...) et les grandeurs de qualité que sont la résolution chromatographique et le temps d'analyse. Comment le chimiste peut-il

alors anticiper les effets d'une modification d'une grandeur opératoire ?

Ce manque de connaissance des liens conduit à une perte de temps importante, un taux faible de succès en termes de développement de méthode et d'optimisation des durées d'analyse, une faible robustesse de la méthode, et ultérieurement à une difficulté accrue de transposition de méthode entre le laboratoire de R&D et le laboratoire de contrôle qualité. Dans un précédent article [1], nous avons argumenté sur la nécessité de réduire le nombre de relations mathématiques à présenter aux étudiants pour limiter la charge cognitive. Nous proposons ici d'explicitier un nombre limité de relations permettant de traiter du développement de méthode en mode HPLC à polarité de phases inversée, en présentant toujours les relations dans le sens physique associé à un lien de cause à effet. Nous nous limiterons ici aux séparations en mode isocratique (la composition de la phase mobile est constante tout au long de la séparation). Dans ce cas, le travail du chimiste consiste, après avoir sélectionné une colonne, à trouver la composition et le débit de phase mobile qui permettront d'avoir une séparation satisfaisante (résolution minimale supérieure à 1,5) dans le temps d'analyse le plus court possible.

### L'écriture des relations et le sens du lien cause-effet

Dans le cadre des formations que nous proposons (bac + 2-3, bac + 5, formation continue), nous avons choisi d'écrire les relations mathématiques entre grandeurs sur la base d'une convention relative au signe égal : dans une relation, le paramètre situé à gauche du signe égal "=" est une conséquence des paramètres situés à droite de ce signe – ce type d'écriture est aussi utilisé en informatique lors de l'affectation du résultat d'un calcul à une variable. Dans l'article précédent [1], des exemples de situation-problème associées à cette approche ont déjà été présentés. Nous reprendrons ici un autre cas, très caractéristique des fausses idées que peuvent avoir les étudiants en raison bien souvent de la façon dont les concepts leur ont été présentés. Bien sûr, pour le scientifique aguerri, écrire une relation mathématique n'engage pas de lien d'implication ; il s'agit simplement d'une égalité entre deux expressions, et nous pouvons manipuler cette relation

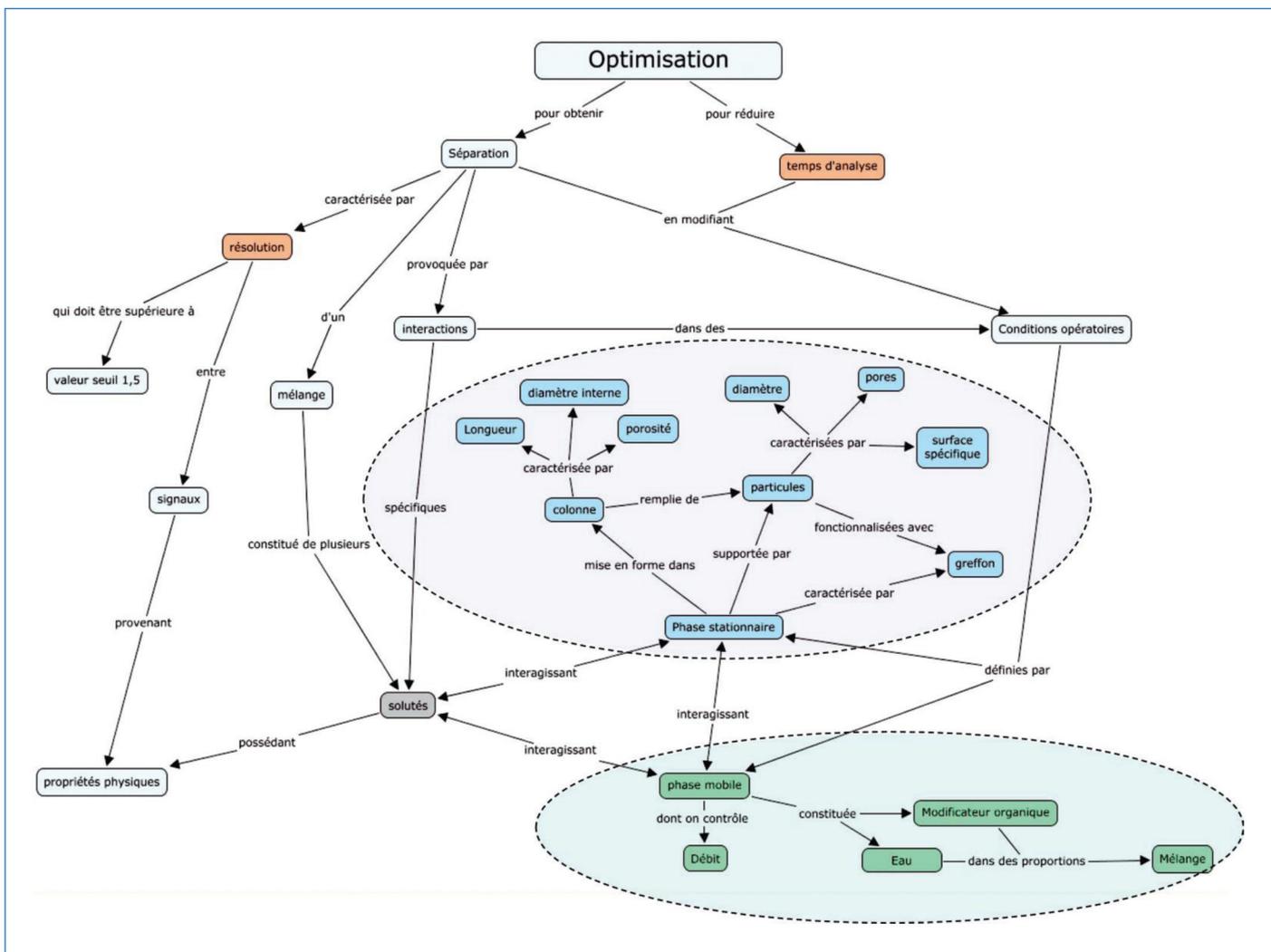


Figure 1 - Carte conceptuelle autour de la notion d'optimisation en RPLC.

dans tous les sens dès lors que nous maîtrisons parfaitement les liens d'implication. Mais ce n'est pas le cas pour l'étudiant. Celui-ci peut être complètement perturbé et incapable d'appréhender les modèles physiques sous-jacents si nous ne nous efforçons pas de les faire ressortir de façon explicite, ce qui est l'objectif de cette convention d'écriture.

Prenons ainsi trois grandeurs bien connues du chromatographe : l'efficacité ( $N$ ), le temps de rétention ( $t_r$ ), et l'écart-type du pic chromatographique ( $\sigma$ ). Tout un chacun, dès lors qu'il s'intéresse à la chromatographie, a pu voir dans les ouvrages la relation (0) ci-dessous :

$$N = \left( \frac{t_r}{\sigma} \right)^2 \quad (0)$$

Cette relation entre trois grandeurs est très largement présentée de la sorte et est utilisée pour estimer la valeur de l'efficacité à partir d'un chromatogramme. Ainsi, sans même réaliser qu'il applique implicitement la convention que nous avons explicitée ci-dessus – la grandeur située à gauche du signe = dans la relation est une conséquence des paramètres situés à droite de ce signe –, l'étudiant peut penser que l'efficacité  $N$  est la conséquence du temps de rétention et de l'écart-type du pic chromatographique. Or ce n'est pas du tout le cas, et nous allons tenter d'explicitier cela dans ce qui suit.

Nous voyons apparaître également dans ces mêmes ouvrages la relation  $H = L/N$ , avec  $L$  la longueur de la colonne et  $H$  la hauteur équivalente à un plateau théorique, ce qui pourrait laisser penser que  $H$  est dépendant de  $L$  et  $N$ ... Mais l'étudiant

est aussi confronté à la très connue relation de Van Deemter  $H = A + B/u + C.u$ , avec  $u$  la vitesse de la phase mobile et trois grandeurs  $A, B, C$  que l'on pourra plus ou moins expliciter. On arrive alors à quelque chose de contradictoire dans le cadre de la convention sus-citée :  $H$  ne peut pas dépendre à la fois de  $(A, B, C, u)$  et de  $(L, N)$ . Confusion, mélange, absence d'explicitation des liens de cause à effet, menant à une perte de sens et une incompréhension totale de la technique par l'étudiant au désespoir de l'enseignant.

Si on replace les choses dans le bon sens, la grandeur  $H$  dépend effectivement des grandeurs  $(A, B, C, u)$  et  $H$  caractérise l'accroissement de variance de la dispersion des molécules de soluté dans l'espace en fonction de la progression des molécules dans la colonne chromatographique [2]. Par la suite, la grandeur efficacité  $N$  est une conséquence de  $H$  et de  $L$  : dans le cadre de notre convention  $N = L/H$ . Et finalement  $\sigma = \frac{t_r}{\sqrt{N}}$  ! C'est donc l'écart-type du pic chromatographique

qui est une conséquence du temps de rétention et de l'efficacité de la colonne ! Pourquoi une telle inversion dans l'esprit de l'étudiant ? Simplement parce que nous pouvons retrouver la valeur de l'efficacité à partir d'un pic chromatographique obtenu expérimentalement. Nous pouvons en effet mesurer  $t_r$  et  $\sigma$  sur le chromatogramme, et réaliser le calcul tel que décrit dans la relation (0) semble faire apparaître l'efficacité comme une conséquence de  $t_r$  et  $\sigma$ . Mais ce n'est pas le cas comme nous venons de le voir !

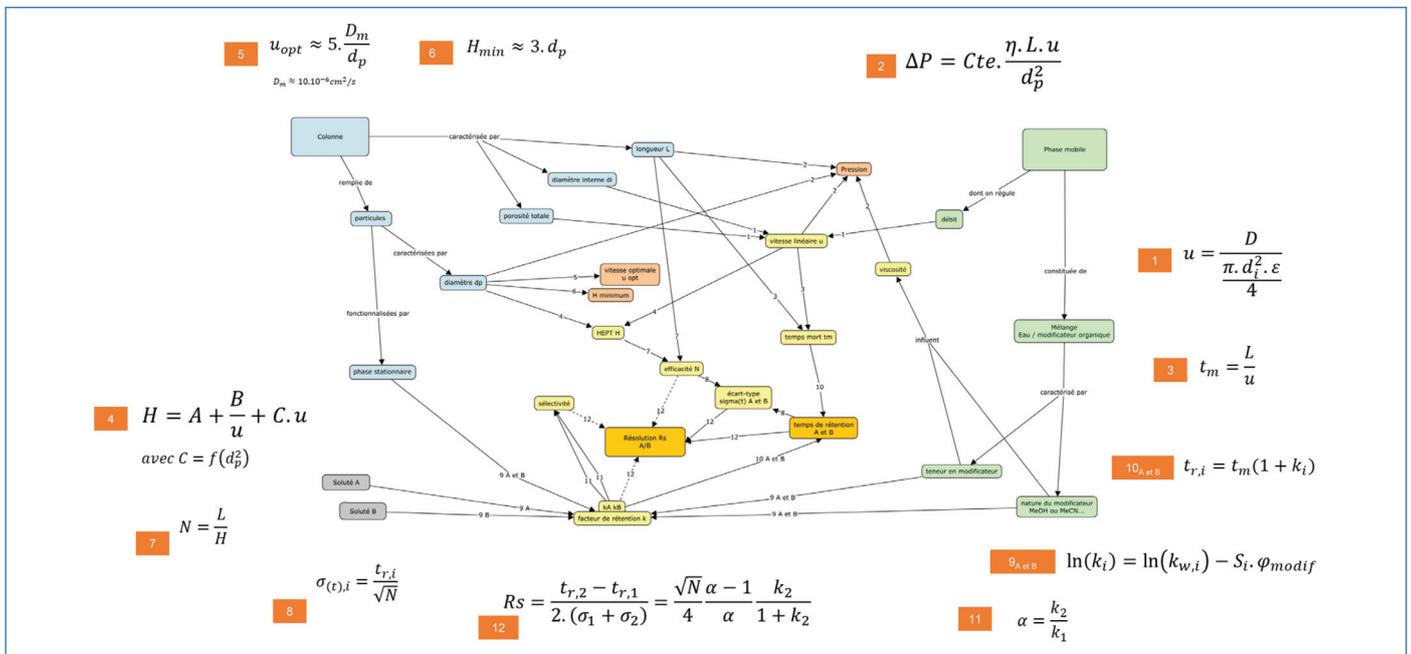


Figure 2 - Paramètres opératoires de la chromatographie en phase liquide (colonne en bleu ; phase mobile en vert) et relations de cause à effet pour l'optimisation d'une séparation (grandeurs de qualité en orange) (voir glossaire en *annexe\** et le document à télécharger sur <https://new.societechimiquedefrance.fr/divisions/enseignement-formation/le-bon-sens-de-la-chromatographie/>).

Nous pensons donc qu'il est important d'appliquer la convention d'écriture dans tous les documents que nous utilisons, et libre ensuite à l'étudiant de manipuler les relations comme il le souhaite. Mais l'effort que nous faisons dans le maintien d'une forme unique de convention d'écriture ne peut que faciliter l'appropriation du système par l'étudiant. Ainsi, nous pouvons résumer toutes les relations liées à la RPLC en mode isocratique dans la *figure 2* en explicitant parallèlement les liens de cause à effet par l'intermédiaire de flèches entre les grandeurs, flèches qui ont un sens en adéquation avec les liens de cause à effet.

Du point de vue d'un enseignement qui n'adopterait pas une forme unique d'écriture – c'est-à-dire présentant des relations dans un sens ou dans un autre en fonction du contexte –, il peut être intéressant de donner aux étudiants une carte sans les flèches et de leur demander à l'intérieur de petits groupes de matérialiser les flèches qui leur semblent pertinentes avec les relations mathématiques associées. On pourra alors discuter avec les étudiants sur le sens des relations qu'ils ont choisi. Par exemple, dans la *figure 2*-relation 10, le temps de rétention apparaît comme une conséquence du temps mort et du facteur de rétention. Cela peut apparaître contradictoire pour l'étudiant qui a vu la relation  $k = t_r/t_m - 1$ , avec parfois le choix de cette formulation comme « définition » du facteur de rétention, et qui préfère donc mettre une flèche depuis  $t_r$  et  $t_m$  vers  $k$ . Certes, ce dernier calcul est souvent utilisé pour retrouver le facteur de rétention d'un soluté à partir du chromatogramme, mais une augmentation du facteur de rétention n'est pas la conséquence d'une augmentation du temps de rétention ! C'est parce que le facteur de rétention a augmenté – on a par exemple augmenté la teneur en eau dans la phase mobile, ce qui favorise l'équilibre de partage vers la phase stationnaire – que le temps de rétention a augmenté.

## Loi et modélisation

Dans l'ensemble des relations de la *figure 2*, certaines relations sont des relations fondamentales de physique qui ne prêtent

pas à discussion. Par exemple dans la relation (3), le temps pour parcourir une distance est la conséquence de la distance à parcourir (la longueur de la colonne) et de la vitesse de déplacement.

En revanche, les relations (4) et (9) ne sont que des modèles de dépendance. Par exemple, autour de la relation (4), on a choisi de ne pas expliciter la définition du terme  $H$  dénommé hauteur équivalente à un plateau théorique  $H = \sigma_{(L)}^2/L$  qui est difficilement manipulable pour un premier niveau de présentation, et on a préféré représenter la grandeur  $H$  comme dépendante des phénomènes d'anisotropie d'écoulement (A), de diffusion longitudinale (B) et de transfert de masse (C), en lien avec la vitesse de la phase mobile  $u$  [2]. Ceci reste un choix de modélisation, et c'est pour cela que l'on pourra voir émerger d'autres relations dites de Van Deemter, de Knox, de Golay, de Giddings... dépendantes du modèle choisi. Globalement, on constate que le diamètre des particules a une contribution significative dans la valeur de  $H$ , et que, sous réserve de quelques approximations, on peut obtenir un modèle raisonnable pour les grandeurs A, B et C, et arriver aux relations (6) et (5) qui caractérisent l'optimum de vitesse associé au minimum du terme  $H$  (et donc au maximum d'efficacité chromatographique au regard de la relation 7).

De la même façon, la définition du facteur de rétention  $k = n_{\phi stat}/n_{\phi mob}$  (rapport des quantités de matière dans chacune des deux phases) n'est pas explicitée sur la *figure 2*. La relation (4) correspond quant à elle au modèle dit « linear-solvent-strength model » (amplement développé dans l'ouvrage de Snyder et Dolan [3]) dont l'usage est fort utile pour le chromatographe, et qui suppose que le logarithme du facteur de rétention dépend linéairement de la teneur en modificateur organique (solvant fort : méthanol, acétonitrile...). Si cette modélisation se révèle largement applicable pour de très nombreux composés (une légère déviation est toutefois observée avec l'acétonitrile), il est cependant impossible à ce jour d'avoir *a priori* les valeurs des termes  $k_w$  et  $S$  pour un composé donné avec un modificateur organique donné. Il sera donc nécessaire, en vue d'optimiser une séparation,

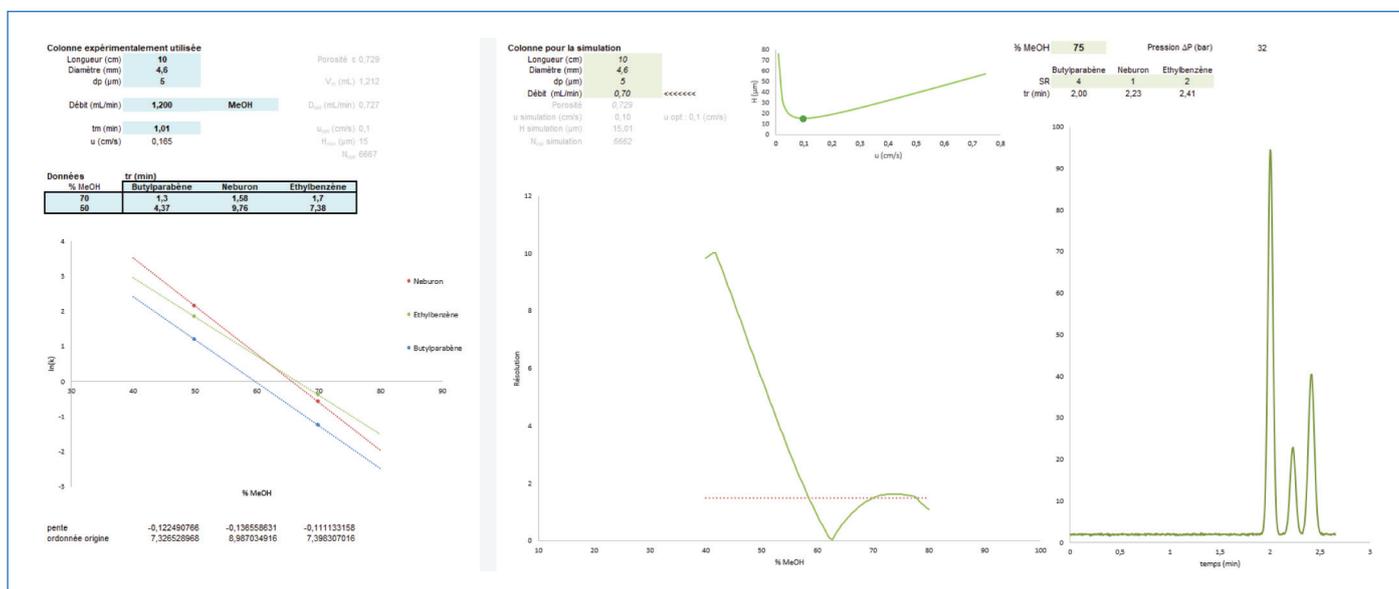


Figure 3 – À gauche : conditions chromatographiques et temps de rétention de trois solutés pour deux teneurs en méthanol ; modèles de rétention déduits de ces informations. À droite : application des modèles de rétention à l'optimisation de la composition en phase mobile (résolution en fonction de la teneur en méthanol).

de déterminer expérimentalement ces deux grandeurs. La réalisation *a minima* de deux expériences, à deux teneurs en modificateur organique, permet de calculer pour chaque teneur le facteur de rétention du composé à partir des temps de rétention observés en résolvant l'équation (10), puis de retrouver les valeurs de  $k_w$  et  $S$  caractéristiques du composé avec le modificateur organique choisi au travers d'une régression linéaire (exemple dans la figure 3).

Une série de flèches autour de la grandeur « résolution » dans la figure 2 pourrait aussi apparaître perturbante dans un premier temps, mais nous avons souhaité être d'une part au plus proche de la définition de la résolution pour des pics chromatographiques gaussiens (partie gauche de la relation 12, flèches en trait plein), mais aussi présenter la relation dite de Purnell (partie droite de la relation 12, flèches en pointillés) qui est une conséquence de la définition de la résolution et des relations 10 et 11. Cette relation est fort utile car elle permet en effet de mettre plus facilement en évidence les effets respectifs d'une variation du facteur de rétention et de la sélectivité sur la résolution.

## Du modèle à l'optimisation

Pour un couple colonne/solvant sélectionné, l'optimisation d'une méthode nécessite donc la connaissance des modèles de rétention des composés présents dans l'échantillon, modèles que l'on ne peut construire qu'expérimentalement comme nous venons de le voir. Après avoir sélectionné une colonne, l'analyste choisira une vitesse de phase mobile supérieure à la vitesse optimale (estimée via la relation 5 [4]), pour gagner du temps sans trop perdre en efficacité. Un premier débit à appliquer sera alors calculé en résolvant l'équation 1 en supposant une porosité de 60 %. L'injection d'un composé non retenu – la thiourée, très polaire et donc non retenue sur une phase  $C_{18}$ , se détecte très bien en UV – donnera accès au temps mort du système, et donc à la vitesse vraie en résolvant l'équation 3, et à la porosité vraie de la colonne via l'équation 1. Il sera alors possible d'injecter le mélange à analyser à différentes teneurs en solvant organique, d'identifier les temps de rétention associés à

chaque composé – il n'est pas nécessaire de connaître le composé mais de pouvoir le reconnaître sur les différents chromatogrammes, par exemple via son spectre –, et de déterminer les paramètres  $k_w$  et  $S$  des modèles de rétention associés à chaque composé (figure 3, partie gauche).

En quoi ce type de graphe dit « modèle de rétention » est-il utile au chimiste ? Il met en évidence que la sélectivité chromatographique est fortement influencée par la teneur en méthanol, et qu'il faut donc choisir cette teneur avec le plus grand soin. Dans l'exemple traité ici, la séparation du mélange de trois composés sera très difficile autour de 60-65 % de méthanol, voire impossible si on travaille à 62 % de méthanol. En effet, à cette dernière composition, deux des composés ont des facteurs de rétention identiques (les courbes rouge et verte se croisent) et ces composés auront par conséquent des temps de rétention identiques (la sélectivité  $\alpha$  dans ce cas égale à 1) et, quelle que soit l'efficacité de la colonne, une résolution satisfaisante ne pourra jamais être atteinte ( $R_s = 0$  si  $\alpha = 1$ , relation 12). Plus le nombre de composés dans le mélange sera important, plus le risque de coélution sera grand, et c'est ainsi que la connaissance des modèles de rétention nous guidera pour choisir les conditions expérimentales adaptées. Mais peut-être n'arriverons nous pas à séparer les composés du mélange en utilisant le méthanol ! Il sera alors pertinent d'essayer un autre solvant, l'acétonitrile, et de reconstruire les modèles de rétention qui seront alors différents en raison du groupement  $-C\equiv N$  de l'acétonitrile (comparé au groupement  $-OH$  du méthanol) qui génère d'autres types d'interactions avec les solutés – et on retrouve ici l'intérêt de la classification de Snyder [5]. Avec ces nouveaux modèles, peut-être existera-t-il une composition qui permettra la séparation... ou peut-être pas.

La connaissance des modèles de rétention permet ainsi de pouvoir estimer la valeur de la résolution minimale que l'on pourra observer quelle que soit la teneur en solvant organique dans la phase mobile. En effet, pour une composition donnée, il est en effet possible de calculer la valeur du facteur de rétention  $k$  de chaque composé, puis les temps de rétention et l'écart-type des pics au regard de la colonne et des conditions de travail. On a donc ainsi accès à la résolution dans les

conditions chromatographiques choisies, et un graphe résolution en fonction de la teneur en solvant peut être tracé (*figure 3*) pour déterminer les teneurs en solvant qui permettent d'atteindre la résolution minimale souhaitée. On choisira finalement une teneur qui conduit au plus faible temps d'analyse, tout en conservant une robustesse satisfaisante pour la méthode (une teneur de 75 % MeOH semble être une valeur pertinente dans notre exemple *figure 3*). Les modèles de rétention n'étant pas dépendants de la géométrie de la colonne en RPLC, ni du débit de phase mobile, il est aussi possible de tester d'autres conditions opératoires et d'observer leurs conséquences sur le chromatogramme résultant – par exemple sur la *figure 3* partie droite, le débit de phase mobile a été modifié pour se rapprocher de la vitesse optimale de fonctionnement de la colonne chromatographique. Le lecteur pourra tester par exemple l'effet d'une diminution de la longueur de colonne (5 cm) (voir fichier Excel d'optimisation en *annexe\**).

### De l'usage auprès des étudiants

En fonction du contexte de formation dans lequel l'enseignant se trouve, les modalités pédagogiques relatives à l'utilisation de cette figure peuvent être variées car les relations et leurs implications sont pertinentes quelles que soient les compétences visées. Nous venons d'évoquer le développement de méthode, mais l'identification des dysfonctionnements d'un système chromatographique peut très bien être traité à partir de la *figure 2*. Si par exemple les temps de rétention expérimentalement observés des solutés se mettent à augmenter, la remontée à contre-sens des flèches à partir de « temps de rétention A et B » sur la *figure 2* permet d'identifier les sources potentielles de dérive.

- Est-ce le temps mort qui a changé, causé par un changement de vitesse induit par un changement de débit ? On pourrait donc mesurer un temps mort expérimental pour tester cette hypothèse.

- Est-ce les facteurs de rétention qui ont changé ? Si tel est le cas, utilise-t-on toujours la même phase stationnaire ? Toujours le même modificateur ? Le pourcentage de modificateur a-t-il été modifié ? La pompe délivre-t-elle la bonne composition en solvant ?

Les simulations réalisées par un outil tel que celui présenté sur la *figure 3* peuvent aussi être utilisées pour « explorer » les effets des changements de conditions opératoires. Il faudra toutefois être très vigilant et bien faire prendre conscience aux étudiants que nous sommes alors dans le monde des modèles qui donne accès à une simulation. Certaines observations expérimentales que l'on peut faire au laboratoire ne seront pas en adéquation avec la simulation fournie par le modèle – nous évoquions précédemment le fait que le modèle de rétention avec l'acétonitrile s'éloigne parfois du modèle linéaire. Dans ce cas-là, ce ne sont pas les observations expérimentales qui seront à rejeter, mais bien le modèle qui n'est pas suffisamment complet pour décrire toutes les situations observées dans le monde réel.

Et pour aider à faire ressortir les limites des modèles utilisés, il peut aussi être pertinent de faire construire l'outil de simulation par l'étudiant lui-même, ce qui oblige l'étudiant à identifier les relations qui sont effectivement intégrées dans le modèle car c'est lui qui doit les « programmer » (voir trame pour construire la feuille Excel en *annexe\**).

Avec le développement de l'usage de langages de programmation, et Python a le vent en poupe aujourd'hui, il est bien sûr aussi possible d'envisager différents niveaux d'usage : de la modélisation  $\ln(k) = f(\%solvant)$  jusqu'à la simulation d'un chromatogramme [6].

### Tout est-il dit ?

Bien sûr que non ; mais nous avons essayé ici de remettre du sens autour des concepts que l'étudiant a du mal à articuler durant son apprentissage. Alors bien sûr les experts de la chromatographie s'étonneront de l'absence de tel et tel paramètre dans la *figure 2* : la température n'apparaît pas alors qu'elle modifie les coefficients de partage ; on ne parle pas de gradient alors que celui-ci est largement utilisé en laboratoire ; on ne peut pas voir les conséquences des effets de dispersion externe qui seront critiques en UPLC... Ce n'est pas grave, nous pourrions enrichir le modèle petit à petit lorsque de nouveaux concepts seront introduits dans nos enseignements ! Quoi qu'il en soit, le choix de l'écriture des relations entre les grandeurs pourra être maintenu pour aider l'étudiant à l'appropriation des liens de cause à effet dans le domaine de la chromatographie. Cette approche formalisant les liens de cause à effet au travers d'un schéma explicite peut être proposée dès le début des études post-bac et prolongée jusqu'à bac + 5 !

Les auteurs remercient Isabelle Kermen, Xavier Bataille et Jonathan Piard pour les discussions fructueuses qui ont conduit à cet article.

\* Le fichier des annexes est téléchargeable librement sur [www.lactualitechimique.org](http://www.lactualitechimique.org) (page liée à cet article).

[1] J. Randon, Carte conceptuelle, schéma d'implication et simulation. Des outils pour développer des compétences pour l'optimisation d'une séparation chromatographique, *L'Act. Chim.*, **2011**, 350, p. 35-40.

[2] La définition de H est liée à la variance du pic chromatographique lors de la progression d'un ensemble de molécules dans la colonne  $H = \frac{\sigma^2(L)}{L}$ , mais cette relation est difficilement utilisable pour des étudiants avant le niveau master et n'est donc pas présentée de la sorte.

Dans une progression pédagogique en science dans laquelle la notion de dispersion autour d'une valeur moyenne associée à un écart-type serait bien développée (par exemple via l'estimation des incertitudes de mesure), une telle définition permet de justifier facilement la modélisation conduisant aux trois termes de la relation de Van Deemter. La dispersion du pic chromatographique n'est en effet que la perception à l'échelle macroscopique d'une dispersion de temps de rétention d'un ensemble de molécules simultanément injectées en tête de colonne.

[3] L.R. Snyder, J.W. Dolan, *High-Performance Gradient Elution: The Practical Application of the Linear-Solvent-Strength Model*, Wiley, **2007**.

[4] Avec des unités hors du S.I. et pour faciliter les calculs, on écrit quelquefois  $u_{opt} = 0,5/d_p$  avec  $u_{opt}$  en  $\text{cm.s}^{-1}$  et  $d_p$  en  $\mu\text{m}$  ; dans cette formule le terme 0,5 a une unité :  $(\text{cm.s}^{-1}).\mu\text{m}^{-1}$ . Ce qui conduit aussi à une vitesse optimale de 0,1  $\text{cm.s}^{-1}$  pour des particules ayant un diamètre de 5  $\mu\text{m}$ .

[5] L. Snyder, Classification of the solvent properties of common liquids, *J. Chromatogr. Sci.*, **1978**, 16, p. 223-234.

[6] <https://colab.research.google.com/drive/1Clb0mgre9PTKBRgnbpmZZOHM9nh3Smk9?usp=sharing> ; <https://new.societechimiquedefrance.fr/divisions/enseignement-formation/le-bon-sens-de-la-chromatographie/>

Jérôme RANDON\*, professeur, Vincent DUGAS, maître de conférences, et Claire DEMESMAY, professeure, Université Claude Bernard Lyon 1, Institut des Sciences Analytiques, CNRS, UMR 5280, Villeurbanne.

\* [randon@univ-lyon1.fr](mailto:randon@univ-lyon1.fr)

## Compléments à l'article « Le bon sens de la chromatographie en phase liquide », par J. Randon, V. Dugas et C. Demesmay (*L'Act. Chim.*, 2022, 469, p. 36).

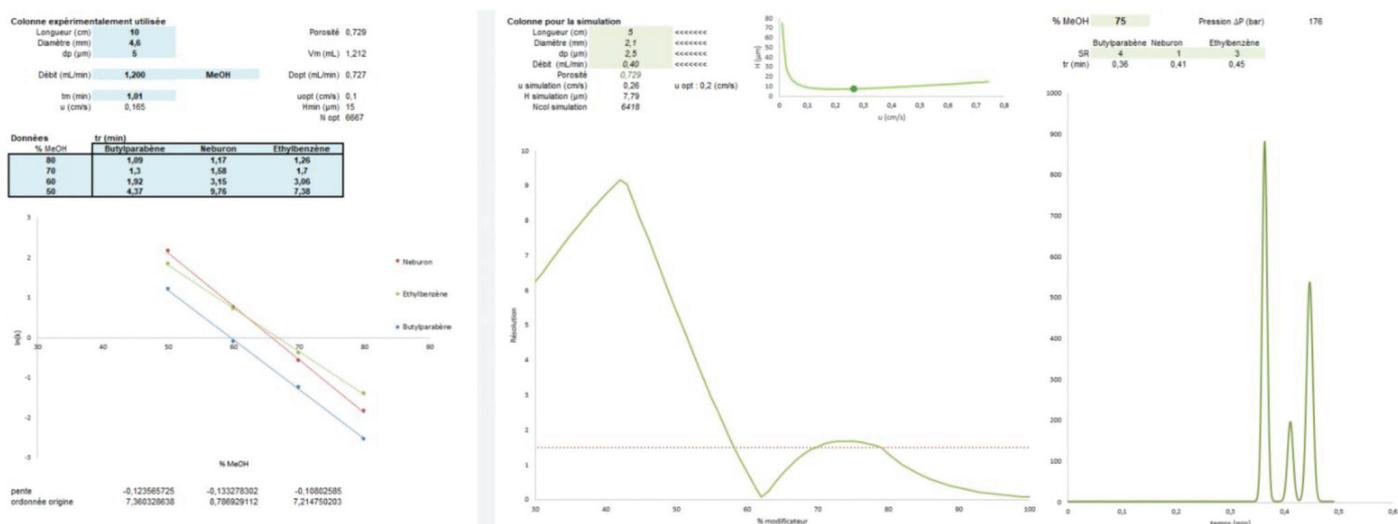
### I - Glossaire

$\alpha$  : sélectivité  
 $\varepsilon$  : porosité de la colonne  
 $\eta$  : viscosité de la phase mobile  
 $\varphi_{\text{modif}}$  : teneur en modificateur organique  
 $\sigma$  : écart-type du pic chromatographique (t) en unité de temps, (L) en unité de longueur

A : contribution de l'anisotropie d'écoulement  
 B : contribution de la diffusion  
 C : contribution du transfert de masse  
 $d_i$  : diamètre interne de la colonne  
 $d_p$  : diamètre des particules  
 $D_m$  : coefficient de diffusion en phase mobile  
 D : débit de la phase mobile  
 k : facteur de rétention  
 $k_w$  : facteur de rétention dans l'eau, ordonnée à l'origine du modèle de rétention  
 H : hauteur équivalente à un plateau théorique  
 $H_{\text{min}}$  : hauteur équivalente à un plateau théorique, valeur minimale  
 i : indice relatif à l'analyte : A ou B  
 L : longueur de colonne  
 N : efficacité  
 $R_s$  : résolution  
 u : vitesse de la phase mobile  
 $u_{\text{opt}}$  : vitesse optimale de la phase mobile  
 S : pente du modèle de rétention  
 $t_m$  : temps mort  
 $t_r$  : temps de rétention

### II - Pour les étudiants : exemple de support pour une séance dédiée à la construction d'une feuille de calcul visant l'optimisation chromatographique en mode RPLC isocratique

L'objectif de la séance est de construire une feuille Excel permettant de déterminer rapidement les conditions expérimentales adaptées pour réaliser la séparation d'un mélange de composés avec une résolution voulue et dans le temps le plus court possible.



Des données sont fournies ici pour mettre au point la feuille de calcul. Cette feuille pourra ensuite être utilisée avec les données expérimentales obtenues en travaux pratiques (ou dans le laboratoire dans lequel vous travaillerez plus tard).

## Activités à réaliser pour construire la feuille de calcul

### 1 - Obtention d'un modèle de rétention à partir de données expérimentales

La colonne utilisée présente une longueur de 10 cm, un diamètre interne de 4,6 mm, et elle est remplie de particules de silice greffée C<sub>18</sub> de diamètre 5 µm. Cette colonne est utilisée à 1,2 mL/min, et dans ces conditions on observe un temps mort de 1,01 min.

Ces grandeurs (appelées grandeurs d'entrée) peuvent être utilisées pour calculer différentes grandeurs dites de sortie : la porosité de la colonne, le volume mort de la colonne, la vitesse de la phase mobile... Si vous changez les valeurs situées dans les cases correspondantes à vos grandeurs d'entrée, les grandeurs de sorties doivent être automatiquement modifiées.

#### Colonne expérimentalement utilisée

Longueur (cm)	10	Porosité	0,729
Diamètre (mm)	4,6	Vm (mL)	1,212
dp (µm)	5		
Débit (mL/min)	1,200	MeOH	
		Dopt (mL/min)	0,727
tm (min)	1,01	uopt (cm/s)	0,1
u (cm/s)	0,165	Hmin (µm)	15
		N opt	6667

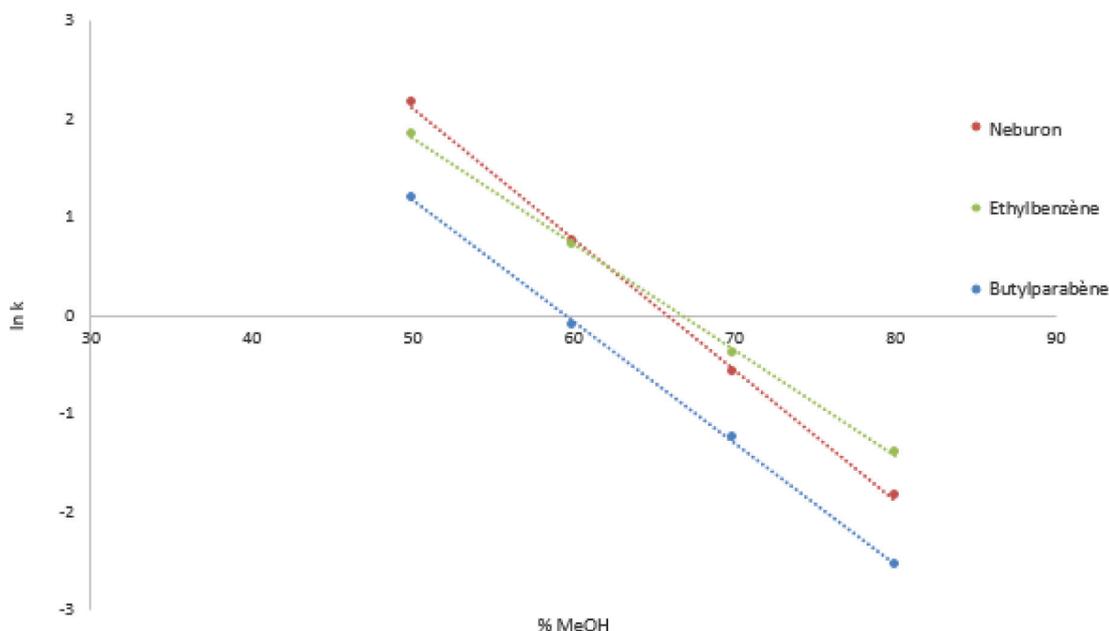
On a mesuré expérimentalement les temps de rétention (en min) de différents composés pour différentes teneurs en méthanol (exprimé en %) dans la phase mobile.

Données % MeOH	tr (min)		
	Butylparabène	Neburon	Ethylbenzène
80	1,09	1,17	1,26
70	1,3	1,58	1,7
60	1,92	3,15	3,06
50	4,37	9,76	7,38

Tracer  $\ln(k)=f(\%MeOH)$  pour les trois composés sur le même graphe. Vers quelle(s) composition(s) de MeOH observe-t-on la coélution de certains composés ?

Pour chaque composé, on pourra déterminer les paramètres pente et ordonnée à l'origine du modèle de rétention à l'aide des fonctions Excel adaptées. La feuille de calcul doit permettre des calculs de la pente et de l'ordonnée à l'origine de façon totalement automatique.

Fonctions Excel : [PENTE \(y connus, x connus\)](#) et [ORDONNEE.ORIGINE \(y connus ; x connus\)](#).



pente	-0,123565725	-0,133278302	-0,10802585
ordonnée origine	7,360328638	8,786929112	7,214750203

Les modèles de rétention peuvent être utilisés pour simuler n'importe quelle condition opératoire utilisant le même type de phases mobile et stationnaire. On ne gardera pour la simulation à venir que les valeurs des pentes et ordonnées à l'origine, tout le reste peut être supprimé !

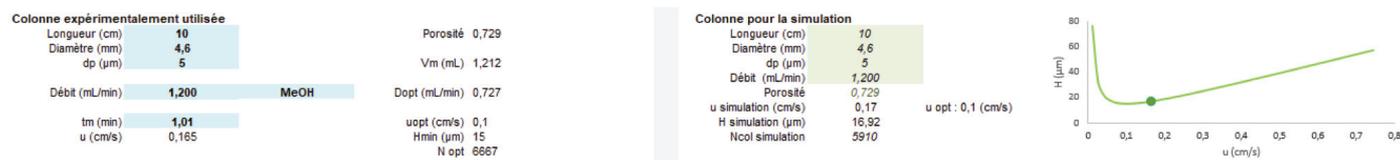
### 2 - Caractéristiques de fonctionnement d'une autre colonne qui sera utilisée pour calculer un chromatogramme simulé

Nous définissons maintenant de nouveaux paramètres d'entrée décrivant une colonne virtuelle, paramètres qui seront utilisés pour simuler un système chromatographique dans différentes conditions expérimentales : longueur, diamètre interne de la colonne (la porosité reste identique à la valeur de la porosité pour la colonne ayant servi à créer le modèle de rétention),

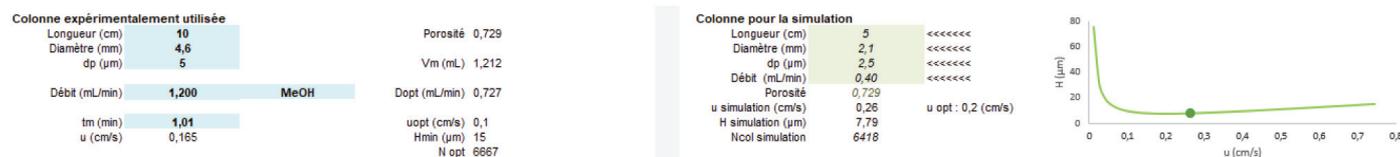
diamètre des particules, débit. Dans un premier temps, on pourra reprendre les mêmes caractéristiques de colonne virtuelle que celles de la colonne utilisée pour construire les modèles de rétention, et on pourra par la suite simuler une autre colonne virtuelle avec des caractéristiques différentes, simplement en changeant les valeurs dans la feuille de calcul.

Pour estimer l'efficacité de la colonne virtuelle, on calculera la hauteur équivalente à un plateau théorique H par la relation  $H = A + B/u + C*u$  (u vitesse de la phase mobile exprimée en cm/s ; H exprimée en  $\mu\text{m}$ ), avec  $A = 0$  ;  $B = 0,75$  et  $C = 3 * d_p^2$  ( $d_p$  exprimé en  $\mu\text{m}$ ).

Construire une courbe  $H = f(u)$  pour la colonne virtuelle utilisée dans la simulation (on pourra prendre des valeurs de u allant de 0,01 à 0,75 par pas de 0,01). Ajouter un point permettant de situer le point de fonctionnement u-H sur la courbe de Van Deemter. Exemple obtenu avec les mêmes caractéristiques de colonne :



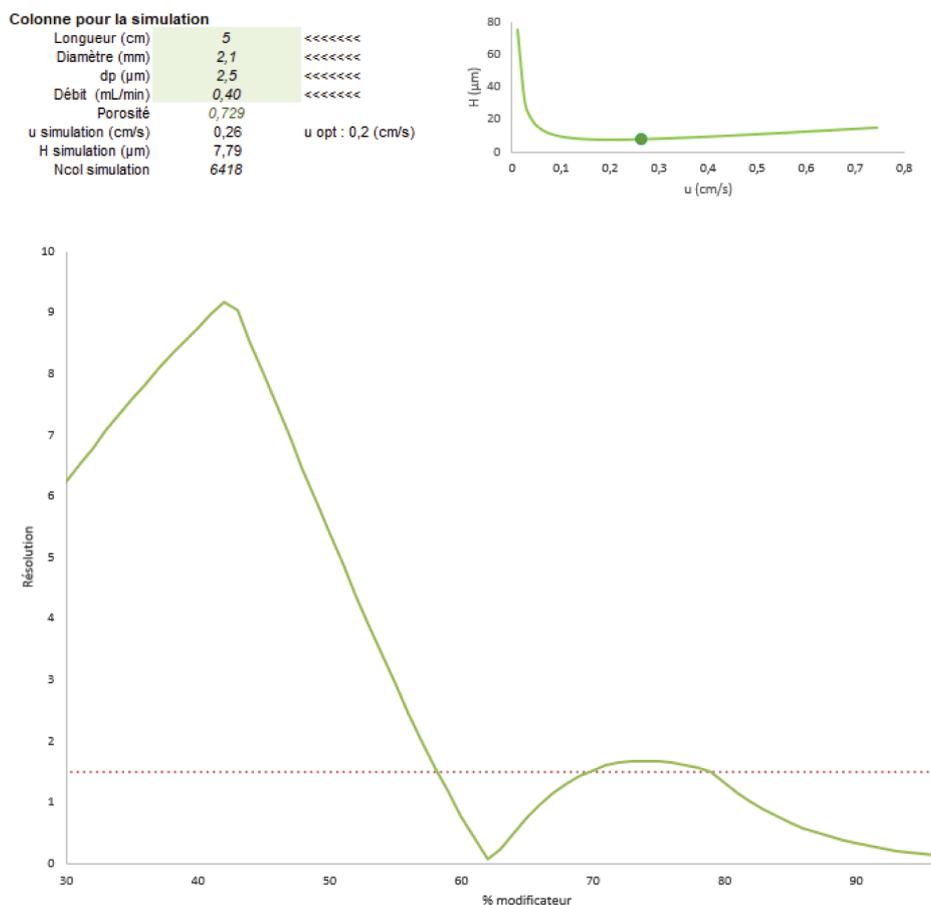
Exemple obtenu avec une autre colonne :



### 3 - Calcul de la résolution sur toute la plage de composition en modificateur organique

Pour des pourcentages de MeOH variant de 30 % à 100 % par pas de 1 %, pour chaque pourcentage de MeOH, calculer les trois valeurs des facteurs de rétention, les deux valeurs de la résolution en utilisant la relation  $R_s = \frac{\sqrt{N}}{2} \left( \frac{k_2 - k_1}{k_1 + k_2 + 2} \right)$ , la résolution minimale et le temps de rétention du dernier composé. Représenter le graphique Résolution=f(%MeOH).

Fonctions Excel qui peuvent être utiles : **GRANDE.VALEUR(matrice,k)** : renvoie la k-ième plus grande valeur d'une série de données ; **PETITE.VALEUR(matrice, k)** : renvoie la k-ième plus petite valeur d'une série de données.



On prendra comme critère de sélection :  $R_s > 1,5$ . Quelles sont les plages de pourcentage de méthanol qui répondent à ce critère ? Dans quelles conditions se placerait-on pour avoir le temps d'analyse le plus court ?

#### 4 - Chromatogramme attendu

On souhaite visualiser le chromatogramme que l'on obtiendrait si on se plaçait à une teneur particulière en méthanol (par exemple 73 % qui devrait conduire à une séparation complète des trois solutés en mélange). Pour ce faire, on créera une cellule qui contiendra la teneur en méthanol pour laquelle le chromatogramme sera simulé, puis on calculera le temps de rétention et l'écart type du pic de chaque composé qui dépend du temps de rétention et de l'efficacité.

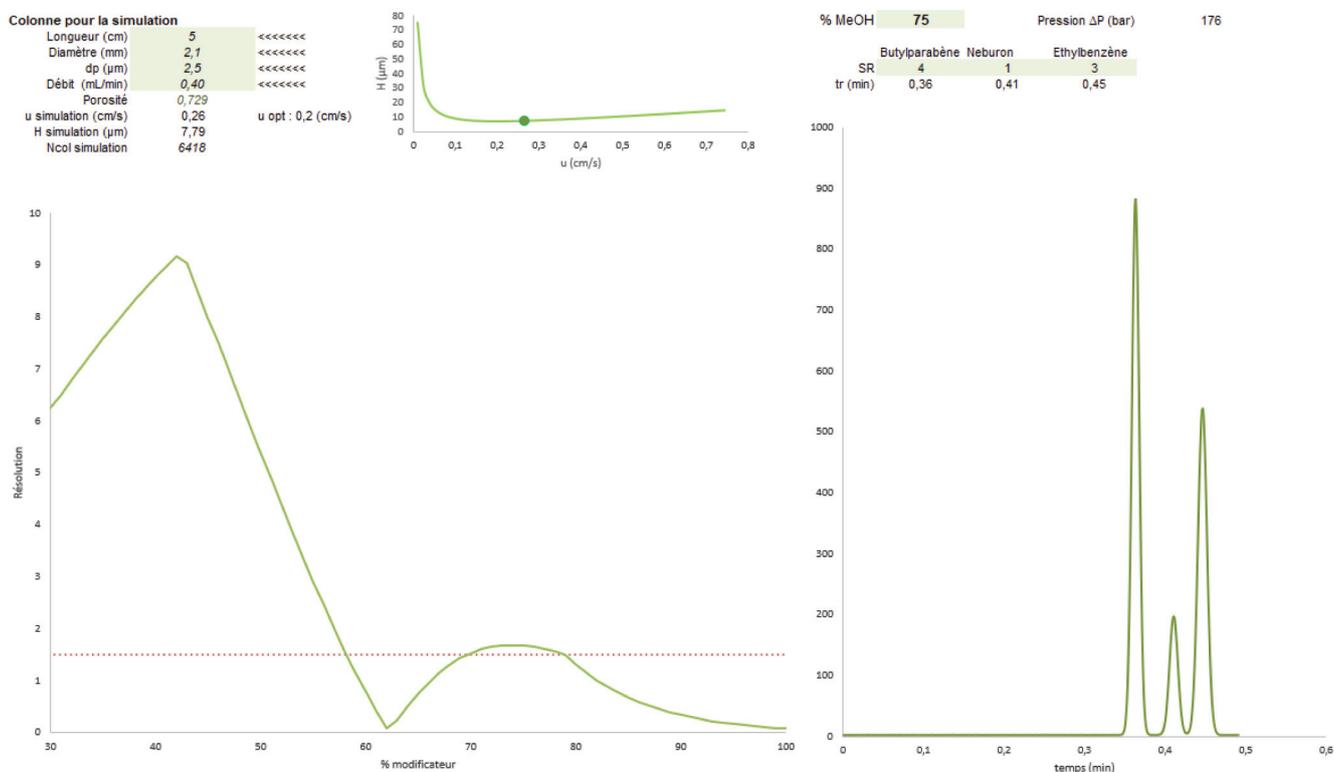
Pour simuler le chromatogramme (signal en fonction du temps t depuis l'injection), on calculera le signal généré par le détecteur toutes les 0,01 min entre 0 et 10 minutes.

Pour un détecteur UV dans lequel passe UN composé avec un temps de rétention  $t_r$  et un écart-type de pic  $\sigma$ , le signal en fonction du temps t depuis l'injection s'exprime sous la forme d'un pic gaussien qui peut être représenté par la relation suivante :

$$Signal = \frac{SR}{D} \cdot \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\left(\frac{t-t_r}{2\sigma^2}\right)^2\right]$$

où D est le débit, et SR est un paramètre proportionnel à la sensibilité du détecteur pour un soluté donné à la longueur d'onde utilisée pour la mesure et à la longueur de la cellule de mesure. Cette grandeur SR dépend aussi de la concentration en composé dans la solution injectée et du volume injecté. Plus la valeur de SR sera grande, plus la hauteur et la surface du pic chromatographique seront importantes (les valeurs de SR sont fixées de façon arbitraire dans la simulation). On choisira ici des valeurs arbitraires.

On calculera le signal pour chacun des composés, puis le signal effectivement observé si les composés sont injectés en mélange. Au regard du détecteur utilisé, vous justifierez la formule qui vous permet de passer du signal observé pour chaque composé considéré individuellement, au signal chromatographique réellement observé.



#### 5 - Influence des paramètres opératoires

En faisant varier les paramètres d'entrée (changer le débit, le diamètre des particules, la longueur de la colonne...), le chromatogramme résultant doit alors se modifier sur la feuille de calcul. Vous regarderez comment évolue le chromatogramme (résolution, temps d'analyse) lorsqu'on modifie les paramètres d'entrée, par rapport aux conditions initiales de la partie 1 (changement de longueur, de diamètre interne de la colonne, diamètre des particules, débit, pourcentage de solvant).

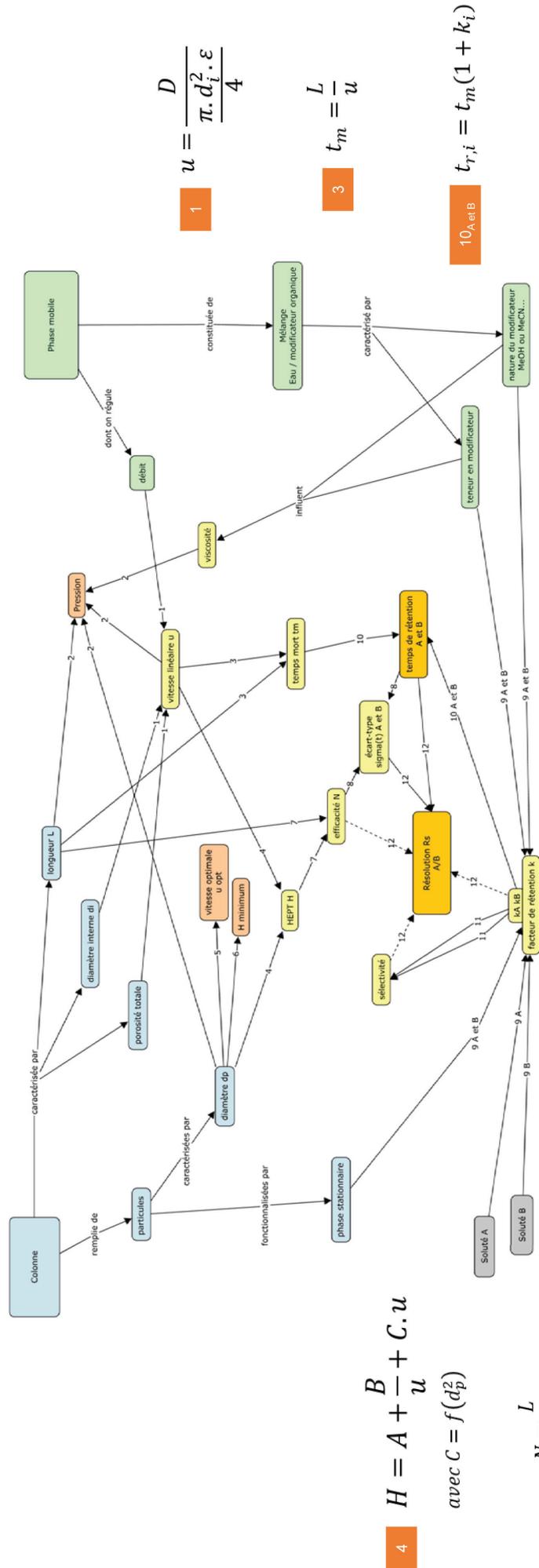
**Les fichiers associés à l'article peuvent être récupérés sur le site de la Société Chimique de France, Division Enseignement-Formation :**

<https://new.societechimiquedefrance.fr/divisions/enseignement-formation/le-bon-sens-de-la-chromatographie/>

5  $u_{opt} \approx 5 \cdot \frac{D_m}{d_p}$   
 $D_m \approx 10 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$

6  $H_{min} \approx 3 \cdot d_p$

2  $\Delta P = Cte \cdot \frac{\eta \cdot L \cdot u}{d_p^2}$



4  $H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$

avec  $C = f(d_p^2)$

7  $N = \frac{L}{H}$

8  $\sigma_{(t),i} = \frac{t_{r,i}}{\sqrt{N}}$

12  $RS = \frac{t_{r,2} - t_{r,1}}{2 \cdot (\sigma_1 + \sigma_2)} = \frac{\sqrt{N} \alpha - 1}{4} \cdot \frac{k_2}{1 + k_2}$

9<sub>A et B</sub>  $\ln(k_i) = \ln(k_{w,i}) - S_i \cdot \varphi_{modif}$

11  $\alpha = \frac{k_2}{k_1}$

1  $u = \frac{D}{\pi \cdot d_i^2 \cdot \varepsilon} \cdot \frac{\varepsilon}{4}$

3  $t_m = \frac{L}{u}$

10<sub>A et B</sub>  $t_{r,i} = t_m(1 + k_i)$