

CHROM. 12,579

ÉTUDE DE L'ÉLUTION NON-LINÉAIRE EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE PRÉPARATIVE*

P. GAREIL

Laboratoire de Chimie Analytique des Processus Industriels, École de Physique et de Chimie de Paris, 10 Rue Vauquelin, 75231 Paris Cédex 05 (France)

L. PERSONNAZ

Laboratoire d'Electronique et d'Automatique, École de Physique et de Chimie de Paris, 10 Rue Vauquelin, 75231 Paris Cédex 05 (France) et Laboratoire des Signaux et Systèmes, C.N.R.S.-E.S.E., 91190 Gif-sur-Yvette (France)

et

J. P. FERAUD et M. CAUDE

Laboratoire de Chimie Analytique des Processus Industriels, École de Physique et de Chimie de Paris, 10 Rue Vauquelin, 75231 Paris Cédex 05 (France)

(Reçu le 7 mai 1979; manuscrit modifié reçu le 28 novembre 1979)

SUMMARY

Study of non-linear elution in preparative liquid chromatography

In most papers dealing with preparative elution chromatography the process behaviour is assumed to be linear, but in practice such an assumption may not be valid, since usually large volumes and high concentrations are injected. Thus a study of the non-linear behaviour of the chromatographic process seems highly desirable for better use of the column potential.

First of all, some properties of linear systems which should be useful for preparative chromatography are recalled. Then, the shape of elution profiles of a single solute is systematically studied in terms of the injected volume and concentration. These profiles are described by means of their first few moments. The moment method is convenient since it makes the test of linearity of the column behaviour easier when a large volume is injected. The test is based on a comparison between the first two moments of the analytical profile and those of the output profile under consideration.

The strongly non-linear behaviour of the process is studied in detail, and a set of characteristic properties are derived through experiments in ion-exchange chromatography. In particular, if the concentration profiles are plotted with respect to a common origin coinciding with the end of the pulse injections, they show a quasi-exponential envelope curve; the parameter defining the curve is related to the standard

* Présenté au *4th International Symposium on Column Liquid Chromatography, Boston, Mass., 7-10 mai 1979*. La plupart des communications présentées à ce symposium ont été publiées dans *J. Chromatogr.*, Vol. 185 (1979).

deviation of the analytical chromatogram and the mobile phase flow-rate only. A model, based on this set of properties, is presented and its validity discussed. This model should be of great interest for the optimal control of the column in non-linear preparative chromatography. An example is presented illustrating the experimental determination of the best injection characteristics for the separation of two compounds using the above model.

INTRODUCTION

La technique chromatographique du développement par élution a connu d'abord le succès dans le domaine analytique. Depuis quelques années, cette technique est également utilisée pour la préparation de produits purifiés (chromatographie préparative¹⁻¹⁰). Cette nouvelle utilisation est caractérisée par des conditions d'injection et de distribution du soluté entre les deux phases différentes de celles de la chromatographie analytique.

Pour l'utilisation analytique le profil d'injection est perçu comme une impulsion par la colonne. La distribution du soluté entre les deux phases peut être considérée comme linéaire. Pour l'utilisation préparative le profil d'injection n'est plus perçu comme une impulsion mais peut être assimilé à un créneau. La distribution du soluté entre les phases peut être linéaire ou non-linéaire selon les concentrations injectées.

Nous commencerons par rappeler des résultats de chromatographie linéaire indispensables pour aborder une étude de la chromatographie préparative. Il est à noter que les procédures proposées dans la littérature supposent le plus souvent, explicitement ou non, la linéarité du système chromatographique. Pourtant, la contrainte d'un fonctionnement linéaire est très restrictive du point de vue de l'optimisation de la commande car il est difficile de savoir a priori dans quel domaine se situent les meilleures conditions préparatives. C'est pourquoi nous étudierons expérimentalement la déformation des profils d'élution dans les domaines linéaire et non-linéaire en vue d'optimiser les conditions d'injection (volume et concentration injectés, périodicité) pour un système chromatographique donné.

Nous avons entrepris cette étude en chromatographie d'échange d'ions car les supports échangeurs d'ions possèdent la propriété d'avoir des capacités parfaitement définies (capacités d'échange). Cette propriété permet de bien apprécier les quantités injectées sur une colonne par rapport à sa capacité.

PARTIE THÉORIQUE

Chromatographie linéaire

Systèmes linéaires. Les propriétés des systèmes linéaires peuvent être utilisées pour l'étude des processus chromatographiques en considérant le profil d'injection comme l'entrée du processus et le chromatogramme obtenu comme sortie^{11,12}. De ce point de vue, ce que le chromatographe nomme couramment "chromatogramme analytique" est la réponse impulsionnelle du processus. Sa connaissance permet de prédire la réponse à toute injection de profil donné. La Fig. 1 montre comment la réponse à une injection en créneau est déduite de la réponse impulsionnelle

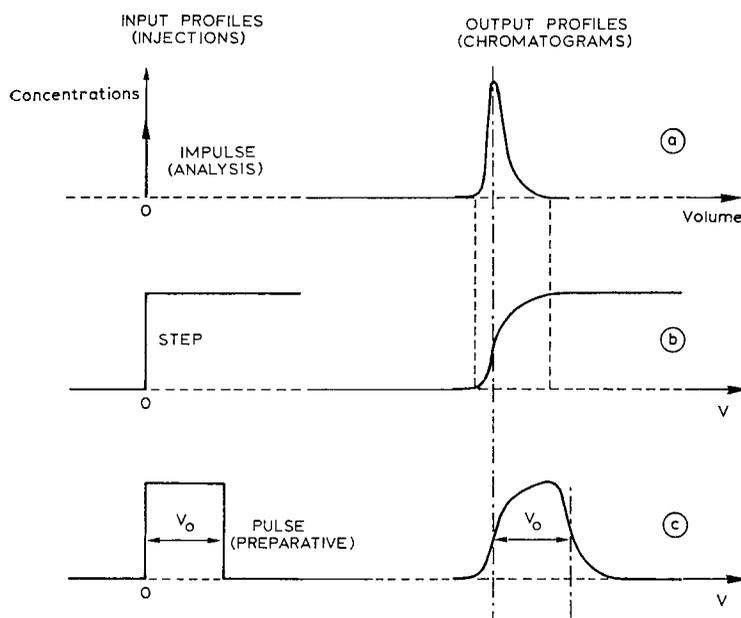


Fig. 1. Application du principe de superposition à la prévision de profils d'élution (comportement linéaire). (a) Réponse impulsionnelle; (b) réponse à un échelon; (c) réponse à un créneau.

en appliquant le principe de superposition. La fonction "échelon" étant l'intégrale de l'impulsion de Dirac, la réponse à un échelon est l'intégrale de la réponse impulsionnelle. Plus généralement, la réponse $y(V)$ est le produit de convolution de l'entrée $x(V)$ par la réponse impulsionnelle $h(V)$:

$$y(V) = \int_0^{\infty} h(V-w) \cdot x(w) \cdot dw \quad (1)$$

Représentation mathématique des profils. Moments. Dans l'étude qui suit, nous allons étudier différents types de profils que nous représenterons par leurs moments dont nous rappelons les définitions.

Si $c(V)$ est le profil de concentration en fonction du volume d'élution V , le moment d'ordre zéro est la quantité injectée Q_0 :

$$M_0 = \int_0^{\infty} c(V) \cdot dV = Q_0$$

Le moment normalisé d'ordre 1 est défini par:

$$M_1 = \frac{1}{M_0} \int_0^{\infty} c(V) \cdot V \cdot dV$$

Le i ème moment normalisé et centré est:

$$M_i = \frac{1}{M_0} \int_0^{\infty} c(V) \cdot (V - M_1)^i \cdot dV \quad i \geq 2$$

A partir de ces moments sont définis les coefficients adimensionnels suivants:

$$\text{coefficient d'asymétrie: } S = \frac{M3}{(M2)^{1.5}}$$

$$\text{coefficient d'aplatissement: } E = \frac{M4}{(M2)^2} - 3$$

Une injection impulsionnelle sera donc représentée par:

$$M0 = Q_0$$

$$M1 = M2 = \dots = Mi = \dots = 0$$

Une injection en créneau (V_0, C_0) par:

$$M0 = V_0 \cdot C_0 = Q_0; \quad M1 = \frac{V_0}{2}; \quad M2 = \frac{V_0^2}{12}; \quad M3 = 0; \quad M4 = -\frac{V_0^4}{120}$$

Les profils de sortie seront généralement représentés par leurs quatre premiers moments. Toutefois, dans le cas d'une réponse impulsionnelle symétrique ou si une approximation suffit, les chromatographistes se limitent généralement aux grandeurs suivantes:

$$Q_0 = M0: \text{ quantité injectée}$$

$$V_R = M1: \text{ volume de rétention}$$

$$N = \frac{(M1)^2}{M2} = \frac{V_R^2}{\sigma^2}: \text{ nombre de plateaux théoriques}$$

Si la fonction de Gauss est utilisée pour représenter le profil, son expression en fonction des paramètres précédents est la suivante:

$$h(V) = \frac{Q_0}{\sigma\sqrt{2\pi}} \cdot \exp\left(-\frac{(V - V_R)^2}{2\sigma^2}\right)$$

Estimation des moments des profils de sortie. L'utilisation des moments pour représenter les profils permet de traduire très simplement l'intégrale de convolution^{13, 14}: les moments du profil de sortie notés Mi_y , s'expriment en fonction de ceux du profil d'injection noté Mi_x et de ceux de la réponse impulsionnelle notés Mi_h par les relations simples:

$$Mi_y = Mi_x + Mi_h \quad i = 1, 2, 3 \quad (2)$$

$$M4_y - 3(M2_y)^2 = (M4_x - 3(M2_x)^2) + (M4_h - 3(M2_h)^2)$$

Ainsi, tant que le comportement est linéaire, il est possible de calculer les moments du profil de sortie à partir de ceux du profil d'injection et de ceux de la réponse impulsionnelle.

La Fig. 2 montre comment utiliser pratiquement ces résultats en chromatographie préparative linéaire à partir du chromatogramme analytique. Dans le cas

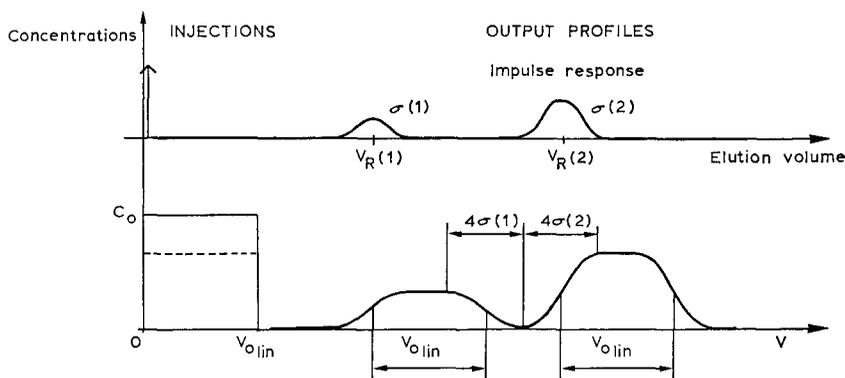


Fig. 2. Chromatographie préparative linéaire. Mélange de deux composés. Réponses impulsionnelles gaussiennes. $V_{0,lin} = V_R(2) - V_R(1) - 2[\sigma(1) + \sigma(2)]$; période d'injection: $\theta = 2[V_R(2) - V_R(1)]/D$ (D = débit; V_R = volume de rétention analytique; σ = écart-type analytique).

d'un mélange binaire et si les pics analytiques sont gaussiens, le volume maximum injectable conservant une séparation complète des deux composés est donné par l'expression connue:

$$V_0 = V_R(2) - V_R(1) - 2(\sigma(1) + \sigma(2)) \quad (3)$$

où $V_R(1)$, $\sigma(1)$ et $V_R(2)$, $\sigma(2)$ représentent les réponses analytiques de ces deux composés.

Chromatographie non-linéaire

Test de linéarité. La non-linéarité du comportement du processus peut être due à la distribution du composé entre les deux phases (courbure de l'isotherme) ou à des phénomènes d'écoulement ou de mélange défectueux des composés.

Lors de la mise au point des meilleures conditions d'injections préparatives, il est important de tester la linéarité du comportement. Un test simple peut être déduit des relations (2). Il consiste à comparer les moments invariants de la réponse impulsionnelle Mi_h , calculés auparavant, à la différence: $(Mi_y - Mi_x)$ correspondant aux conditions d'injection pour lesquelles on désire savoir si le comportement est linéaire ou non. Si $(Mi_y - Mi_x)$ est significativement différent de Mi_h , le comportement est non linéaire.

Modèles non-linéaires. Si le comportement du processus n'est plus linéaire, les profils de sortie ne peuvent plus être déduits de l'intégrale de convolution. Un modèle non-linéaire doit nécessairement prendre en compte dans sa structure le volume et la concentration injectés. Pour élaborer un tel modèle, deux approches sont possibles:

(a) L'approche physico-chimique est utilisée lorsqu'on désire élaborer un modèle de représentation interne du processus. Quelques auteurs ont étudié les solutions mathématiques des équations physico-chimiques dans le cas de profils d'injection ayant la forme d'un créneau ou d'une gaussienne¹⁵. Leurs résultats ne sont valables que pour de faibles écarts par rapport au comportement linéaire.

D'autres auteurs, se plaçant du point de vue de la conception de systèmes préparatifs, ont étudié les facteurs physico-chimiques intervenant dans la surcharge des colonnes. De telles études ont été faites aussi bien en chromatographie en phase liquide¹⁶ qu'en chromatographie en phase gazeuse¹⁷.

(b) La seconde approche consiste à faire appel à un modèle de représentation externe du processus. Un modèle physico-chimique n'est pas nécessaire si le but poursuivi est de déterminer les meilleures conditions d'injection pour un système donné et une séparation donnée en chromatographie préparative. Un modèle, linéaire ou non-linéaire, permettant de prédire la forme du profil de sortie pour une injection donnée est suffisant dans ce cas. Un tel modèle —dit de représentation externe— peut être élaboré à partir d'une étude expérimentale sans faire fondamentalement appel à des considérations physico-chimiques.

Le but principal de ce travail est de décrire l'élaboration d'un tel modèle non-linéaire qui demande la réalisation d'un plus grand nombre d'expériences qu'un modèle linéaire.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Appareillage

Nous avons utilisé un chromatographe construit par nos soins équipé d'une pompe pneumatique Haskel (Burbank, Calif., U.S.A.) spéciale pour chromatographie.

Les injections de volumes inférieurs à 4 ml sont réalisées par l'intermédiaire de boucles d'échantillonnage et d'une vanne à 6 voies, construites par nos soins. Pour les injections de volumes supérieurs à 4 ml, nous avons utilisé une pompe seringue Varian type 8510 (Varian, Palo, Alto Calif., U.S.A.).

La colonne est constituée d'un tube inox 316, de diamètre intérieur 1.05 cm (diamètre extérieur 1/2 in.), de longueur 47 cm et de volume 40.7 ml. Les extrémités de ce tube sont équipées de raccords réducteurs Swagelok 1/2-1/16 in. de façon à limiter les volumes morts dans les connexions.

La détection est effectuée par absorptiométrie dans l'ultra-violet à l'aide d'un spectrophotomètre Varian Variscan. Nous avons travaillé sur la sensibilité 0.5 D.O. de l'appareil de façon à rester dans le domaine linéaire de la loi de Lambert-Beer. La longueur d'onde est choisie de façon à pouvoir utiliser cette sensibilité à n'importe quelle concentration. Le signal de détection est mesuré par un millivoltmètre numérique Schlumberger 7144 (Paris, France) puis traité sur calculateur Hewlett-Packard 9825 (Palo Alto, Calif., U.S.A.).

Les moments du profil de sortie sont calculés par la méthode d'intégration de Simpson. Les données sont traitées de la façon suivante: La période d'échantillonnage est de 15 sec ($\sqrt{M_2 n/8}$); la ligne de base est estimée avant et après le pic par la moyenne sur 40 points expérimentaux; les bornes d'intégration t_0 et t_m sont déterminés par le seuil $c(t_0) = c(t_m) = 1/100 c(t_{max.})$. (Le rapport signal sur bruit étant voisin de 100.)

Produits

La phase stationnaire est une résine échangeuse d'anions du type base forte triméthylammonium de granulométrie inférieure à 65 μm (résine Dowex AG 1-X8

minus 400 mesh, granulométrie humide 230 mesh; Bio-Rad Labs., Richmond, Calif., U.S.A.). La phase mobile est une solution aqueuse molaire d'acétate d'ammonium de qualité R. P. no. 2120029 (Prolabo, Paris, France), tamponnée à pH 9 avec une solution d'ammoniaque à 25% de qualité Merck no. 5432.

Nous avons choisi comme soluté le maléate d'ammonium, d'une part parce que son comportement chromatographique a déjà été étudié dans notre laboratoire¹⁸, d'autre part à cause de sa grande solubilité dans l'eau, ce qui permet de faire varier dans un large domaine la concentration des solutions injectées. De plus, la faible valeur de son coefficient d'extinction moléculaire permet un dosage en continu par absorption dans l'ultra violet. Nous avons mis en solution, dans la phase mobile, de l'acide maléique de qualité Merck no. 800380 (Merck, Darmstadt, R.F.A.).

Caractéristiques chromatographiques

La colonne chromatographique a été remplie sous 80 atm avec une suspension de la résine dans la phase mobile afin d'éviter tout échange ionique. Elle renferme 19 g de résine sèche et sa capacité d'échange est de 72 milliéquivalents (mequiv.) Le volume mort, déterminé en mesurant la rétention de Co^{2+} et de $\text{Cu}(\text{NH}_3)_2^{2+}$ est de 12 ml.

Dans le but de tester les propriétés chromatographiques de la colonne préparative (que nous noterons "colonne P"), nous avons comparé, sur la séparation du maléate et du fumarate, ses performances à celles d'une colonne analytique de diamètre intérieur 2.1 mm, de même longueur, remplie avec la même résine (colonne A). Le Tableau I montre que l'efficacité de la colonne P est supérieure à celle de la colonne A. Ceci peut s'expliquer par un meilleur remplissage de la colonne P et par l'élimination de l'influence de la paroi; la condition de diamètre infini de Knox et Parcher¹⁹:

$$d_c > (2.4 L \cdot d_p)^{1/2}$$

se trouve en effet satisfaite. De plus, à vitesse linéaire égale, on observe une pression d'entrée supérieure sur la colonne P, ce qui confirme un meilleur remplissage de celle-ci et une perméabilité plus homogène^{20, 21}. A première vue, la valeur de la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) réduite h calculée pour le fumarate sur la colonne P paraît élevée si l'on se réfère à l'équation de Bristow et Knox²², puisqu'ici:

$$d_p = 60 \mu\text{m} \text{ et } h = \frac{H}{d_p} = 55$$

TABLEAU I

COMPARAISON DES EFFICACITÉS D'UNE COLONNE ANALYTIQUE ET D'UNE COLONNE PRÉPARATIVE DE MÊME LONGUEUR ($L = 50$ cm)

Phase stationnaire: Dowex AG1-X8 minus 400 mesh. Phase mobile: acétate d'ammonium 1 M, pH 9. Vitesse linéaire: 1.1 cm/sec.

	<i>Colonne analytique (A)</i>	<i>Colonne préparative (P)</i>
Diamètre intérieur (mm)	2.1 (1/8 in.)	10.5 (1/2 in.)
Perte de charge (atm)	10	25
Maléate HEPT (mm)	11.5	5.3
Fumarate HEPT (mm)	4.8	3.2

Cette valeur s'explique compte-tenu de la valeur élevée de la vitesse réduite de la phase mobile ν . En effet:

avec: $D_m = 1.2 \times 10^{-5}$ cm²/sec (évalué par la relation de Wilke et Chang²³)

$$\text{on obtient: } \nu = \frac{ud_p}{D_m} = 550$$

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dans tout ce qui suit, nous assimilerons les profils d'injection à des créneaux (V_0, C_0). Nous avons étudié l'influence respective du volume V_0 et de la concentration C_0 du soluté injecté sur la forme du profil de sortie. Si ces injections sont représentées sur un diagramme volume-concentration injectés, les courbes "iso-quantité" sont des hyperboles (Fig. 3): $Q_0 = V_0 \cdot C_0$. La capacité d'échange de la colonne est représentée par une hyperbole de quantité 72 mequiv. ($m \cdot C_E = Q_E$) m étant la masse de résine dans la colonne et C_E sa capacité d'échange exprimée en mequiv./g.

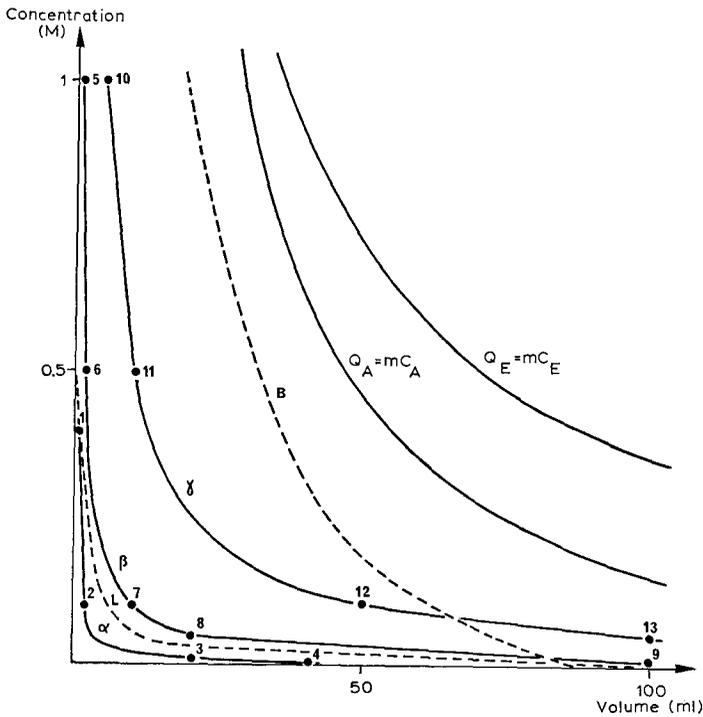


Fig. 3. Diagramme des volumes et concentrations injectés. α : quantité injectée: $Q_0 = 0.4$ mequiv.; β : $Q_0 = 2$ mequiv.; γ : $Q_0 = 10$ mequiv.; $Q_A = m \cdot C_A$: capacité disponible de la colonne; $Q_E = m \cdot C_E$: capacité d'échange de la colonne. B: Frontière entre les injections (V_0, C_0) donnant un profil avec palier et celles donnant un profil sans palier; L: frontière entre les comportements linéaire et non-linéaire.

Étude des profils obtenus en chromatographie analytique (Comportement linéaire)

Dans cette partie, nous avons injecté des quantités "analytiques", au plus égales à 0.1 % de la capacité totale de la colonne. Etant données les faibles valeurs de

V_0 , la déconvolution des moments des profils de sortie n'entraîne ici que des corrections inférieures à 1 % sur les paramètres: $M1$, N , S et E .

Le Tableau II montre que le volume d'éluion au maximum du pic (V_{max}), qui est couramment utilisé pour mesurer le volume de rétention V_R , est systématiquement inférieur d'environ 2 % au moment d'ordre 1 du profil ($M1$). Ces 2 grandeurs diminuent légèrement avec la quantité injectée, ce qui s'explique par la convexité de l'isotherme, même pour ces faibles concentrations^{24,25}. Dans tout ce domaine, le nombre de plateaux théoriques N est sensiblement égal à 88. La dispersion sur le calcul de $M2$ ($\pm 6\%$) ne laisse pas apparaître une variation significative de N en fonction de la quantité injectée.

TABLEAU II

CARACTÉRISTIQUES DES PROFILS OBTENUS À PARTIR DES INJECTIONS ANALYTIQUES

Q_0 = quantité de soluté injecté; V_0 = volume de soluté injecté; V_{max} = volume d'éluion au maximum du pic; $M1$ = moment d'ordre 1; C_0 = concentration du soluté injecté; C_{max} = concentration du soluté au maximum du pic.

Q_0 (mequiv.)	V_0 (ml)	V_{max} (ml)	$M1$ (ml)	Q_0/C_{max} (ml)	C_0/C_{max}
10^{-2}	0.5			94.8	174
	1	325 ± 1	331 ± 1	82.1	74
	2			91.8	45
$4 \cdot 10^{-2}$	0.5			85	156
	1	320 ± 1	326 ± 1	85.5	77
	2			85.7	42
$8 \cdot 10^{-2}$	0.5			83.9	154
	1	317 ± 1	320 ± 1	87.7	79
	2			87.7	43

La valeur positive du coefficient d'asymétrie S voisine de 0.3, est due à la traînée arrière du profil. Le coefficient d'aplatissement E reste pratiquement nul.

Le rapport C_0/C_{max} (Tableau II), qui définit la dilution du soluté au maximum du pic d'éluion ne dépend que du volume injecté. Il revient au même de dire que la concentration au maximum du pic C_{max} est proportionnelle à la quantité injectée Q_0 et reste indépendante de C_0 et V_0 pris individuellement. Cela signifie que le fonctionnement de la colonne est linéaire, qu'elle perçoit les injections analytiques de ce type comme des impulsions de Dirac et non comme des créneaux de concentration et de volume finis. Augmenter le volume injecté constitue donc un bon moyen pour obtenir une dilution minimale en sortie de colonne. Il ne sert à rien, de ce point de vue, de concentrer le produit avant son injection.

Il est à remarquer que la valeur constante de Q_0/C_{max} est proche de celle qu'on obtiendrait avec la fonction de Gauss. En effet, dans ce cas:

$$\frac{Q_0}{C_{max}} = \sigma \cdot \sqrt{2\pi}$$

Pour nos profils: $\sigma = 35 \pm 1$ ml

$$\sigma\sqrt{2\pi} = 88 \pm 3$$
 ml

Cette valeur est bien en accord avec les valeurs de Q_0/C_{max} données dans le Tableau II. Ce résultat est dû à la forme quasi-gaussienne des réponses analytiques enregistrées.

Étude des profils obtenus en chromatographie préparative (Comportement non-linéaire)

Nous avons ensuite étudié le comportement du processus chromatographique dans le domaine préparatif, c'est-à-dire pour des injections variant de 0.2 à 10 mequiv., soit respectivement 0.3 et 14% de la capacité totale. Dans ce domaine de charge l'effet de la non-linéarité est significatif. Nous avons utilisé systématiquement le test de linéarité présenté plus haut de façon à préciser les limites des fonctionnements linéaire et non-linéaire. Cette frontière est représentée sur la Fig. 3. Le test a porté sur les deux premiers moments.

Malgré l'importance de l'effet non-linéaire, les paramètres "déconvolués" restent intéressants pour accéder à l'effet de la colonne seule et comprendre son fonctionnement dans ce domaine. Bien entendu, si l'on ne se place plus du point de vue de la compréhension des phénomènes mais de celui —pratique— de la séparation des composés, les paramètres à considérer sont les paramètres non déconvolués.

Les résultats obtenus rassemblés dans le Tableau III entraînent les remarques suivantes:

TABLEAU III

CARACTÉRISTIQUES DES PROFILS D'ÉLUTION À PARTIR D'INJECTIONS PRÉPARATIVES

No. = numéro du point expérimental sur la Fig. 3; Q_0 = quantité de soluté injectée (meq.); V_0 = volume de soluté injecté (ml); V_{max} , C_{max} = volume d'éluion et concentration du soluté au maximum du pic; $M1$ = moment d'ordre 1 (volume de rétention en ml); N = nombre de plateaux; S = coefficient d'asymétrie; E = coefficient d'excès; 0 = paramètre "non-déconvolué"; $'$ = paramètre "déconvolué".

No.	Q_0 (mequiv.)	V_0 (ml)	Q_0/C_{max} (ml)	C_0/C_{max}	V_{max} (ml)	$M1^0$ (ml)	$M1'$ (ml)	N^0	N'	S^0	E^0
1	0.4	0.5	85	156	294	306	306	88	88	0.89	0.79
2		2	84.2	41.3	299	310	309	75	75	0.48	0.22
3		20	82	4.1	315	327	317	91	88	0.42	0.20
4		40	89.2	2.2	334	343	323	86	84	0.44	0.11
5	2	1	91	82	235	265	265	39	39	0.90	0.65
6		2	86.5	42.4	242	271	270	44	44	0.91	0.73
7		10	82.7	8.2	249	275	270	51	50	0.86	0.52
8		20	87	4.3	261	288	278	52	50	0.85	0.55
9		100	120	1.2	318	339	289	60	84	0.61	0.07
10	10	5	98.5	19.7	146	194	192	14	13	1.02	0.59
11		10	93.5	9.3	150	198	193	14	13	1.10	0.91
12		50	91	1.8	181	231	206	18	15	1.04	0.64
13		100	132	1.3	223	274	224	25	24	0.93	0.44
Réponse impulsionnelle			87				330	88	0.3	0	

(a) Le volume d'effluent V_{max} , mesuré au sommet du pic d'éluion et le moment d'ordre 1 déconvolué noté $M1'$ diminuent quand la quantité injectée augmente, à cause de la non linéarité de l'isotherme. L'écart entre V_{max} et $M1'$ augmente avec la charge puisque le chromatogramme se déforme de plus en plus.

A charge constante, les variations de V_{\max} . et du moment d'ordre 1 non déconvolué $M1^0$ dues à cette non-linéarité sont masquées par le volume injecté V_0 . La non-linéarité est plus clairement mise en évidence par la variation du moment d'ordre 1 déconvolué ($M1'$), qui est toujours inférieur au volume de rétention analytique (330 ml), et qui décroît quand la concentration injectée C_0 augmente.

(b) Le nombre de plateaux non déconvolué N^0 diminue quand la quantité injectée augmente. A partir d'une quantité injectée de 2 mequiv., qui représente 2.8 % de la capacité totale de la colonne, on observe une diminution très importante de N^0 .

L'effet du volume injecté sur le nombre de plateaux (effet qui est appelé "surcharge en volume" dans certains articles) peut être supprimé en calculant ce paramètre à partir des moments déconvolués :

$$N' = \frac{(M1')^2}{M2'}$$

La diminution de N' par rapport à la valeur analytique $N = 88$ n'est alors due qu'à la non-linéarité, c'est-à-dire à une modification du fonctionnement de la colonne. A ce sujet, il est intéressant de faire la distinction entre l'efficacité d'un processus définie à partir de sa réponse impulsionnelle par :

$$N = \frac{(M1_h)^2}{M2_h}$$

et la valeur N^0 qui, elle, dépend du volume injecté V_0 (pour un

comportement linéaire: $N' = N$).

(c) A charge constante, N' est d'autant plus grand que le soluté injecté est plus dilué. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par De Stefano et Beachell²¹ et par Done²⁷ en chromatographie d'adsorption.

(d) Les coefficients d'asymétrie S^0 et d'aplatissement E^0 du profil de sortie augmentent avec la quantité injectée. Pour une quantité constante, ces deux coefficients diminuent lorsque V_0 augmente. Cela s'explique par le fait que pour les grands volumes, le profil de sortie garde globalement l'allure symétrique du profil d'injection en créneau. Un résultat analogue a déjà été mis en évidence en chromatographie en phase gazeuse²⁸.

Pour tous les points expérimentaux reportés dans le Tableau III, sauf pour les plus grands volumes injectés (points 9 et 13), le rapport Q_0/C_{\max} . conserve une valeur I indépendante de Q_0 , V_0 et C_0 . Ici I vaut 88 ml. Cette invariance est remarquable lorsque le comportement est fortement non-linéaire. La dilution Q_0/C_{\max} . reste indépendante de la quantité injectée et est uniquement liée, comme dans le cas des injections impulsionnelles, au volume injecté.

A titre d'exemple, l'injection de 10 meq sous la forme de 50 ml d'une solution 0.1 M ou sous la forme de 5 ml d'une solution molaire conduit à la même concentration, C_{\max} ., au sommet du profil d'élution soit environ $5 \cdot 10^{-2} M$. Il est donc inutile de concentrer au préalable la solution à injecter dans le but de recueillir un effluent plus concentré en soluté. De plus, d'autres propriétés apparaissent en représentant les profils d'élution en prenant la fin des injections comme origine des abscisses.

(e) Les profils d'élution obtenus pour une même quantité injectée $Q_0 = V_0 \cdot C_0$

mais avec des couples (V_0, C_0) différents sont pratiquement superposables. Les fronts avant des profils sont d'autant plus raides que la quantité injectée est grande.

(f) A partir de leur sommet les profils se raccordent à une courbe enveloppe $C(V)$ qui est quasi-exponentielle. La constante de cette exponentielle est égale à l'invariant I mentionné précédemment :

$$C(V) = C_m \cdot \exp\left(-\frac{(V - V_m)}{I}\right)$$

V_m est le volume mort de la colonne et C_m un paramètre du processus qui peut être déterminé en ajustant l'exponentielle aux valeurs expérimentales (Fig. 4).

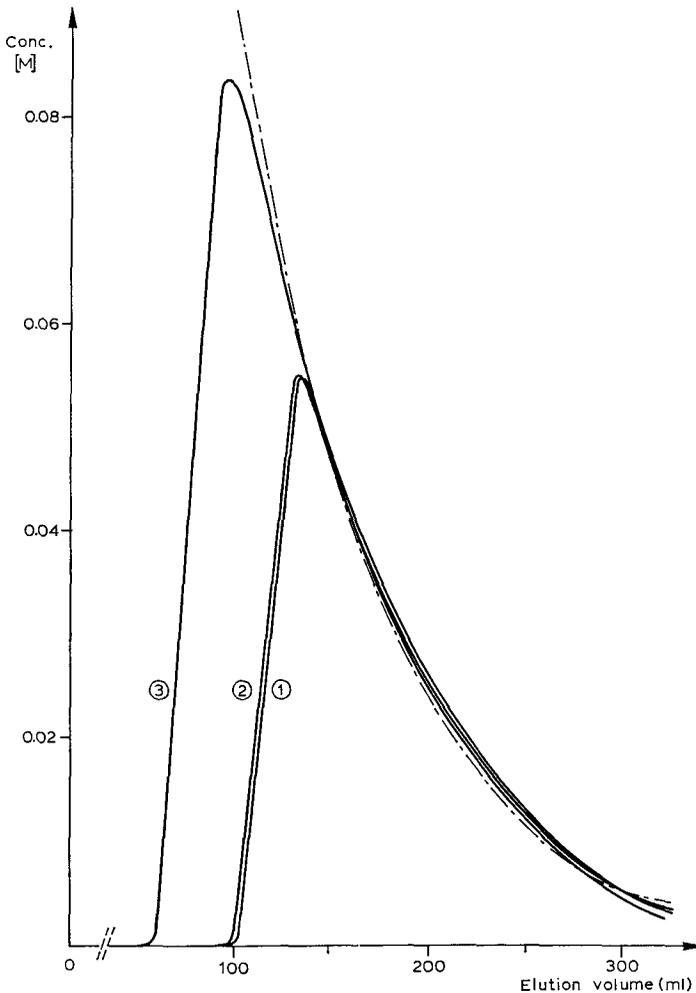


Fig. 4. Enveloppe exponentielle de la partie arrière des profils fortement non-linéaires. Origine des abscisses: fin des injections. 1: $V_0 = 10$ ml; $C_0 = 0.5$ M; $Q_0 = 10$ mequiv. 2: $V_0 = 50$ ml; $C_0 = 0.1$ M; $Q_0 = 10$ mequiv. 3: $V_0 = 10$ ml; $C_0 = 0.75$ M; $Q_0 = 15$ mequiv. —.—, Enveloppe exponentielle obtenue par les moindres carrés.

Ces deux propriétés sont liées au fait que la quantité $Q_0 = C_{\max} \cdot I$ est égale à l'aire comprise sous l'exponentielle limitée à l'abscisse V_{\max} .

Les limites de validité de ce comportement dans le diagramme des injections (V_0, C_0) (Fig. 3) sont explicitées au p. 69.

Nous avons également étudié le raccordement du profil d'élution à la ligne de base. Pour cela, nous avons mesuré la concentration C_F correspondant au volume $V_F = V_R + 2\sigma$ avec $V_R = M1_h$ et $\sigma = \sqrt{M2_h}$.

En chromatographie analytique, il est généralement admis que V_F correspond à la quasi-totalité de l'élution du composé (97.8% pour une réponse analytique gaussienne). Pour tous les points expérimentaux de la Fig. 3 les valeurs de C_F restent comprises entre 2 et 4% de C_{\max} . Ce résultat montre que la notion d'enveloppe pour la trainée arrière de tous les profils n'est plus valable autour de $V_R + 2\sigma$. Néanmoins, la quantité restant à éluer à partir de ce volume est de l'ordre de 2 à 4% de la quantité totale injectée, ce qui ne justifie pas une remise en cause du modèle exponentiel proposé.

D'autres résultats obtenus avec des phases mobiles et des solutés différents mais avec la même vitesse de phase mobile donnent des valeurs de I proportionnelles à l'écart-type analytique $\sigma = \sqrt{M2_h}$. Nous avons également constaté que pour une phase mobile et un soluté donnés, I ne dépend pas de la vitesse de la phase mobile du moins pour des vitesses comprises entre 0.15 et 1.5 cm/sec. Le développement de cette propriété a l'avantage de relier les comportements linéaire et non-linéaire du processus.

Étude des profils obtenus avec saturation de la phase stationnaire de la colonne

Cette étude permet de visualiser qualitativement le processus de dessaturation d'une bande de soluté au cours de son élution à l'intérieur d'une colonne, donc d'interpréter physiquement les résultats précédents. Elle nous permet également de tracer l'isotherme de distribution à saturation, c'est-à-dire de déterminer la capacité disponible, paramètre important du point de vue préparatif. Comme le soluté est mis en solution dans la phase mobile, il existe en effet pour les groupements échangeurs une réaction de compétition entre les ions du soluté et les ions éluants. La capacité de la colonne, disponible pour le soluté, n'est donc plus égale à la capacité d'échange de la phase stationnaire.

Nous avons injecté sur la colonne un créneau de concentration C_0 et de volume V_0 suffisamment grand pour que la concentration du soluté en sortie de colonne atteigne C_0 . Il est clair que cette façon de procéder n'est jamais utilisée dans la pratique mais elle permet d'appréhender le développement en tête de colonne lors de l'injection d'un créneau de concentration de grand volume.

A titre d'exemple la Fig. 5 représente le profil d'élution obtenu après une injection jusqu'à saturation de la capacité disponible Q_A de la colonne. Ce profil, qui présente deux paliers est le cas extrême observable en développement par élution. L'aire hachurée mesure la capacité disponible de la colonne Q_A relative à la concentration injectée C_0 . L'isotherme de distribution à saturation (isotherme statique) représentée en trait plein sur la Fig. 6 a été déterminée point par point en fonction de C_0 .

Le palier de concentration C_0 se termine au volume $V_0 + V_m$, V_m étant le volume mort de la colonne. La concentration du second palier C_p dépend de C_0

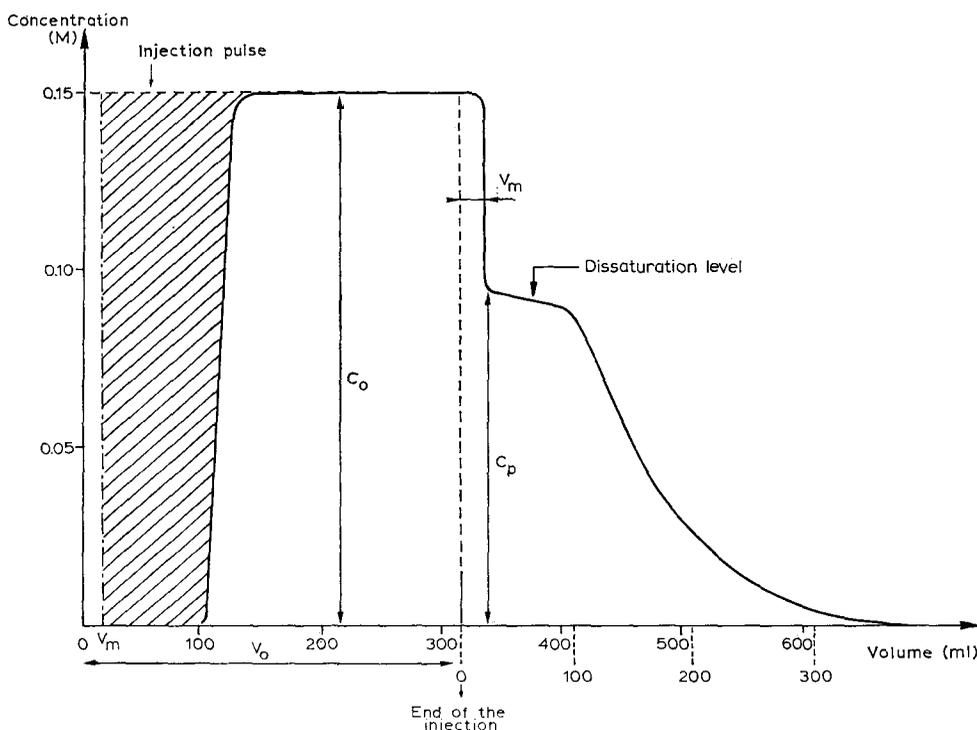


Fig. 5. Profil d'éluion de la colonne saturée. L'aire hachurée représente la capacité disponible Q_A de la colonne.

comme le montre la Fig. 7. C_p est voisin de C_0 lorsque C_0 est faible et tend vers la valeur $C_m = 0.23 M$ pour de très grandes valeurs de C_0 (environ $2 M$).

Nous avons simulé ce comportement à l'aide d'un modèle des plateaux non-linéaire dont on trouvera les hypothèses et l'algorithme en annexe. La Fig. 8 représente les variations de la quantité de soluté dans la phase mobile du p ème plateau à un instant donné. $Q_m(p)$ est un profil isochrone. T est le nombre de transferts du modèle. L'amplitude du palier qui apparait sur l'isochrone $T = 35$ est la somme des termes d'une progression géométrique. Cette somme converge assez rapidement. Les quantités $Q_m(p)$ contenues dans la phase mobile de deux plateaux consécutifs ne différant que d'un seul terme sont pratiquement égales, d'où l'existence d'un palier de concentration qui correspond à la concentration limite de saturation C_p dans la phase mobile (voir Fig. 6, isothermes en tiretés):

$$Q_m(p) = \left(\frac{1}{1+k} + \frac{1}{(1+k)^2} + \dots + \frac{1}{(1+k)^n} \right) \Delta m \cdot C_A =$$

$$\frac{1}{k} \Delta m \cdot C_A = \frac{m \cdot C_A}{N \cdot k}$$

m est la masse de résine contenue dans la colonne, Δm la masse de résine par plateau, C_A la capacité disponible rapportée à l'unité de masse de phase stationnaire

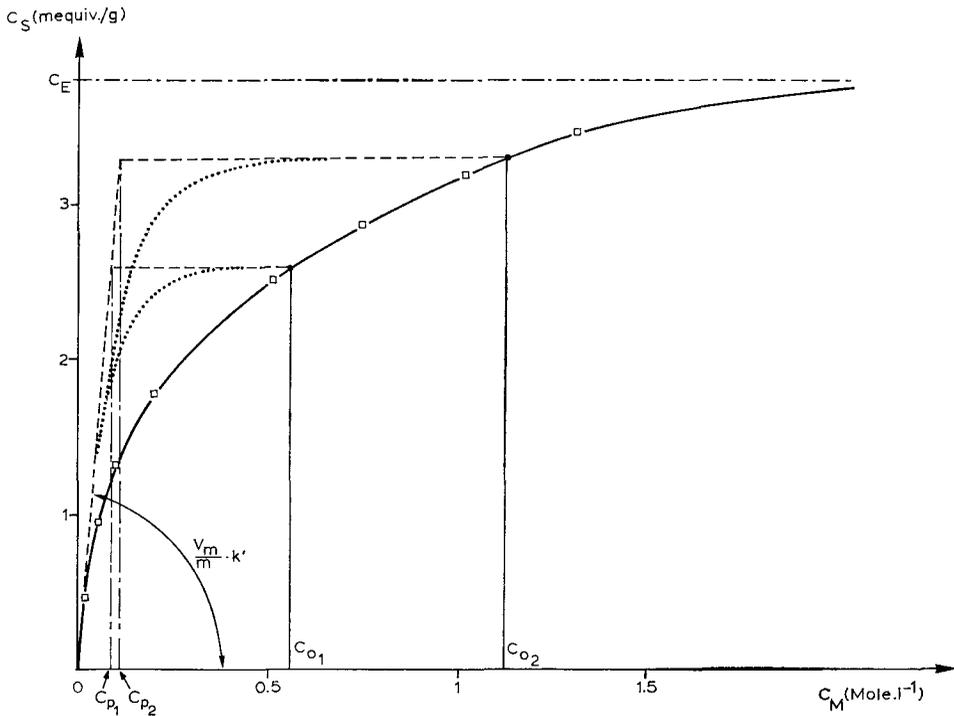


Fig. 6. Isothermes de distribution. Trait plein : isotherme expérimentale de l'anion maléate déterminée par saturation (isotherme statique). Tiretés : isothermes du modèle des plateaux décrit en annexe relatives aux concentrations injectées C_{o1} et C_{o2} (isothermes dynamiques). Pointillés : isothermes dynamiques, convexes avant saturation.

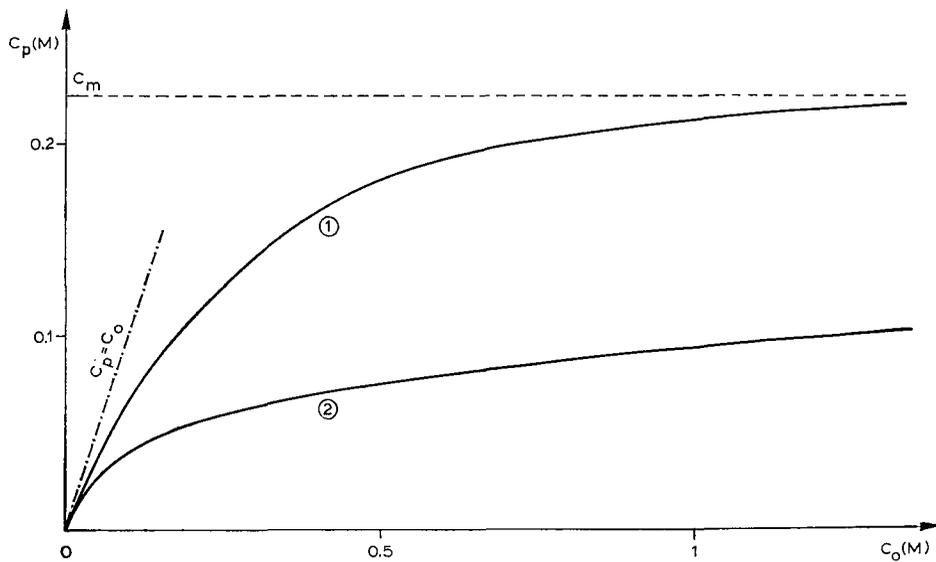


Fig. 7. Variation de la concentration C_p du palier de dessaturation en fonction de la concentration injectée C_o . 1 : Courbe expérimentale; 2 : $m \cdot C_A / V_m \cdot k' = f(C_o)$.

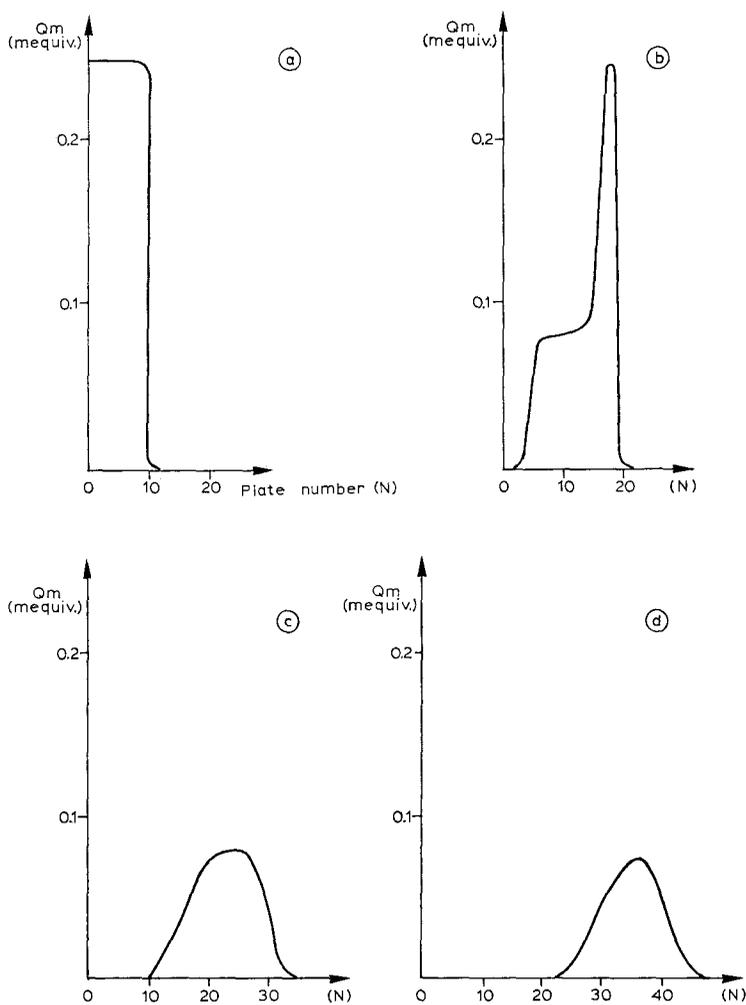


Fig. 8. Variation de la distribution du soluté à l'intérieur de la colonne au cours de son élution (courbes isochrones). a: $T = 20$; b: $T = 35$; c: $T = 100$; d: $T = 200$. T : nombre de transferts; Q_m : quantité de soluté dans la phase mobile; nombre de plateaux: $N = 60$; capacité d'échange de la colonne $Q_E = 19.2$ mequiv. $k' = 4$, $Q_0 = 5$ mequiv., $J = 20$.

et k le facteur de capacité qui varie au cours de la progression de la bande dans la colonne chromatographique. On a alors:

$$C_p = \frac{N}{V_m} Q_m(p) = \frac{m \cdot C_A}{V_m \cdot k}$$

Nous avons représenté sur la Fig. 7, en fonction de C_0 , les valeurs de

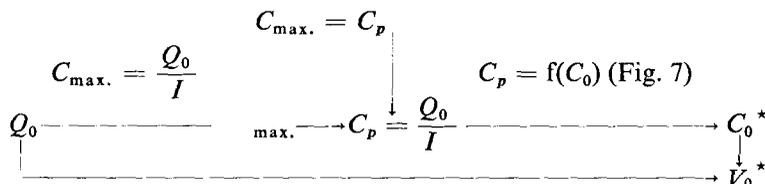
$$C_p = \frac{m \cdot C_A}{V_m \cdot k}$$

calculées en prenant pour C_A les valeurs de l'isotherme statique de la Fig. 6 et pour k la valeur analytique k' du facteur de capacité. Ces calculs supposent que pour

Il est à noter que pour toute quantité donnée Q_0 les trois types de profils signalés plus haut sont possibles suivant les valeurs de V_0 et C_0 .

Les résultats précédents permettent de déterminer les conditions à satisfaire pour le couple (V_0, C_0) de façon que le profil de sortie ne présente pas de palier.

Pour Q_0 donné: $C_0 > C_0^*$ (ou $V_0 < V_0^*$), la recherche des couples limites se fait à l'aide du schéma suivant:



Sur le diagramme "volume-concentration injectés" (Fig. 3), l'ensemble des couples (V_0^*, C_0^*) définit la courbe B. Il est à noter que le volume V_0^* reste inférieur à I vers lequel il tend pour les faibles concentrations injectées ($C_0 < 10^{-2} M$). Dans ce cas en effet, $C_p \approx C_0$ et $C_{max.}$ atteint C_0 pour $V_0 = I$.

Pour un volume V_0 supérieur à I , par exemple pour les points expérimentaux no. 9 et 13 où $V_0 = 100$ ml, le palier C_p existe toujours et $Q_0/C_{max.} > I$.

Enfin, $C_{max.}$ ne peut pas dépasser la limite supérieure C_m vers laquelle tend C_p quant C_0 augmente. Les mesures à saturation (Fig. 7) donnent la valeur $C_m = 0.23 M$, en bon accord avec celle obtenue au paragraphe *Étude des profils obtenus en chromatographie préparative (Comportement non-linéaire)* à partir de l'extrapolation de l'exponentielle ajustée.

Application du modèle à la chromatographie préparative. Séparation des anions maléate et fumarate

Les résultats que nous venons de présenter sont d'une grande importance en chromatographie préparative. De ce point de vue, le profil le plus intéressant est celui qui s'étale le moins, c'est-à-dire celui qui ne présente pas de palier. Pour une séparation donnée, le schéma précédent permet de trouver la meilleure injection (V_0^*, C_0^*) relativement au compromis quantité-résolution et à la dilution apportée par la colonne chromatographique. Nous présentons ci-dessous un exemple de séparation de deux composés tel que le taux de récupération soit de 1 (résolution totale); le processus relatif au composé le moins retenu noté (1) soit linéaire; le processus relatif au composé le plus retenu (2) soit non-linéaire.

Ce cas de figure est assez fréquent. Il peut être dû aux propriétés chromatographiques des deux composés ou bien à la prédominance du composé (2) dans le mélange. De plus, nous avons noté que le seuil de non-linéarité apparaît pour une quantité injectée d'autant plus faible que le composé est plus retenu.

La Fig. 10 schématise la mise en oeuvre de la procédure que nous proposons pour un cas de séparation des acides maléique et fumarique²⁹. La Fig. 10a représente le chromatogramme analytique c'est-à-dire les réponses impulsionnelles de (1) et (2). La Fig. 10b représente la séparation obtenue avec un comportement linéaire pour les deux composés lorsqu'on injecte le volume maximum $V_{0_{lin}}$ donné par l'expression (3). Notons que le modèle linéaire ne fournit aucune indication concernant la concentration maximum injectable. Celle-ci doit être déterminée expérimentalement.

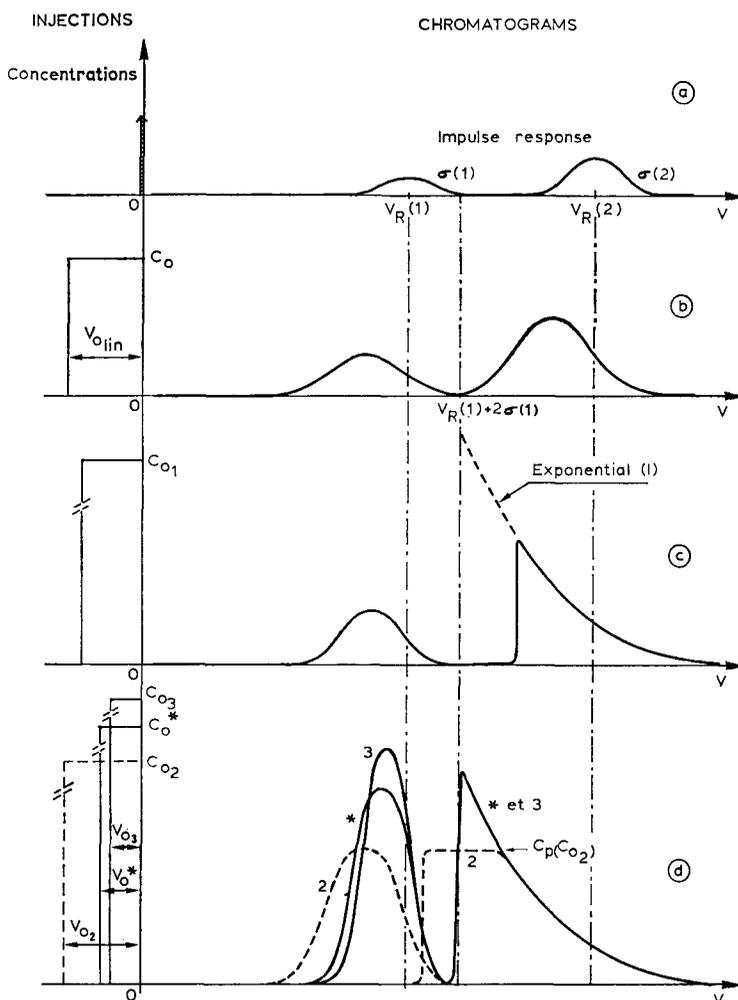


Fig. 10. Détermination de la meilleure injection pour un système préparatif donné. a: Chromatogramme analytique; b: injection optimum avec la contrainte d'un comportement linéaire; c: augmentation de la quantité injectée: comportement fortement non-linéaire du composé (2) (traînée exponentielle); d: quantité injectée $Q_0 = Q_0^*$; $C_{O_2} < C_0^*$: apparition d'un palier C_p ; $C_{O_3} > C_0^*$: pas de palier. Profil (2) invariant.

Sur la Fig. 10c, le comportement non-linéaire de (2) apparaît alors que celui de (1) est toujours linéaire. Le front avant de (2) se rapproche de l'origine (fin des injections) alors que la traînée arrière reste fixe.

La quantité maximum injectable Q_0^* est définie par la contrainte du taux de recouvrement (résolution). Elle est égale à l'aire sous la traînée exponentielle de (2), limitée au point d'abscisse $V_R(1) + 2\sigma(1)$. Sur la Fig. 10d nous avons représenté les chromatogrammes obtenus avec la quantité maximum injectable Q_0^* mais avec des couples (V_0, C_0) différents. Lorsque la concentration injectée est supérieure à la valeur C_0^* précédemment définie, nous obtenons toujours sensiblement le même profil

pour le composé (2) (Fig. 10d, cas no. 3). Lorsque C_0 est inférieur à C_0^* , il y a apparition du palier qui provoque un décalage important du front avant, ce qui fait chuter la résolution. La condition: $C_0 > C_0^*$ est donc nécessaire pour obtenir une séparation optimale.

En résumé, le profil de sortie du composé (1) est prévisible en utilisant le principe de superposition puisque le comportement est linéaire. Le profil du composé (2) se déduit d'une ou deux expériences telles que celles schématisées sur la Fig. 10c.

D'autre part, l'étude du raccordement des profils arrières sur la ligne de base que nous avons présentée plus haut permet de définir la période minimum entre deux injections.

Rappelons qu'en chromatographie préparative linéaire, cette période minimum θ est donnée par l'expression:

$$\theta = \frac{V_R(2) - V_R(1) + V_0 + 2[\sigma(1) + \sigma(2)]}{D}$$

où D est le débit constant de la phase mobile. L'indice 1 est relatif au composé le moins retenu et l'indice 2 au composé le plus retenu.

Dans le cas de la séparation non-linéaire que nous présentons, les propriétés relevées à propos du raccordement des profils non-linéaires montrent que l'expression précédente reste valable. Ainsi, la période des injections ne se trouve pas augmentée par le comportement non-linéaire du composé (2).

CONCLUSION

L'influence de la quantité injectée sur la forme des profils d'éluion a été étudiée systématiquement et particulièrement dans le domaine de comportement non-linéaire du processus chromatographique. Les propriétés mises en évidence ont permis l'élaboration d'un modèle simple de représentation externe non-linéaire. Pour un processus donné, l'estimation des deux paramètres définissant le modèle nécessite peu d'expériences. Ce modèle rend possible l'optimisation d'une séparation préparative lorsque le chromatographe désire s'affranchir des limitations imposées par un comportement linéaire.

Il serait évidemment intéressant de transposer les résultats de cet article, obtenus en échange d'ions, aux autres types de chromatographie et en particulier aux chromatographies d'adsorption et de partage, ce que nous sommes en train de réaliser.

ANNEXE

Détermination des profils d'éluion par simulation numérique

Le modèle théorique choisi suppose que le fonctionnement de la colonne est identique à celui d'une colonne fictive à plateaux. L'isotherme de distribution est linéaire jusqu'à la saturation de la capacité disponible $C_A = Q_A/m$ (en mequiv./g) de la phase stationnaire (voir Fig. 6). Celle-ci est atteinte pour une concentration C_p dans la phase mobile.

Soient $Q(p,T)$ la quantité totale de soluté dans le plateau p après T transferts, m et s les indices désignant les phases mobile et stationnaire et k le facteur de

capacité du soluté. S'il n'y a pas saturation, le calcul de la répartition du soluté dans chaque plateau et pour chaque transfert se fait par l'algorithme suivant:

$$Q_m(p, T) = Q_m(p-1, T-1) + Q_s(p, T-1)$$

$$Q_m(p, T) = \frac{1}{1+k} Q(p, T)$$

$$Q_s(p, T) = \frac{k}{1+k} Q(p, T)$$

S'il y a saturation, la répartition se fait ainsi:

$$Q_s(p, T) = \Delta m \cdot C_A$$

$$Q_m(p, T) = Q(p, T) - \Delta m \cdot C_A$$

Δm est la masse de résine par plateau. La quantité injectée Q_0 est introduite sur le premier plateau de façon discontinue en J fractions q_0 , pendant les $J-1$ premiers transferts.

Ainsi, les paramètres du modèle sont la capacité disponible C_A et le facteur de capacité k .

RÉSUMÉ

Certaines propriétés des systèmes linéaires, utiles en chromatographie préparative, sont présentées. La déformation des profils d'éluion d'un soluté unique a été étudiée systématiquement en fonction du volume et de la concentration injectés. Ces profils sont représentés par leurs premiers moments. Cette représentation a l'avantage de faciliter le contrôle de la linéarité du comportement du processus chromatographique. A cet effet, un test fondé sur la déconvolution est proposé.

Une attention particulière est ensuite accordée au comportement fortement non-linéaire du processus. Des propriétés remarquables ont été mises en évidence à partir d'expériences systématiques en échange d'ions. Ces propriétés ont permis l'élaboration d'un modèle dont le domaine de validité est discuté. Ce modèle est d'un grand intérêt pour la commande automatique en chromatographie préparative non-linéaire. Un exemple est présenté dans le cas particulier de la séparation de deux composés.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient MM. les professeurs R. Rosset et G. Fournet, de l'École Supérieure de Physique et Chimie Industrielles de la ville de Paris, ainsi que M. le professeur G. Guiochon, de l'École Polytechnique et M. P. Bertrand, Maître de Recherches au C.N.R.S. pour les utiles discussions qu'ils ont eues avec eux.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 F. E. Rickett, *J. Chromatogr.*, 66 (1972) 356-360.
- 2 D. W. Lamson, A. F. W. Coulson et T. Yonetani, *Anal. Chem.*, 45 (1973) 2273-2276.
- 3 M. T. Jackson, *Chromatogr. Reviews (Spectra-Physics)*, 1 (1975) 2.

- 4 C. R. Scholfield, *Anal. Chem.*, 47 (1975) 1417-1420.
- 5 T. F. Gabriel, J. Michalewsky et J. Meienhofer, *J. Chromatogr.*, 129 (1976) 287-293.
- 6 J. D. Warthen Jr., *J. Chromatogr. Sci.*, 14 (1976) 513-515.
- 7 J. C. Suatoni et R. E. Swab, *J. Chromatogr. Sci.*, 14 (1976) 525-537.
- 8 D. Maysinger, C. S. Marcus, W. Wolf, M. Tarle et J. Casanova, *J. Chromatogr.*, 130 (1977) 129-138.
- 9 R. G. Berg et H. M. McNair, *J. Chromatogr.*, 131 (1977) 185-190.
- 10 R. R. Heath, J. H. Tumlinson, E. E. Doolittle, *J. Chromatogr. Sci.*, 15 (1977) 10-13.
- 11 J. W. Ashley Jr., C. N. Reilly et G. P. Hildebrand, *Anal. Chem.*, 34 (1962) 1198-1213.
- 12 J. W. Ashley Jr., G. P. Hildebrand et C. N. Reilly, *Anal. Chem.*, 36 (1964) 1369-1371.
- 13 J. C. Sternberg, *Advan. Chromatogr.*, 2 (1966) 205-270.
- 14 K. Yamaoka et T. Nakagawa, *Anal. Chem.*, 47 (1975) 2050-2053.
- 15 K. de Clerk et T. S. Buys, *J. Chromatogr.*, 63 (1971) 193-202.
- 16 A. I. Kalinichev, A. Pronin, P. P. Zolotarev, N. A. Goryacheva, K. V. Chmutov and V. Ya. Filimonov, *J. Chromatogr.*, 120 (1976) 249-256.
- 17 B. Roz, R. Bonmati, G. Hagenbach, P. Valentin et G. Guiochon, *J. Chromatogr. Sci.*, 14 (1976) 367-380.
- 18 J. P. Lefevre, *Thèse*, Paris, 1974.
- 19 J. H. Knox et J. F. Parcher, *Anal. Chem.*, 41 (1969) 1599-1606.
- 20 H. C. Beachell et J. J. de Stefano, *J. Chromatogr. Sci.*, 10 (1972) 481-486.
- 21 J. J. de Stefano et H. C. Beachell, *J. Chromatogr. Sci.*, 10 (1972) 654-662.
- 22 P. A. Bristow et J. H. Knox, *Chromatographia*, 10 (1977) 279-289.
- 23 C. R. Wilke et P. Chang, *Amer. Inst. Chem. Engr. J.*, 1 (1955) 264.
- 24 L. R. Snyder, *Anal. Chem.*, 39 (1967) 698-704.
- 25 K. Yamaoka et T. Nakagawa, *J. Phys. Chem.*, 79 (1975) 522-525.
- 26 B. L. Karger, M. Martin et G. Guiochon, *Anal. Chem.*, 46 (1974) 1640-1647.
- 27 J. N. Done, *J. Chromatogr.*, 125 (1976) 43-57.
- 28 H. M. McNair et W. M. Cooke, *J. Chromatogr. Sci.*, 10 (1972) 27-30.
- 29 P. Gareil, L. Personnaz et M. Caude, *Analisis*, 7 (1979) 401-407.