

Méthodes de séparation analytiques

Chromatographie

Introduction

⇒ La chromatographie fut découverte en 1901 par Mikhaïl Tswett en étudiant l'extraction des pigments de chlorophylle à l'éthanol (solvant polaire). Le résidu noir obtenu après extraction peut être dissout dans de nombreux solvant comme l'éther de pétrole (solvant apolaire). L'extraction à l'éther de pétrole ne fonctionne pas, il y a des forces qui retiennent la chlorophylle dans les feuilles des plantes.

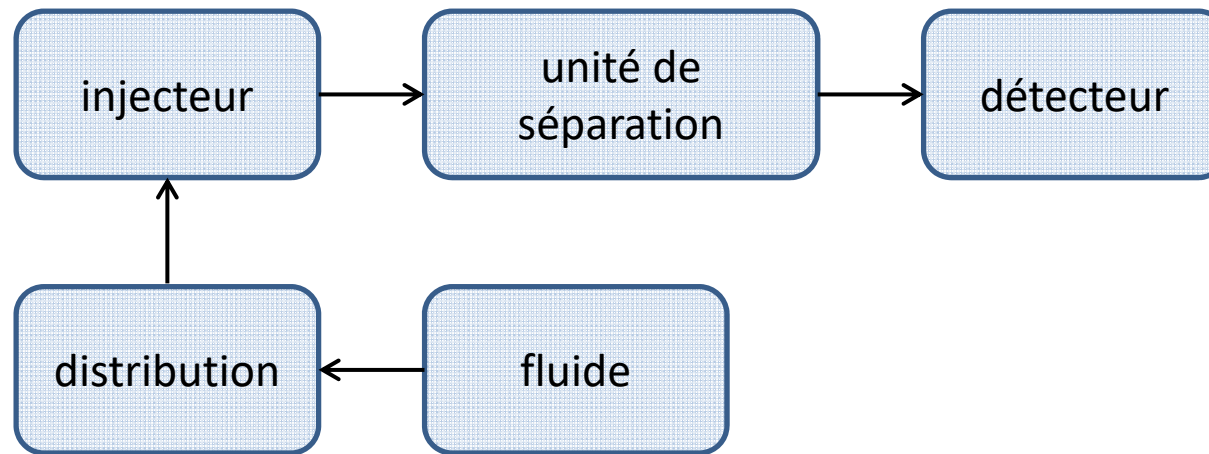


⇒ Pour étudier ces forces et identifier le composé qui retient la chlorophylle dans les feuilles, il utilise du papier filtre en cellulose. Le résidu noir est dissout dans l'éther de pétrole puis mis au contact de la cellulose. Le papier filtre capte le résidu. La désorption du résidu n'intervient qu'en présence d'un solvant polaire. Il effectue la même opération avec des poudres minérales contenues dans des colonnes en verre. Au contact des solides, le résidu noir se sépare en disques de couleur différentes. En ajoutant différents solvants, les disques migrent à des vitesses différentes et sortent les uns après les autres de la colonne. La chromatographie sur colonne est née.

⇒ Le travail de Tswett n'a été exploité qu'à partir de 1930.

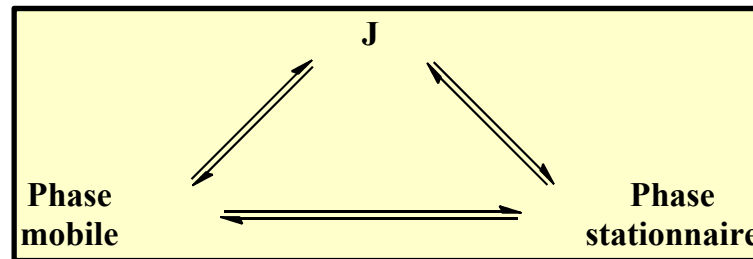
Chromatographie qualitative

Principes de la chromatographie



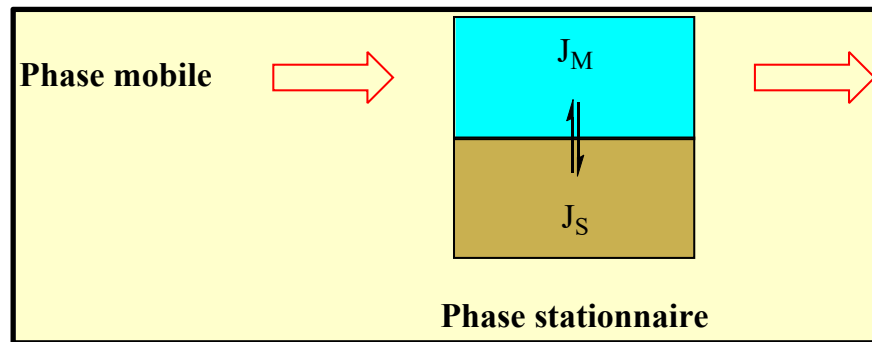
- ⇒ **Fluide:** Phase mobile (gaz, liquide, fluide supercritique)
- ⇒ **Distribution:** naturelle (capillarité, gravitation), forcée (pression)
- ⇒ **Injecteur:** Dépôt, seringue, injecteur à vanne...
- ⇒ **Unité de séparation:** Phase stationnaire (papier, couche mince, billes...)
- ⇒ **Détecteur:** Optique, ionique, électronique, radioactif, thermique...

Processus de séparation



- ⇒ Lors de la séparation chromatographique, la molécule **J** interagit avec la phase stationnaire et la phase mobile.
- ⇒ Dans de nombreux cas, l'interaction entre la phase mobile et la phase stationnaire n'est pas négligeable. Les phases mobiles et stationnaires ne sont pas miscibles ou solubles l'une dans l'autre.
- ⇒ Dans une première approche, l'interaction de la molécule **J** avec la phase mobile et la phase stationnaire peut être représentée comme le partage de cette dernière entre la phase stationnaire et la phase mobile.

⇒ Lors de la séparation chromatographique, la molécule J se partage entre la phase stationnaire et la phase mobile. En désignant S la phase stationnaire effective et M la phase mobile effective, on peut écrire:



⇒ q_J : Fraction de J en phase stationnaire effective

⇒ p_J : Fraction de J en phase mobile effective

⇒ Conservation de la matière: $p_J + q_J = 1$

⇒ Les échantillons sont injectés sous la forme d'un mélange à séparer. Les constituants du mélange vont se diluer dans la phase mobile. La solution résultante pénètre dans l'unité de séparation.

⇒ Les solutés (constituants dilués) vont se répartir entre la phase stationnaire et mobile en fonction de leur constante de distribution K_D .

⇒ Les différents équilibres vont être remis en question lors de l'avancement de la phase mobile, entraînant ainsi l'établissement de nouveaux équilibres successifs.

- ⇒ Les solutés ayant une forte affinité pour la phase stationnaire auront un temps de résidence plus grand dans l'unité de séparation que ceux qui ont une forte affinité pour la phase mobile.
- ⇒ La vitesse de migration des solutés va être différente induisant la séparation de ces derniers.
- ⇒ La phase stationnaire ne peut cependant accepter qu'une quantité limitée de soluté. Cette dernière est qualifiée par la capacité disponible d'une phase stationnaire C_D .
- ⇒ C_D est définie comme la quantité de soluté injectée qui provoque la saturation de la phase stationnaire dans des conditions déterminées.

$$C_D = \frac{Q_s}{m_{st}}$$

Q_s : Quantité de soluté fixée par la phase stationnaire lors de la saturation (g)

m_{st} : masse de phase stationnaire contenue dans la colonne (g)

- ⇒ La séparation des différents solutés est caractérisée par le facteur de rétention k' de ces derniers.

Facteur de rétention k'

$$k'_{(J)} = \frac{q_J}{p_J} = \frac{m_{s(J)}}{m_{M(J)}} = \frac{n_{s(J)}}{n_{M(J)}} = \frac{[J]_S V_S}{[J]_M V_M} = K_{D(J)} \frac{V_S}{V_M} = K_{D(J)} \Phi_{SM}$$

⇒ Cette équation est valable pour les solutions idéalement diluée. Le rapport de masse est équivalent au rapport du nombre de mole.

⇒ $[J]$: Concentration en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

⇒ V_S : Volume de phase stationnaire effective en m^3

⇒ V_M : Volume de phase mobile effective en m^3

⇒ $K_{D(J)}$: Constante de distribution de J ($K_{D(J)} = \frac{[J]_S}{[J]_M}$)

⇒ Φ_{SM} : Rapport de phases effectives ($\Phi_{SM} = \frac{V_S}{V_M}$)

⇒ L'évolution de la concentration des différents solutés séparés en fonction de la distance parcourue dans l'unité de séparation s'appelle le chromatogramme.

Définitions

⇒ Quelques définitions liées à la chromatographie:

⇒ V_{st} : Volume de phase stationnaire physique en m^3

⇒ V_{mo} : Volume de phase mobile physique en m^3

⇒ β : Rapport de phases physiques ($\beta = \frac{V_{mo}}{V_{st}}$)

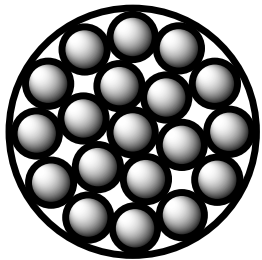
⇒ Les volumes de phases stationnaire et mobile effectives et physiques peuvent être différents.

Chromatographie qualitative: chromatographie d'élution

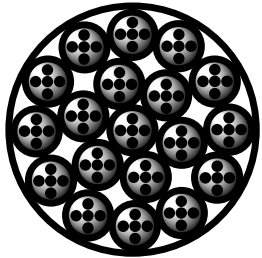
Unité de séparation

⇒ En chromatographie d'élution, la phase stationnaire est contenue dans un tube appelé colonne chromatographique.

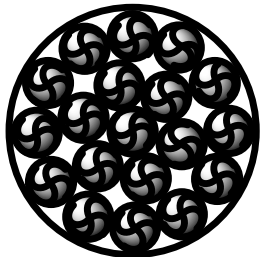
⇒ Les différentes familles de phases stationnaires sont représentée ci-après:



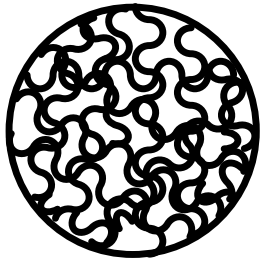
⇒ Colonne garnie à phase stationnaire sous forme de billes rigides peu poreuses ou colonne garnie à phase stationnaire sous forme de film de liquide visqueux déposé sur des billes rigides peu poreuses.



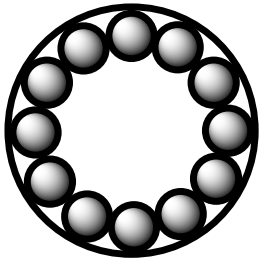
⇒ Colonne garnie à phase stationnaire sous forme de billes rigides poreuses.



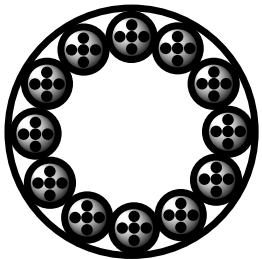
⇒ Colonne garnie à phase stationnaire sous forme de billes de gel poreux.



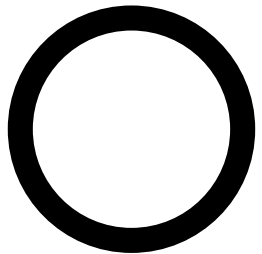
↪ Colonne garnie à phase stationnaire sous forme d'un solide monolithe poreux ou colonne garnie à phase stationnaire sous forme d'un gel réticulé.



↪ Colonne à tube ouvert à phase stationnaire sous forme de film déposé sur des billes rigides peu poreuses.



↪ Colonne à tube ouvert à phase stationnaire sous forme des billes rigides poreuses.



↪ Colonne à tube ouvert à phase stationnaire sous forme de film liquide visqueux.

⇒ Les volumes de phase mobile physique V_{mo} et de la colonne chromatographique V_c sont:

$$V_{mo} = V_i + V_p$$

V_p : volume de phase mobile physique contenue dans les pores de la phase stationnaire

$$V_c = V_{mo} + V_{st}$$

V_i : volume interstitiel, le volume de phase mobile physique présent entre les particules de phase stationnaire

V_{st} : volume de phase stationnaire physique

⇒ L'écoulement de la phase mobile dans un tube chromatographique induit une variation de pression ΔP entre l'entrée et la sortie de la colonne.

⇒ Cette variation de pression, due à l'empêchement à l'écoulement de la phase mobile, est quantifiée par le loi de Darcy:

$$\Delta P = \frac{\Phi \eta L \bar{u}}{d_p^2}$$

ΔP : perte de charge (Pa: $1 \text{ Pa} = 1 \times 10^{-5} \text{ bar}$)

Φ : Facteur de résistance à l'écoulement

η : viscosité dynamique (Pa·s)

L : longueur de la colonne (cm)

\bar{u} : vitesse linéaire d'écoulement moyenne de la phase mobile (cm·s⁻¹)

d_p : diamètre des particules de la phase stationnaire (cm)

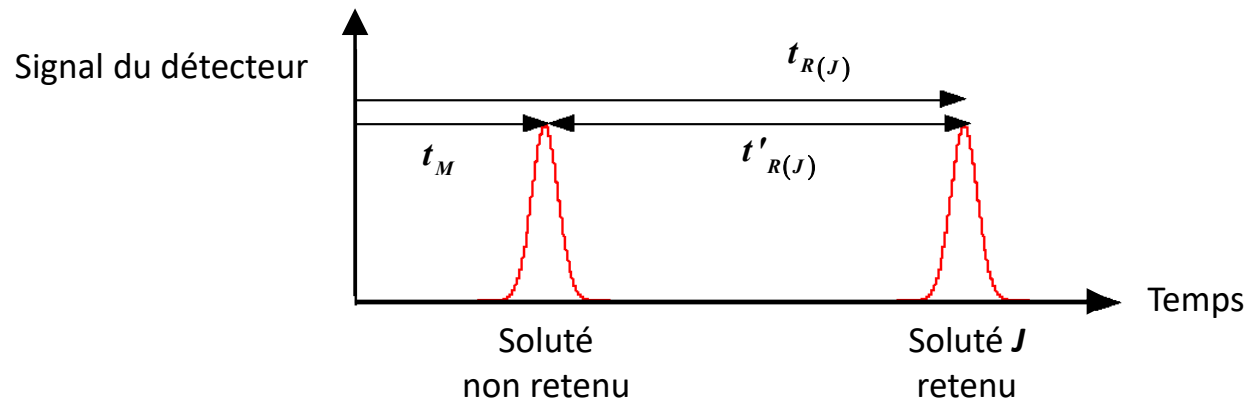
Rétention

- ⇒ Il s'agit d'une séparation réalisée par migration continue à l'aide d'un éluant à travers une colonne contenant une phase stationnaire.
- ⇒ Les composés à séparer migrent à des vitesses différentes à travers la phase stationnaire et sortent un à un de la colonne chromatographique.
- ⇒ En chromatographie d'élution, le facteur de retardement $R_{(J)}$ s'exprime en fonction du facteur de rétention $k'_{(J)}$:

$$R_{(J)} = \frac{1}{k'_{(J)} + 1}$$

- ⇒ Les solutés seront détectés à la sortie de l'unité de séparation et le signal du détecteur sera reporté en fonction du temps.
- ⇒ Le chromatogramme représentera ici l'évolution de la quantité des solutés en fonction du temps.

Chromatogramme



⇒ t_M : Temps mort, temps qui sépare l'injection et le maximum du pic d'un soluté non retenu par la phase stationnaire.

$$t_M = \frac{L}{\bar{u}}$$

⇒ $t_{R(J)}$: Temps de rétention brut d'un soluté J , temps qui sépare l'injection et le maximum du pic d'un soluté J retenu par la phase stationnaire.

⇒ $t'_{R(J)}$: Temps de rétention net d'un soluté J ⇒ $t'_{R(J)} = t_{R(J)} - t_M$

⇒ A partir de ces différents temps de rétention, si la chromatographie est réalisée à débit volumique F_V constant, on peut définir les grandeurs de rétention volumiques suivantes:

↪ Le volume mort V_M correspond au volume de phase mobile effective de l'unité de séparation. V_M peut être différent du volume de phase mobile physique V_{mo} .

↪ Volume mort: $V_M = t_M F_V$

↪ Volume de rétention brut d'un soluté J : $V_{R(J)} = t_{R(J)} F_V$

↪ Volume de rétention net d'un soluté J : $V'_{R(J)} = t'_{R(J)} F_V = V_{R(J)} - V_M$

⇒ Le volume de rétention brut d'un soluté J correspond au volume de phase mobile nécessaire pour faire parcourir à ce soluté l'unité de séparation.

Facteur de rétention k'

$$k'_{(J)} = \frac{t_{S(J)}}{t_{M(J)}} = \frac{t'_{R(J)}}{t_M} = \frac{t_{R(J)} - t_M}{t_M} \quad \text{et} \quad k'_{(J)} = \frac{V'_{R(J)}}{V_M} = \frac{V_{R(J)} - V_M}{V_M} \quad \text{et} \quad k'_{(J)} = K_{D(J)} \Phi_{SM}$$

$$V_{R(J)} = V_M + K_{D(J)} V_S$$

⇒ Dans cette équation, $t_{S(J)}$ représente le temps de séjour d'un soluté J dans la phase stationnaire et $t_{M(J)}$ représente le temps de séjour du même soluté J dans la phase mobile.

⇒ On peut alors exprimer les temps et volumes de rétention du soluté J comme:

$$\Rightarrow t_{R(J)} = t_M (1 + k'_{(J)})$$

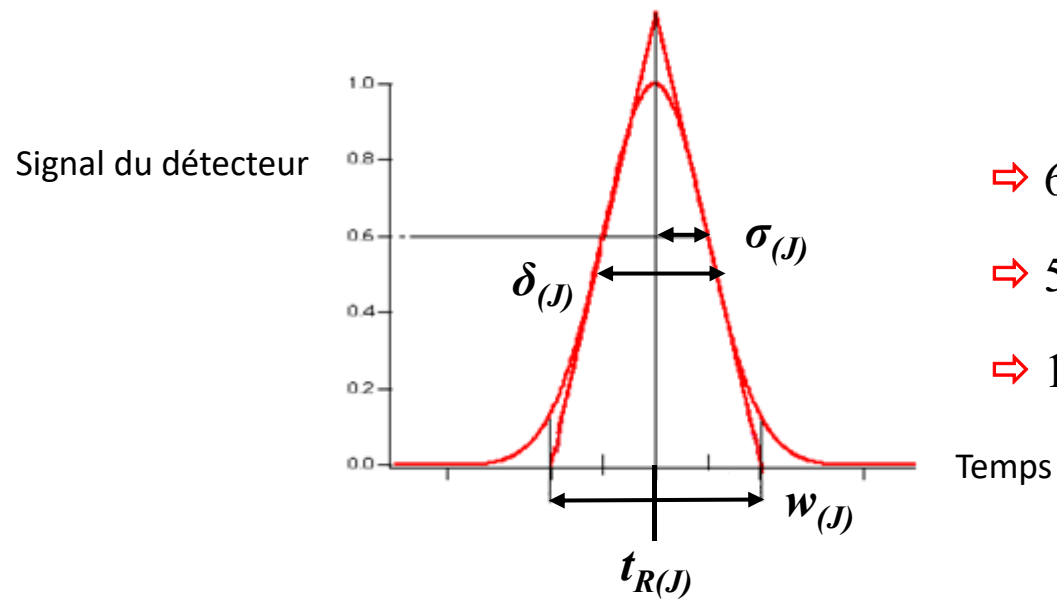
$$\Rightarrow t_{R(J)} = \frac{L}{u} (1 + k'_{(J)})$$

$$\Rightarrow V_{R(J)} = V_M (1 + k'_{(J)})$$

Pic chromatographique

⇒ Le détecteur donne en général un signal s'apparentant à une gaussienne dans un cas idéal. Cette gaussienne peut être plus ou moins déformée. La forme mathématique du signal gaussien d'un soluté J en fonction du temps, pondéré par une constante $A_{(J)}$ qui dépend de la quantité de J , est la suivante:

$$Signal_{(J)}(t) = A_{(J)} \frac{1}{\sigma_{(J)}(t) \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \left[\frac{t - t_{R(J)}}{\sigma_{(J)}(t)} \right]^2}$$



⇒ 60,6% de hauteur: $\sigma_{(J)}$

⇒ 50% de hauteur: $\delta_{(J)}$ ⇒ $\delta_{(J)} = 2,35 \sigma_{(J)}$

⇒ 13,5% de hauteur: $w_{(J)}$ ⇒ $w_{(J)} = 4 \sigma_{(J)}$

⇒ *Nombres de plateaux théoriques*

$$N_{(J)} = \left(\frac{t_{R(J)}}{\sigma_{(J)}} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_{R(J)}}{\delta_{(J)}} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_{R(J)}}{w_{(J)}} \right)^2$$

⇒ *Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique HEPT*

$$H_{(J)} = \frac{L}{N_{(J)}}$$

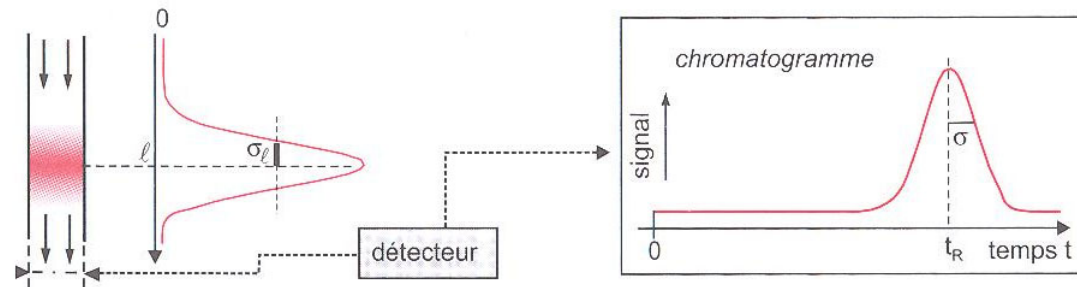
⇒ L représente la longueur de l'unité de séparation.

⇒ *Volume de pic*

⇒ Le volume de pic est le volume de phase mobile dans lequel le composé J est dilué en sortie d'unité de séparation: $V_{pic(J)} = w_{(J)}F_V$

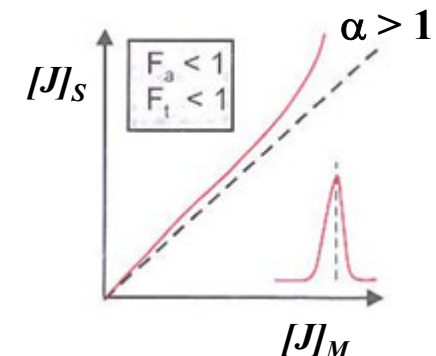
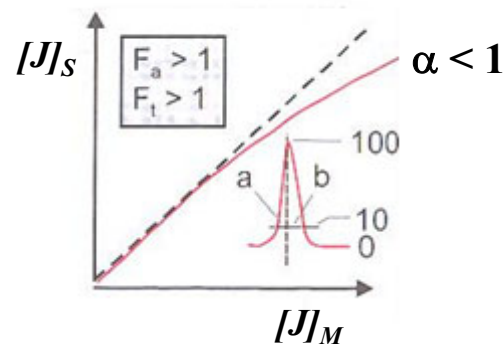
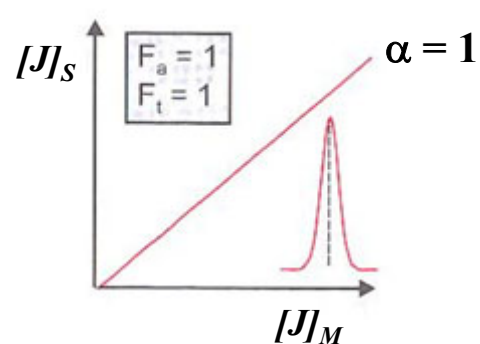
⇒ *Déformation des pics chromatographiques*

⇒ La forme des pics chromatographiques donnent une information sur les processus qui se déroulent dans l'unité de séparation.



⇒ Les facteurs d'assymétrie F_a de traînée F_t sont mesurés à 10% de la hauteur du pic. Ces deux facteurs mesurent la distribution d'un soluté J entre la phase stationnaire et la phase mobile.

$$[J]_S = K_{D(J)} ([J]_M)^\alpha$$

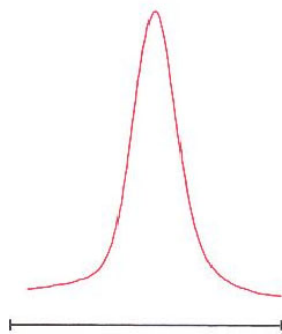


$$F_a = \frac{b}{a} \text{ et } F_t = \frac{a+b}{2a}$$

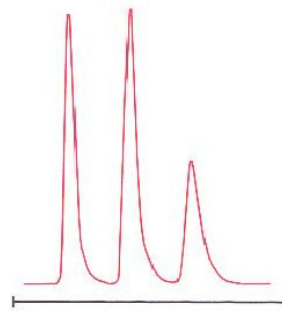
↪ $F_a = F_t = 1$: situation idéale **(a)**

↪ $F_a > 1$ et $F_t > 1$: la phase stationnaire est saturée, tailing **(b)**

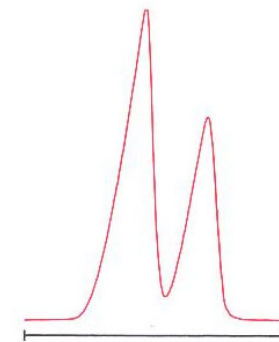
↪ $F_a < 1$ et $F_t < 1$: le soluté est trop retenu par la phase stationnaire, fronting **(c)**



(a)



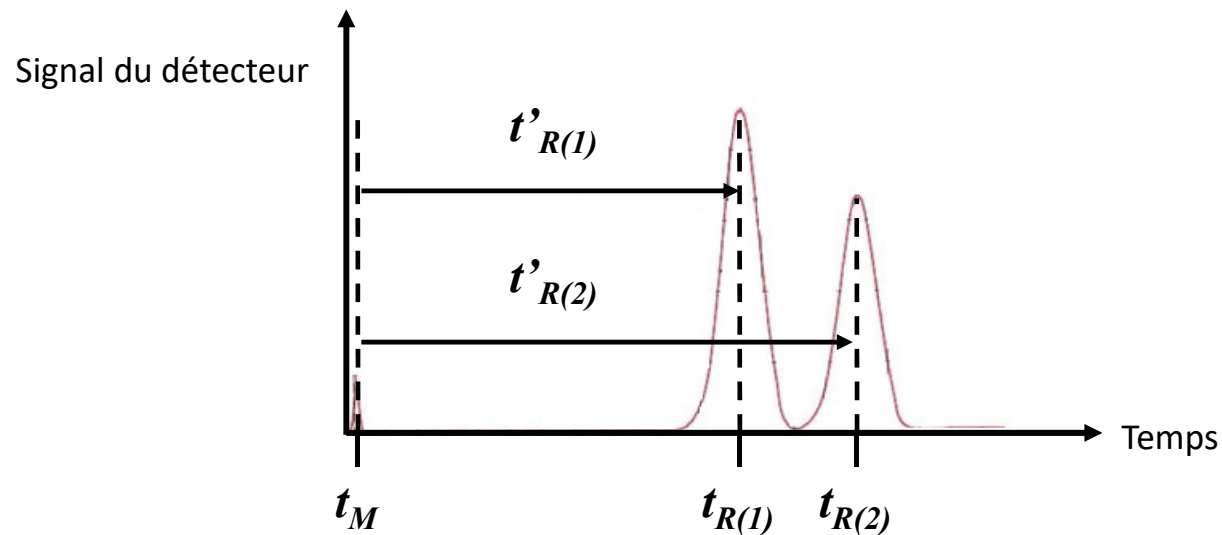
(b)



(c)

Facteur de sélectivité α

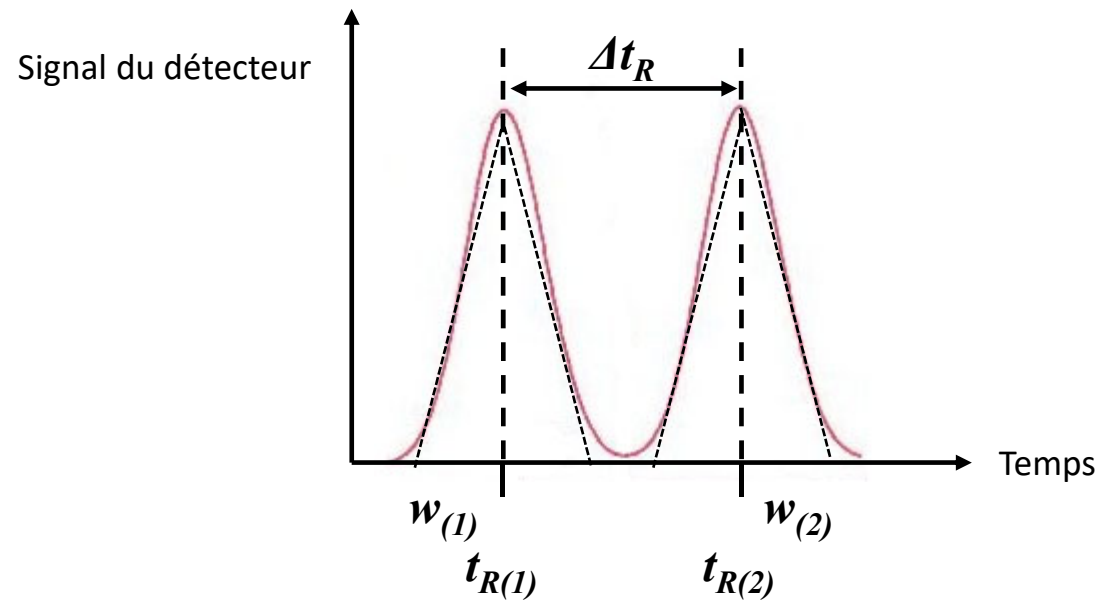
⇒ Le facteur de sélectivité α entre deux solutés permet de préciser les positions relatives de deux pics sur un chromatogramme. α mesure l'aptitude d'un système chromatographique à séparer deux composés, il est toujours supérieur à 1:



$$\alpha_{(1,2)} = \frac{t'_{R(2)}}{t'_{R(1)}} = \frac{k'_{(2)}}{k'_{(1)}} = \frac{K_{D(2)}}{K_{D(1)}}$$

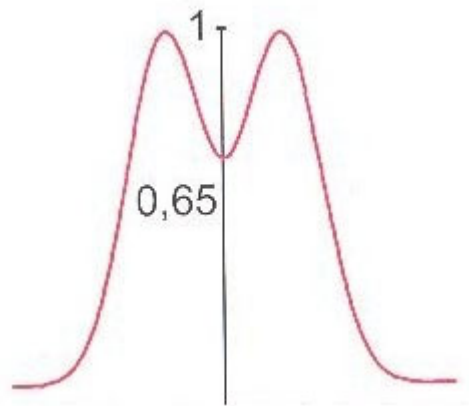
Résolution R_s

⇒ La résolution R_s mesure l'aptitude qu'ont deux pics successifs à être quantifiables:

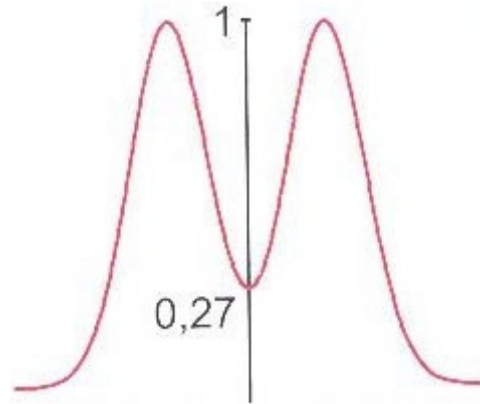


$$R_{s(1,2)} = \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{\frac{1}{2}(w_{(1)} + w_{(2)})}$$

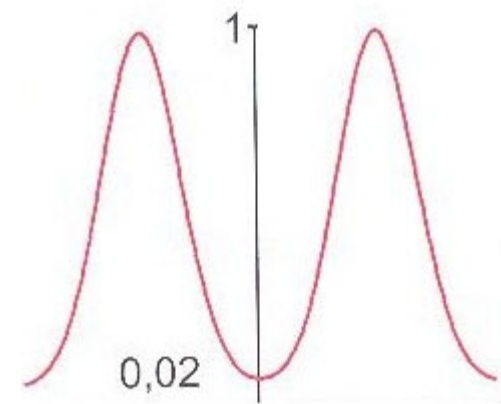
⇒ Si les deux pics ont $w_{(1)} = w_{(2)} = w = 4\sigma$ ⇒ $R_{s(1,2)} = \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{w} = \frac{\Delta t_R}{4\sigma}$



$$R_{s(1,2)} = 0,75$$



$$R_{s(1,2)} = 1$$



$$R_{s(1,2)} = 1,5$$

$$\left. \begin{array}{l} \Rightarrow R_{s(1,2)} = 0,75 \text{ si } t_R = 3\sigma \\ \Rightarrow R_{s(1,2)} = 1 \text{ si } t_R = 4\sigma \\ \Rightarrow R_{s(1,2)} = 1,5 \text{ si } t_R = 6\sigma \end{array} \right\}$$

Pour une analyse quantitative: $R_{s(1,2)} \geq 1,5$

⇒ La résolution peut s'exprimer avec la relation de Purnell:

$$R_{s(1,2)} = \frac{\sqrt{N_2}}{4} \times \left(\frac{\alpha_{(1,2)} - 1}{\alpha_{(1,2)}} \right) \times \left(\frac{k'_{(2)}}{1 + k'_{(2)}} \right)$$

propriétés physiques

propriétés chimiques

Capacité de pics

⇒ La capacité de pics n_c , c'est-à-dire le nombre maximal de pics pouvant être séparés pour une résolution $R_{s(1,n)}$ donnée dans des conditions opératoires fixées, peut être utilisée comme critère d'optimisation.

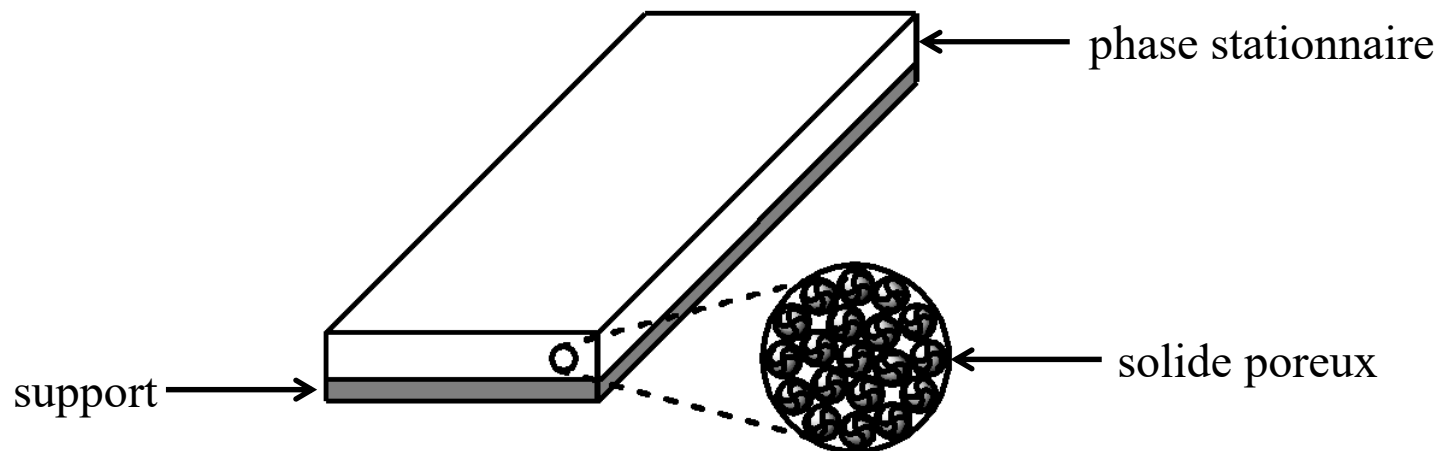
- ⇒ Cette dernière fait appel aux facteurs de rétention des premier ($k'_{(1)}$) et dernier ($k'_{(n)}$) pics du chromatogramme.
- ⇒ En considérant un nombre de plateaux théoriques moyen \bar{N} , il vient:

$$n_c = \frac{\sqrt{\bar{N}}}{4R_{s(1,n)}} \times \ln \left(\frac{1 + k'_{(n)}}{1 + k'_{(1)}} \right) + 1$$

Chromatographie qualitative: chromatographie planaire

Unité de séparation

- ⇒ L'unité de séparation est constituée d'une phase stationnaire déposée sur un support plan (verre, aluminium, plastique).
- ⇒ La phase stationnaire est constituée par un solide poreux. Le support peut aussi jouer le rôle de phase stationnaire comme le papier dans la chromatographie sur papier.



- ⇒ La phase mobile, encore appelée éluant, peut être distribuée de façon naturelle (mouvement capillaire ou gravitationnel de l'éluant) ou forcée (distribution de l'éluant sous pression ou par centrifugation).

Rétention

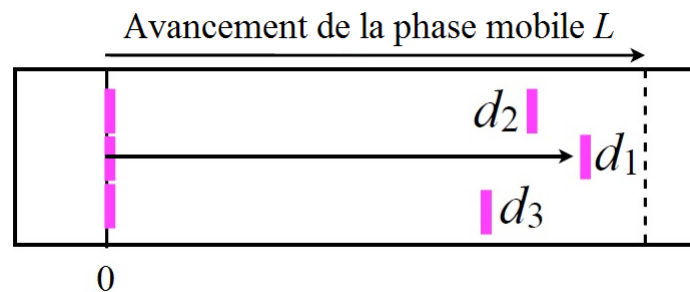
- ⇒ Les composés à séparer migrent à des vitesses différentes sur le support chromatographique, c'est-à-dire la phase stationnaire, jusqu'à ce que le processus soit arrêté.
- ⇒ Ce type de chromatographie est encore appelé: chromatographie à avancement limité.
- ⇒ Martin et Synge ont proposé caractériser le facteur de retardement $R_{(J)}$ d'un soluté J comme le rapport u_J/u_M où u_J et u_M sont relatifs aux vitesses du soluté J et de la phase mobile respectivement. En considérant que la quantité de soluté J présent dans la phase mobile est p_J :

$$R_{(J)} = \frac{u_J}{u_M} = \frac{p_J u_M}{u_M} = p_J$$

- ⇒ Les composés séparés sont détectés sur le support chromatographique puis désorbés du support pour être isolés. Le chromatogramme retrace l'évolution de la concentration des différents solutés en fonction de la distance parcourue dans l'unité de séparation.

Chromatogramme

⇒ Le soluté J parcourt la distance $d_{(J)}$ alors que la phase mobile parcourt la distance L . Pour ce type de chromatographie, la vitesse relative, appelée rapport frontal $R_{F(J)}$ est théoriquement égal au rapport des distances parcourues par le soluté J et la phase mobile.



$$R_{F(J)} = \frac{d_{(J)}}{L}$$

⇒ En théorie, les rapports $R_{(J)}$ et $R_{F(J)}$ sont équivalents. En pratique, dû à l'inhomogénéité de la phase stationnaire, on observe: $0,8R_{(J)} \leq R_{F(J)} \leq 0,9R_{(J)}$

Facteur de rétention k'

$$k'_{(J)} = \frac{m_{S(J)}}{m_{M(J)}} = K_{D(J)} \frac{V_S}{V_M} = K_{D(J)} \Phi_{SM}$$

$$k'_{(J)} = \frac{1 - R_{F(J)}}{R_{F(J)}}$$

Pic chromatographique

⇒ *Nombre de plateaux théoriques*

$$N_{(J)} = 16 \left(\frac{d_{(J)}}{w_{(J)}} \right)^2$$

⇒ $w_{(J)}$ représente la largeur du spot du soluté J .

⇒ *Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique HEPT*

$$H_{(j)} = \frac{L}{N_{(j)}}$$

⇒ L représente la distance de migration de l'éluant.

Facteur de sélectivité α

⇒ Le facteur de sélectivité α entre deux solutés permet de préciser les positions relatives de deux pics sur un chromatogramme. α mesure l'aptitude d'un système chromatographique à séparer deux composés, il est toujours supérieur à 1:

$$\alpha_{(1,2)} = \frac{k'_{(2)}}{k'_{(1)}} = \frac{K_{D(2)}}{K_{D(1)}} = \frac{(1 - R_{F(2)}) / R_{F(2)}}{(1 - R_{F(1)}) / R_{F(1)}} = \frac{R_{F(1)} (1 - R_{F(2)})}{R_{F(2)} (1 - R_{F(1)})}$$

Résolution R_s

⇒ La résolution R_s mesure l'aptitude qu'ont deux pics successifs à être quantifiables:

$$R_{s(1,2)} = \frac{d_{(2)} - d_{(1)}}{\frac{1}{2}(w_{(1)} + w_{(2)})}$$

⇒ La résolution peut s'exprimer avec la relation de Purnell:

$$R_{s(1,2)} = \frac{\sqrt{N_2}}{4} \times \left(\frac{\alpha_{(1,2)} - 1}{\alpha_{(1,2)}} \right) \times \left(\frac{k'_{(2)}}{1 + k'_{(2)}} \right)$$

propriétés physiques

propriétés chimiques

⇒ Pour que deux pics **1** et **2** successifs soient quantifiables, il faut que $R_{s(1,2)} \geq 1,5$.

Capacité de pics

⇒ La capacité de pics n_c , c'est-à-dire le nombre maximal de pics pouvant être séparés pour une résolution $R_{s(1,n)}$ donnée dans des conditions opératoires fixées, peut être utilisée comme critère d'optimisation.

⇒ Cette dernière fait appel aux facteurs de rétention des premier ($k'_{(1)}$) et dernier ($k'_{(n)}$) pics du chromatogramme. En considérant un nombre de plateaux théoriques moyen \bar{N} , il vient:

$$n_c = \frac{\sqrt{\bar{N}}}{4 R_{s(1,n)}} \times \ln \left(\frac{1 + k'_{(n)}}{1 + k'_{(1)}} \right) + 1$$

Chromatographie quantitative

Introduction

- ⇒ La chromatographie a pris une place de choix dans l'analyse quantitative grâce à la précision et la fiabilité des appareils chromatographiques d'une part ainsi qu'à la stabilité et la reproductibilité des unités de séparation d'autre part.
- ⇒ Un détecteur permet de relier l'aire d'un pic chromatographique à la masse de soluté détecté. Ainsi, pour un soluté J , on aura:

Linéarité d'un détecteur

- ⇒ Pour un soluté J , l'expression qui relie la masse de soluté à son l'aire de son pic chromatographique sera:

$$A_J = k_{m,J} m_J$$

- ⇒ Dans cette relation, m_J représente la masse de soluté J (g). A_J correspond à l'aire du pic chromatographique de J (unité qui dépend de la méthode de détection) et $k_{m,J}$ est une constante de proportionnalité qui dépend de la nature de J .

- ⇒ La constante $k_{m,J}$ est appelée facteur de réponse massique absolu du soluté J et doit être déterminée pour chaque soluté analysé.
- ⇒ La constante $k_{m,J}$ doit être re-déterminée pour chaque campagne d'analyses, y compris si l'on utilise toujours le même appareil chromatographique pour prendre en compte le vieillissement du détecteur ou tout autre phénomène pouvant entacher son fonctionnement.
- ⇒ Cette relation linéaire n'est valable que sur une gamme de masse bien précise (domaine de linéarité). Cette gamme de masse dépend du détecteur utilisé et elle doit être réajustée régulièrement.
- ⇒ Lorsque l'appareil chromatographique possède un système d'injection pour lequel le volume injecté V est connu avec précision et est hautement reproductible, on peut alors déterminer aussi la concentration d'un soluté J :

$$A_J = k_{m,J} m_J = k_{m,J} M_J [J] V$$

- ⇒ Dans cette relation, M_J représente la masse molaire de soluté J ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$). $[J]$ correspond à la concentration du soluté J ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ou $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) et V représente le volume de solution injecté.

⇒ On peut alors écrire:

$$A_J = k_{c,J} [J]$$

↪ Dans cette relation, $k_{c,J}$ représente le facteur de réponse concentrationnel absolu du soluté J .

↪ La constante $k_{c,J}$ peut être reliée à $k_{m,J}$ comme:

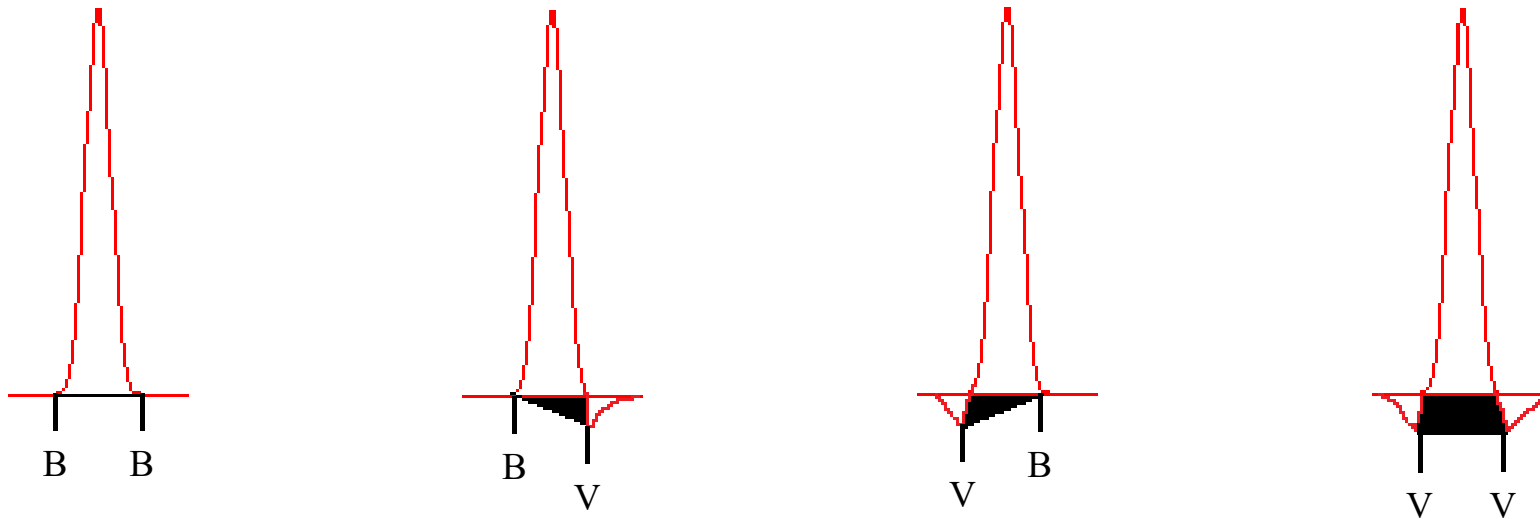
$$k_{c,J} = \frac{k_{m,J}}{M_J V}$$

⇒ Les méthodes de quantification chromatographiques nécessitent de connaître précisément la nature du soluté à doser.

⇒ Il s'agit de la normalisation interne, l'étalonnage externe, l'étalonnage interne, les ajouts dosés et les ajouts dosés avec référence interne.

⇒ Dans tous les cas, il faudra déterminer l'aire du pic chromatographique pour le corrélérer à la quantité de soluté dosé.

⇒ On sera alors confrontés à différents cas de figure:



⇒ Une intégration BB (base to base) sera plus précise qu'une intégration BV (base to valley), VB (valley to base) ou VV (valley to valley).

⇒ Dans les schémas ci-dessus, l'aire en noir correspond à une sur-intégration et *a fortiori* à une sur-quantification.

Chromatographie quantitative: normalisation interne

Introduction

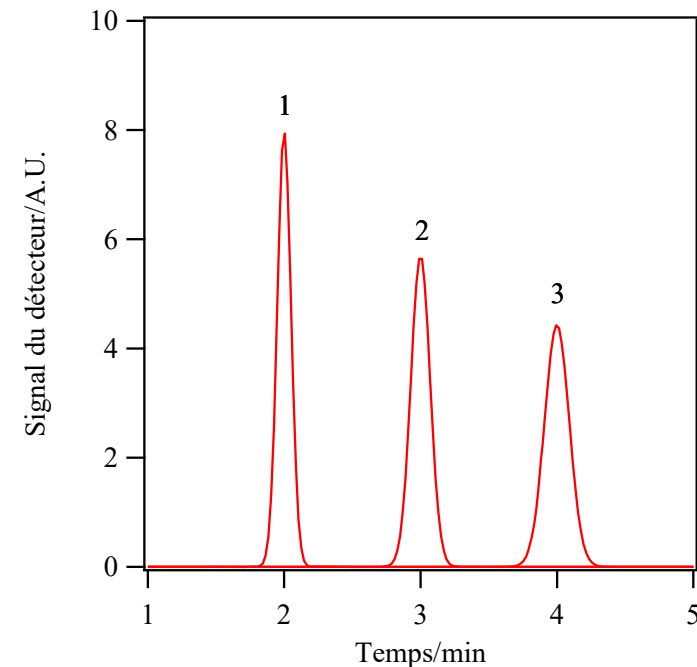
⇒ Cette méthode de quantification, appelée aussi "100% normalisée" est destinée aux mélanges dont on connaît la nature de tous les constituants.

⇒ La quantité de mélange injectée peut être reproductible ou pas.

Méthode de quantification

⇒ On obtient le chromatogramme ci-contre. Les solutés **1**, **2** et **3** possèdent respectivement les aires A_1 , A_2 et A_3 . Si les solutés **1**, **2** et **3** sont de la même nature chimique, on peut raisonnablement considérer que: $k_{m,1} = k_{m,2} = k_{m,3}$. Dans ce cas, on peut calculer directement le pourcentage massique de chaque soluté **J** ($\%_{m,J}$) du mélange comme:

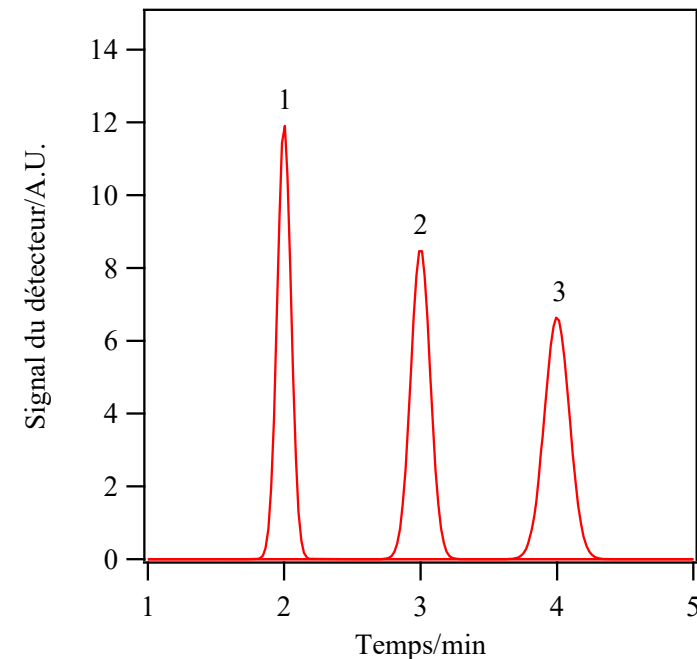
$$\%_{m,J} = 100 \frac{A_J}{\sum_{J=1}^N A_J}$$



⇒ Dans le cas où le volume d'injection est précis et reproductible, alors la même relation peut être établie en concentration ($\%_{c,J}$) car on aura aussi: $k_{c,1} = k_{c,2} = k_{c,3}$.

$$\%_{c,J} = 100 \frac{A_J}{\sum_{J=1}^N A_J}$$

⇒ Si les solutés **1**, **2** et **3** ne sont pas de la même nature chimique, alors il est très probable que: $k_{m,1} \neq k_{m,2} \neq k_{m,3}$. Dans ce cas, on doit préparer une solution d'étalonnage contenant les composés à doser dont les masses sont m'_1 , m'_2 et m'_3 . On obtient le chromatogramme ci-contre dont les aires des pics **1**, **2** et **3** sont respectivement A'_1 , A'_2 et A'_3 .



⇒ A partir de ce mélange étalon, on peut calculer le facteur de réponse massique relatif $k_{m,I/J}$ du soluté I par rapport au soluté J :

$$k_{m,I/J} = \frac{k_{m,I}}{k_{m,J}} = \frac{A'_I / m'_I}{A'_J / m'_J} = \frac{A'_I m'_J}{A'_J m'_I}$$

⇒ Si on travaille en concentration on aura $k_{c,I/J}$ tel que:

$$k_{c,I/J} = \frac{A'_I [J]'}{A'_J [I]'}$$

⇒ Les pourcentages massiques et concentrationnels de chaque soluté J , prenant en compte le soluté I comme référence interne, seront:

$$\%_{m,J} = 100 \frac{A_J (k_{m,I/J})^{-1}}{\sum_{J=1}^N A_J (k_{m,I/J})^{-1}}$$

et

$$\%_{c,J} = 100 \frac{A_J (k_{c,I/J})^{-1}}{\sum_{J=1}^N A_J (k_{c,I/J})^{-1}}$$

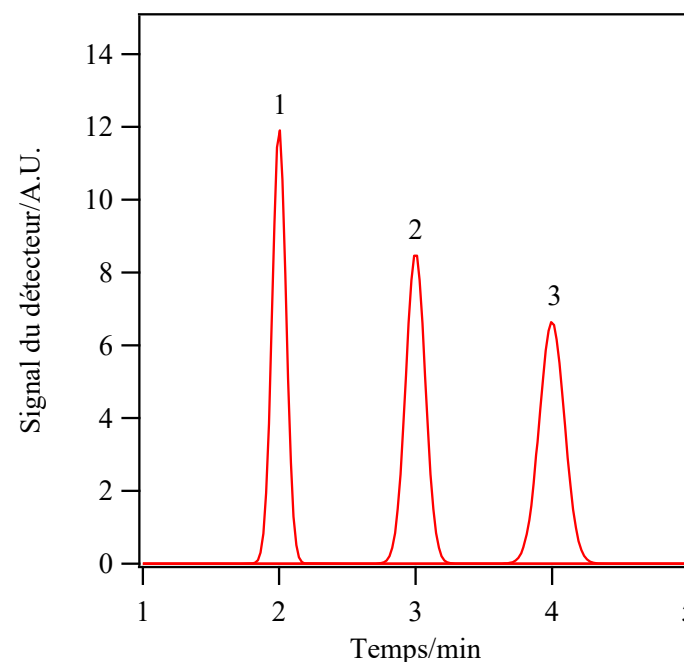
Chromatographie quantitative: étalonnage externe

Introduction

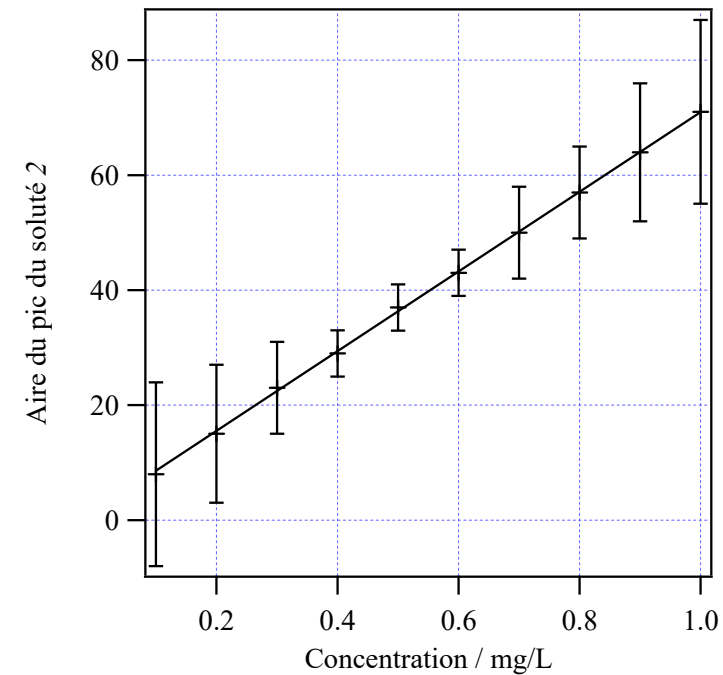
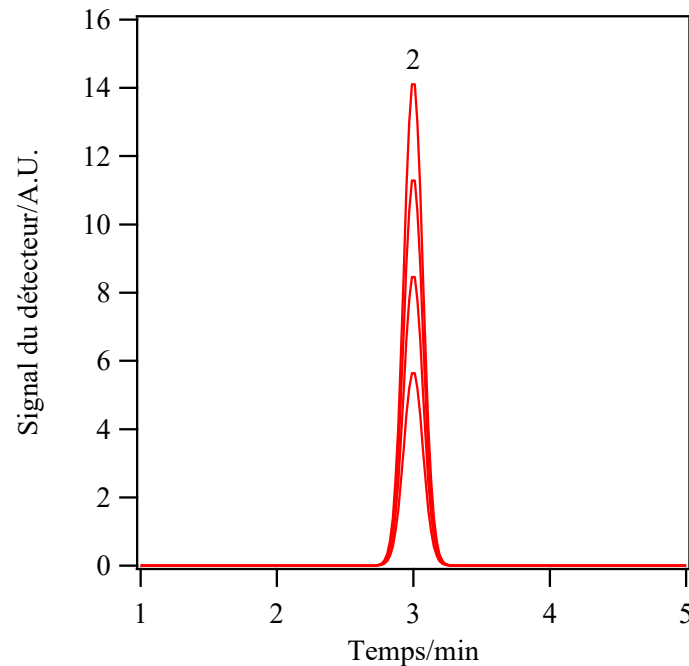
- ⇒ Cette méthode de quantification est basée sur la préparation de toute une gamme de solutions étalons dont les masses ou les concentrations en soluté à doser sont croissantes, choisies dans le domaine de linéarité du détecteur.
- ⇒ Le mélange contenant le soluté J à doser est plus ou moins dilué pour se situer dans la gamme d'étalonnage. La quantité de mélange injectée doit être hautement reproductible.

Méthode de quantification

- ⇒ On obtient le chromatogramme ci-contre. Si l'on désire doser le soluté 2 dans le mélange, on prépare une gamme étalon de soluté 2 et on analyse chaque étalon dans les conditions chromatographiques utilisées pour analyser le mélange initial.
- ⇒ On analyse les différents étalons par ordre de masse ou de concentration croissante.



➡ On reporte l'aire du pic chromatographique du soluté **2** en fonction de sa masse ou de sa concentration.



➡ On effectue une régression linéaire sur la gamme étalon, la pente de la droite correspond à $k_{m,2}$ ou $k_{c,2}$. La quantité de soluté **2** contenue dans le mélange est obtenue en injectant la valeur de l'aire de son pic chromatographique dans l'équation de régression.

- ⇒ Le facteur de dilution du mélange a été choisi pour que l'on se situe au milieu de la gamme d'étalonnage, là où les écarts-types sur la détermination de l'aire sont minimums.
- ⇒ Cette méthode de quantification n'est valable que si le volume d'échantillon injecté est précis et hautement reproductible.
- ⇒ On prépare entre 5 et 8 étalons pour obtenir une régression linéaire fiable. Les points étalons ne doivent pas être trop éloignés les uns des autres pour gagner en précision sur la régression linéaire (espacements réguliers).
- ⇒ L'ensemble des étalons doit se situer dans le domaine de linéarité du détecteur.

Chromatographie quantitative: étalonnage interne

Introduction

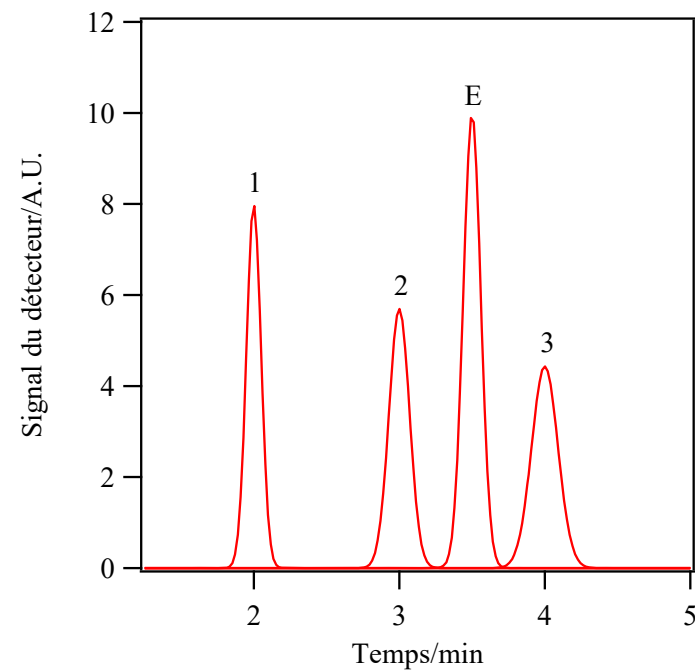
- ⇒ Cette méthode de quantification est basée sur l'introduction, dans le mélange à analyser, d'un étalon interne de masse ou concentration connue.
- ⇒ La quantité de mélange injectée peut être reproductible ou pas.

Méthode de quantification

- ⇒ On détermine la nature chimique de l'étalon à utiliser: ce dernier doit posséder un temps de rétention proche de celui du soluté à doser. Dans ce cas, les propriétés physico-chimiques de l'étalon et du soluté sont très similaires, ce qui réduit considérablement les écarts de comportements des deux composés et par conséquent diminue les incertitudes sur le dosage.
- ⇒ La proximité des temps de rétention engendre une contrainte supplémentaire: les aires des composés qui entourent l'étalon ne doivent pas se chevaucher ($R_s \geq 1,5$).
- ⇒ Une fois la nature chimique de l'étalon établie, sa masse ou concentration doit être déterminée. En règle générale, on introduit l'étalon dans le mélange de façon à ce que les aires du soluté à doser et de l'étalon soient du même ordre de grandeur. L'une ne doit pas être 10 fois supérieure à l'autre.

⇒ Les quantités d'étalon et de soluté à doser doivent se situer dans le domaine linéaire du détecteur.

⇒ On obtient le chromatogramme suivant:



⇒ Si l'on désire doser le soluté 2, on aura:

$$A_2 = k_{m,2} m_2$$

➡ Pour l'étalon E , on aura:

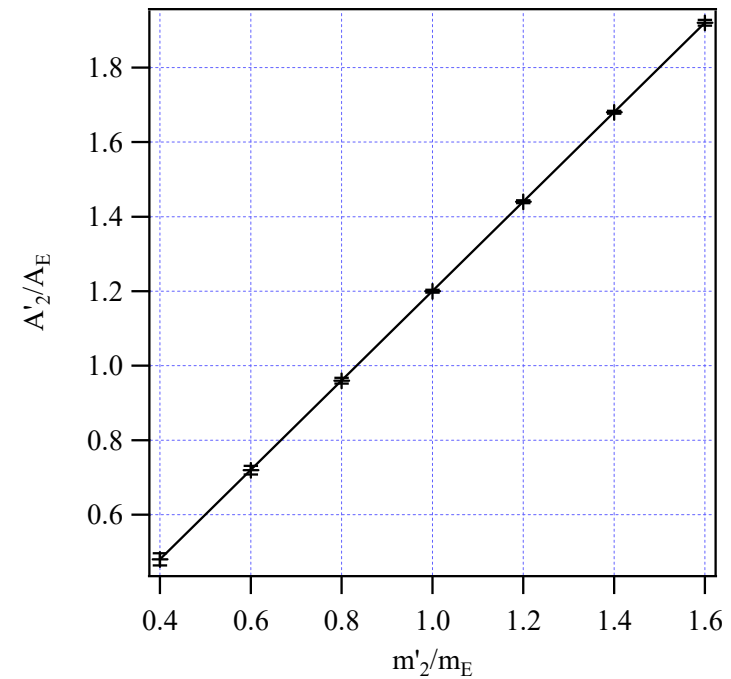
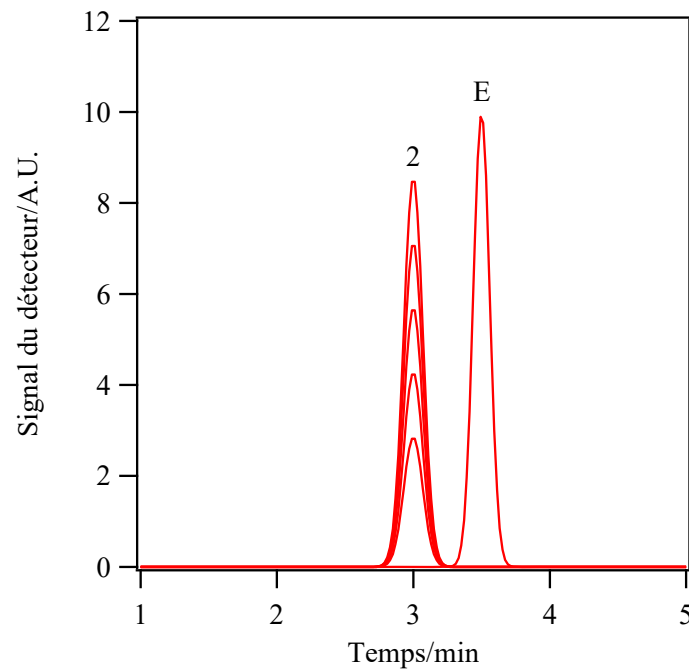
$$A_E = k_{m,E} m_E$$

➡ En comparant, les aires des deux pics, on peut écrire:

$$\frac{A_2}{A_E} = \frac{k_{m,2} m_2}{k_{m,E} m_E} \Rightarrow \frac{A_2}{A_E} = k_{m,2/E} \frac{m_2}{m_E}$$

➡ Pour déterminer le facteur de réponse massique relatif $k_{m,2/E}$ du soluté **2** par rapport à l'étalon E , on procède à l'élaboration de mélanges constitués du soluté à doser et de l'étalon choisi. La masse de l'étalon (m_E) est en générale constante, égale à celle introduite dans le mélange à doser, la masse du soluté **2** (m'_2) est variable.

➡ Les différents mélanges fabriqués sont analysés dans les mêmes conditions que celle utilisées pour analyser le mélange initial contenant l'étalon. A partir des différents chromatogrammes obtenus, on trace A'_2/A_E en fonction de m'_2/m_E et on procède à une régression linéaire. Le coefficient directeur de la droite correspond au facteur de réponse massique relatif $k_{m,2/E}$.



➡ Ayant déterminé le facteur $k_{m,2/E}$, on peut facilement accéder à la masse du soluté 2. En effet, pour le mélange initial on aura:

$$\frac{A_2}{A_E} = k_{m,2/E} \frac{m_2}{m_E}$$

➡ Dans cette équation: A_2 , A_E , $k_{m,2/E}$ et m_E sont connues.

⇒ On peut aussi procéder directement à partir de la droite d'étalonnage pour accéder au rapport m_2/m_E .

⇒ Dans le cas où le volume de mélange injecté est précis et reproductible, alors on peut s'intéresser à la concentration plutôt qu'à la masse. Dans ce cas, la relation sera la suivante:

$$\frac{A_2}{A_E} = k_{c,2/E} \frac{[2]}{[E]}$$

⇒ Que ce soit en masse ou en concentration, l'établissement de la droite d'étalonnage permet de vérifier la linéarité du détecteur dans le domaine de masse ou de concentration étudié.

⇒ On génère entre 5 et 8 mélanges pour obtenir une régression linéaire fiable. Les différents points d'étalonnage ne doivent pas être trop éloignés les uns des autres pour gagner en précision sur la régression linéaire (espacements réguliers). L'ensemble des points d'étalonnage doivent se situer dans le domaine de linéarité du détecteur.

⇒ Cette méthode est particulièrement utilisée dans le cas où le volume d'injection est peu précis et/ou peu reproductible.

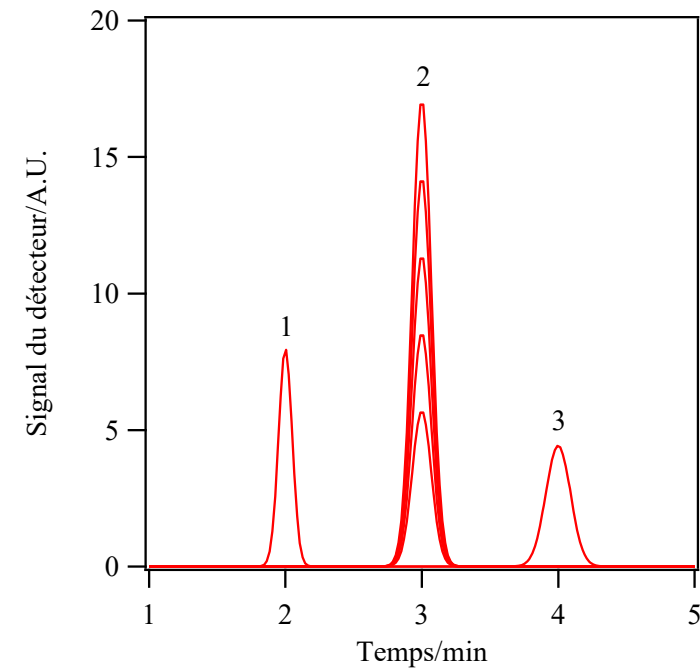
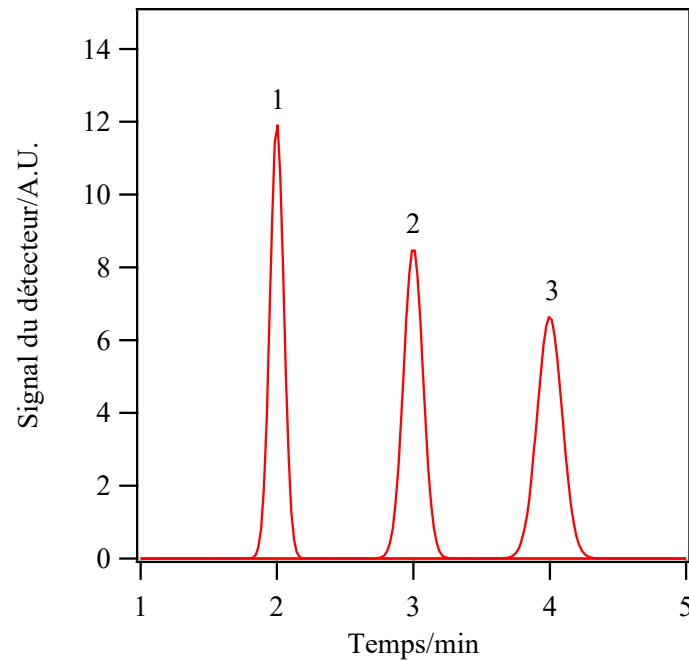
Chromatographie quantitative: ajouts dosés

Introduction

- ⇒ Cette méthode de quantification consiste à introduire, dans le mélange à analyser, une quantité croissante du soluté dont on veut connaître la teneur. Le mélange initial est analysé ainsi que ceux résultants des différents ajouts dosés dans les mêmes conditions chromatographiques.
- ⇒ La quantité de mélange injectée doit être hautement reproductible.

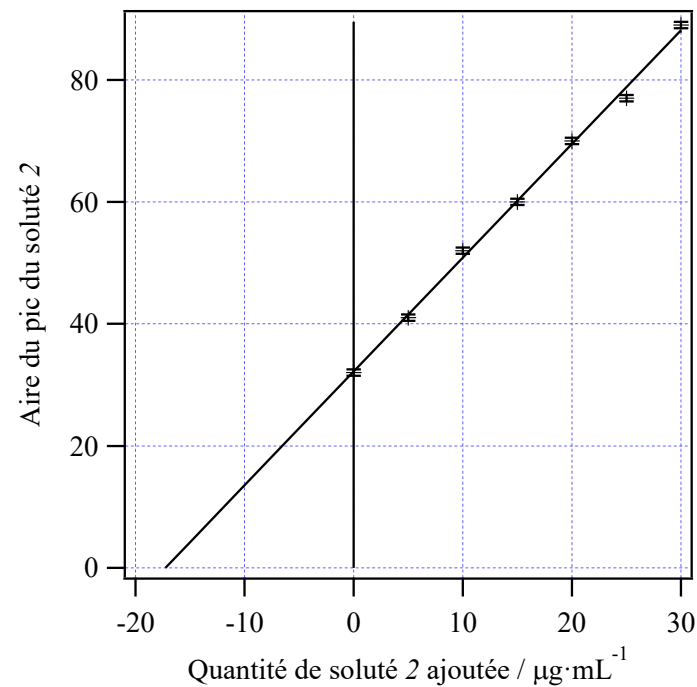
Méthode de quantification

- ⇒ Le mélange initial est divisé en plusieurs parts.
- ⇒ Le premier échantillon est dilué puis analysé.
- ⇒ On ajoute au deuxième échantillon une teneur (masse ou concentration) connue du soluté pur à doser. On dilue au même volume que le premier échantillon puis on analyse cette deuxième solution et ainsi de suite.
- ⇒ En procédant à des ajouts dosés de soluté 2 pur, on obtient les chromatogrammes suivants:



↪ La teneur en soluté **2** est calculée pour que l'échantillon résultant se situe dans le domaine de linéarité du détecteur du chromatographe.

↪ On reporte l'aire du soluté **2** en fonction de sa quantité ajoutée. On effectue ensuite une régression linéaire:



➡ Pour trouver la teneur en soluté 2 dans le mélange initial, on utilise la droite de régression et l'on cherche la quantité de soluté 2 ajoutée pour avoir une aire de pic égale à zéro.

➡ Il s'agit d'une concentration négative car tout ce passe comme si on devait avoir retiré cette quantité pour que le pic chromatographique disparaisse.

- ⇒ On procède à des ajouts identiques dont la teneur en soluté à doser n'est pas trop élevée. Cette condition permet d'obtenir des points peu éloignés les uns des autres (régression linéaire plus précise) tout en restant pour l'ensemble des points dans le domaine de linéarité du détecteur.
- ⇒ On réalise entre 4 et 7 ajouts pour obtenir une régression linéaire sur 5 à 8 points et ainsi gagner en précision.
- ⇒ Cette méthode est utilisée pour les échantillons complexes où certains solutés composant la matrice de l'échantillon interfèrent avec le soluté à doser. Il s'agit d'une sur-intégration du pic chromatographique dû à la matrice de l'échantillon qui provoque une élévation de la ligne de base.
- ⇒ Cette méthode peut être utilisée lorsque la teneur en soluté est trop faible pour être déterminée avec fiabilité (inférieure ou égale à la limite de quantification). De ce fait, on augmente artificiellement, de manière connue, la teneur à quantifier.
- ⇒ Lorsque l'on utilise un étalonnage externe, le soluté à analyser peut présenter une aire qui se situe assez loin d'un point de calibration. On peut alors, à partir de la solution à analyser, réaliser une série d'ajouts dosés qui permettront de déterminer plus précisément la teneur en soluté à analyser de cette solution (affinage de la régression linéaire).

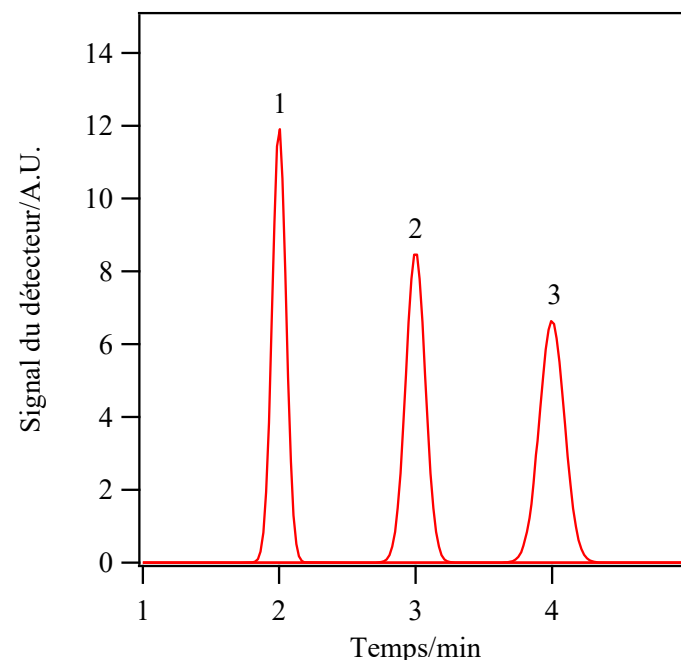
Chromatographie quantitative:
ajouts dosés avec référence interne

Introduction

- ⇒ Cette méthode de quantification est une méthode des ajouts dosés modifiée. Elle est utilisée lorsque la quantité de mélange injectée est peu reproductible.
- ⇒ Cette méthode fait appel à la méthode des ajouts dosés classique en ajoutant une correction de l'aire du pic de l'ajout en fonction de la variation du volume d'échantillon injecté.

Méthode de quantification

- ⇒ On effectue une première injection et l'on choisit sur le chromatogramme du mélange un soluté différent de celui à doser qui servira de référence.
- ⇒ On utilisera le soluté **1** comme soluté de référence.
- ⇒ On effectue plusieurs injections afin de déterminer à la fois la variation de l'aire du pic du soluté de référence (**1**) et celle du soluté à doser (**2**).



- On détermine alors un facteur de correction de l'aire du pic du soluté à doser (**2**) à partir de la variation de celle du soluté pris comme référence (**1**).
- ➡ On réalise les différents ajouts dosés de **2** et on corrige chaque aire de pic en fonction de la variation de celle du soluté de référence (**1**) dont l'aire doit rester constante au cours des différents ajouts.
- On reporte l'aire du pic du soluté **2** corrigée en fonction de l'ajout dosé de **2** et on procède comme pour la méthode des ajouts dosés classique.

