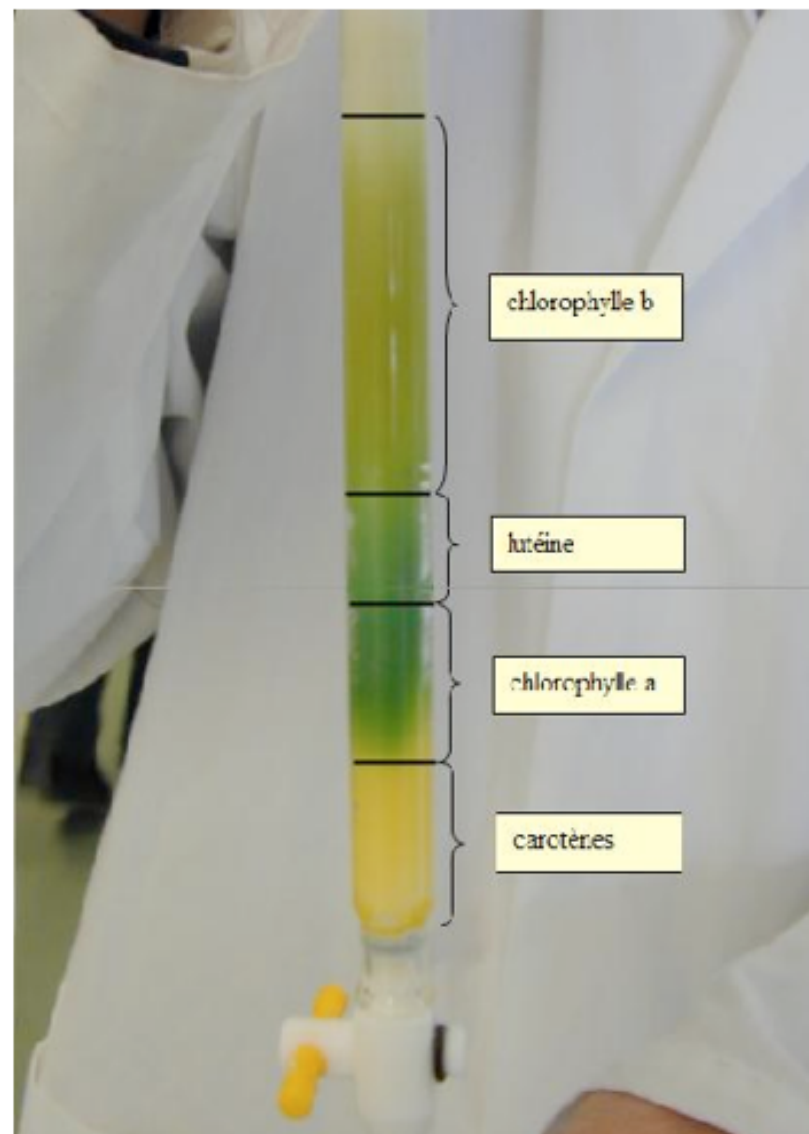
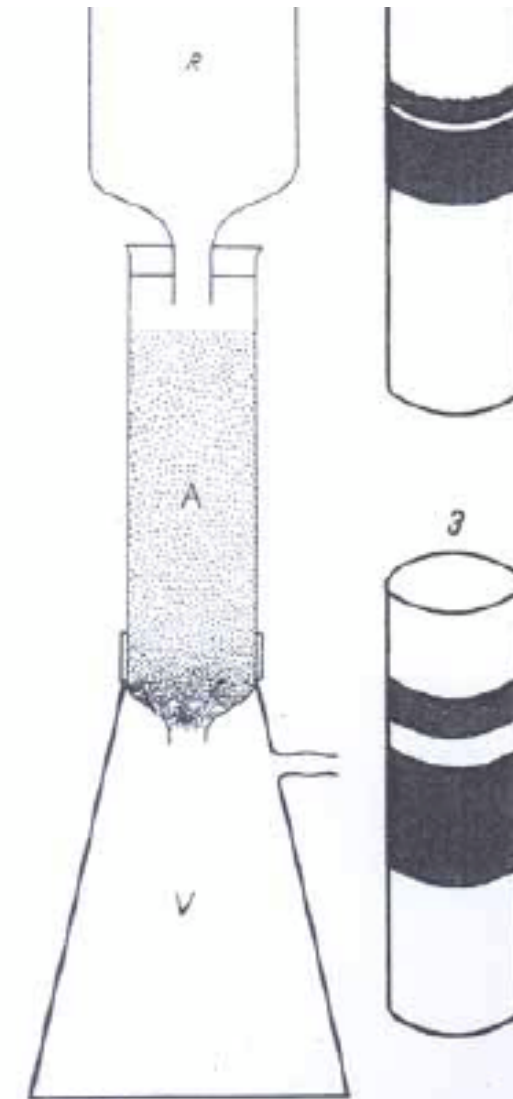
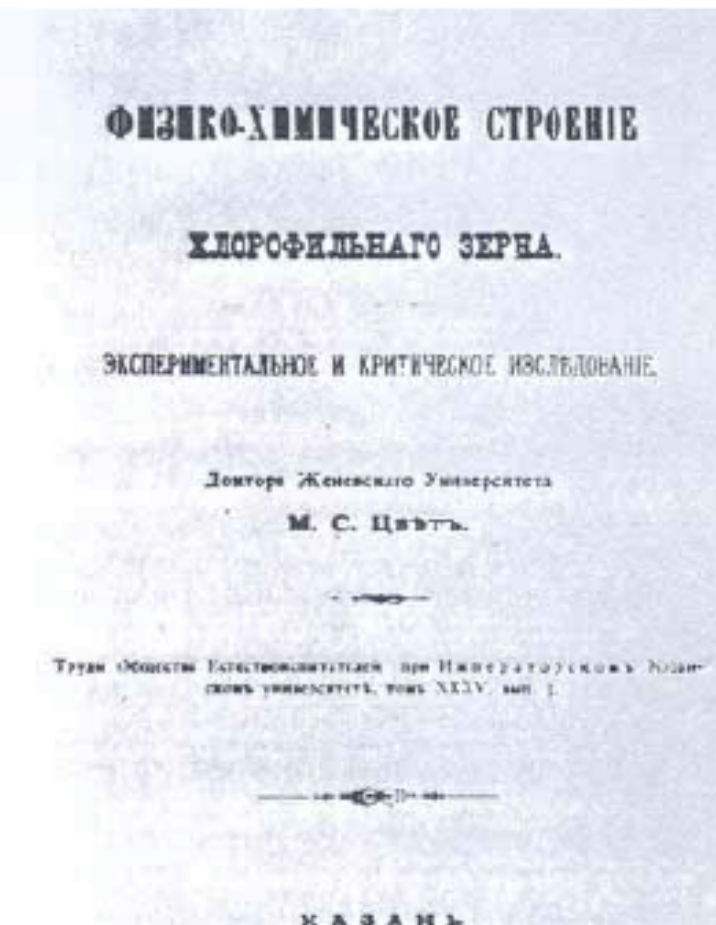
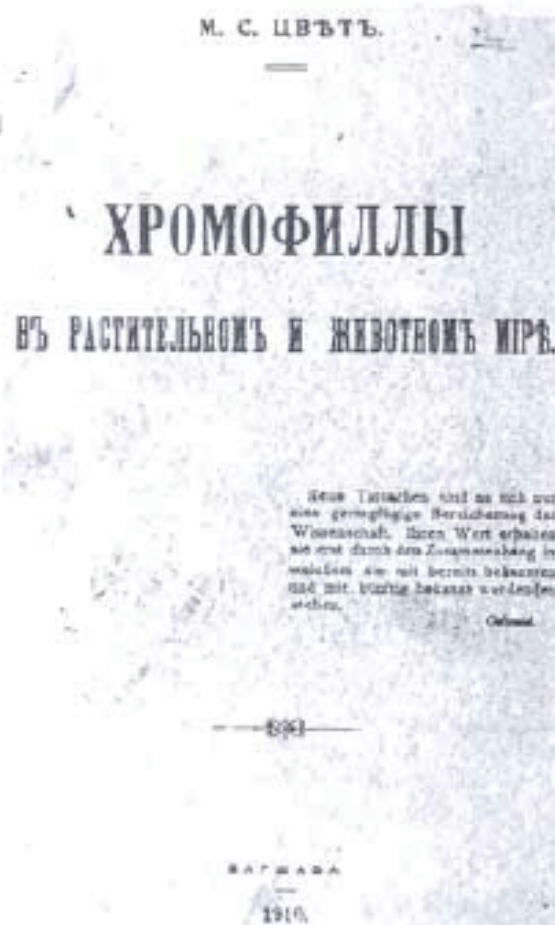


INTRODUCTION aux METHODES CHROMATOGRAPHIQUES



C'est une méthode analytique qui est largement utilisée pour la séparation, l'identification et le dosage des constituants chimiques dans des mélanges complexes. Il n'existe aucune autre méthode de séparation qui soit aussi puissante et d'application aussi générale.



First chromatographic unit and chromatograms

Extrait de K.I. Sakodynskii,
Michael Tswett, life and work,
Ed: Carlo Erba (1981) Milan

I - Description d'ensemble de la chromatographie

⇒ Il est difficile de définir rigoureusement le terme "chromatographie" parce qu'il s'applique à une grande diversité de systèmes et de techniques. Cependant, toutes les méthodes ont en commun l'utilisation simultanée d'une **phase stationnaire** et d'une **phase mobile**.

⇒ Les constituants de l'échantillon à analyser sont entraînés à travers la phase stationnaire par le flux d'une phase mobile gazeuse ou liquide, et les séparations résultent de la différence entre les vitesses de progression des diverses substances.

1) Classification des méthodes chromatographiques

⇒ En **chromatographie sur colonne**, la phase stationnaire est maintenue dans un tube étroit et la phase mobile y progresse par gravité ou sous l'action d'une différence de pression.

Classification des méthodes chromatographiques sur colonne

Classification générale	Méthode spécifique	Phase stationnaire	Type d'équilibre
Chromatographie en phase liquide (CPL) (phase mobile liquide)	Liquide-liquide (CLL) ou partage	Liquide immobilisé sur un solide	Partage entre liquides non miscibles
	Liquide-phase greffée	Espèce organique liée chimiquement à une surface solide	Partage entre liquide et surface greffée
	Liquide-solide (CLS) ou adsorption	Solide	Adsorption
	Échange d'ions	Résine échangeuse d'ions	Échange d'ions
	Liquide-gel (CLG) ou perméation	Liquide dans les interstices d'un solide polymérique	Partage/tamissage
Chromatographie en phase gazeuse (CPG) (phase mobile : gaz)	Gaz-liquide (CGL)	Liquide immobilisé sur un solide	Partage entre gaz et liquide
	Gaz-phase greffée	Espèce organique liée chimiquement à une surface solide	Partage entre gaz et surface greffée
	Gaz-solide (CGS)	Solide	Adsorption
Chromatographie en fluide supercritique (CFS)(phase mobile : fluide supercritique)		Espèce organique liée chimiquement à une surface solide	Partage entre fluide supercritique et surface greffée

1/ En analysant le tableau, pouvez-vous indiquer le nombre de méthode qui sont répertoriés ?

2/ Comment différent les méthodes indiquées précédemment ?

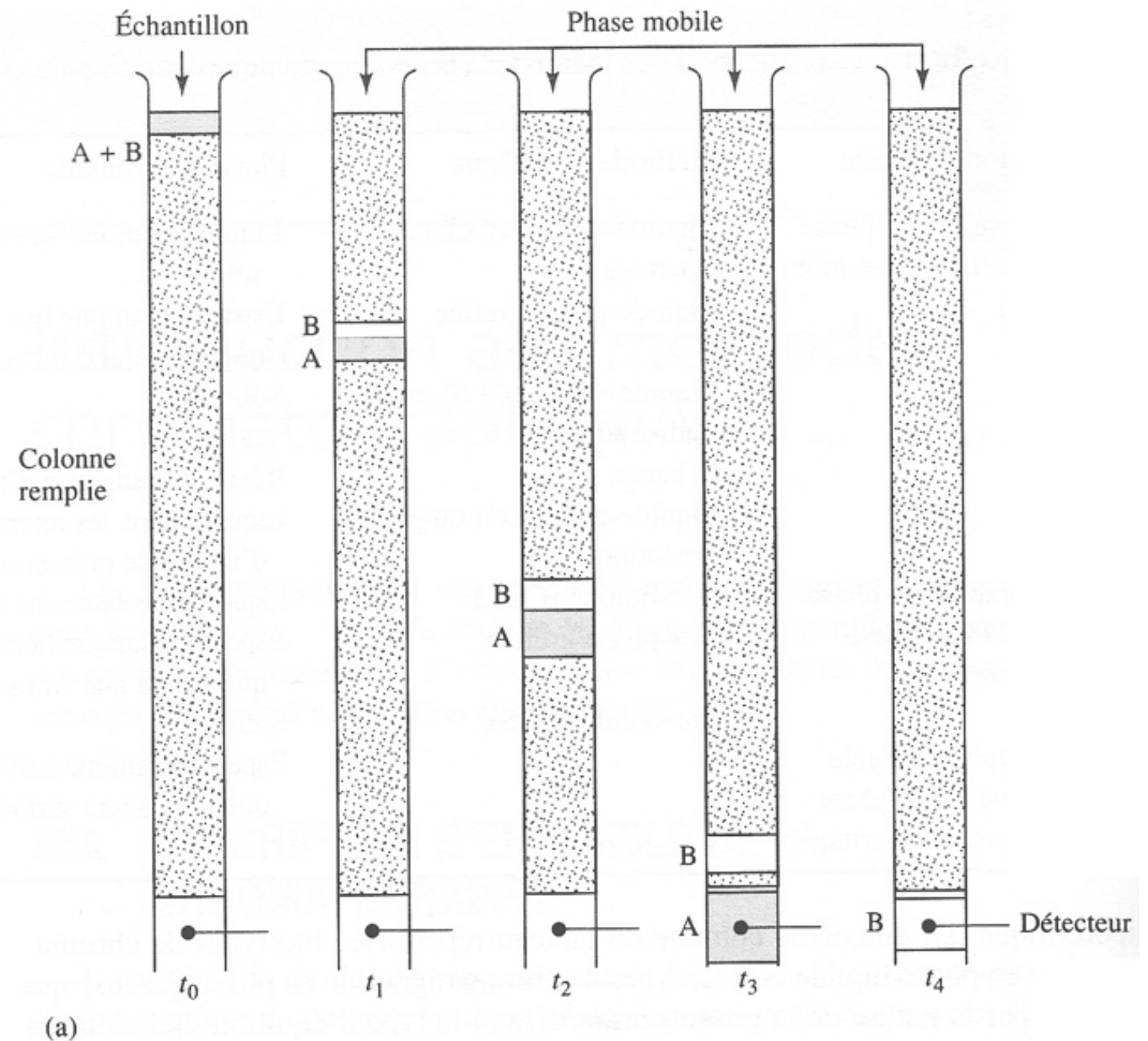
3/ En **chromatographie planaire**, indiquer comment se présente la phase stationnaire ?

4/ En **chromatographie planaire**, indiquer comment se déplace la phase mobile ?

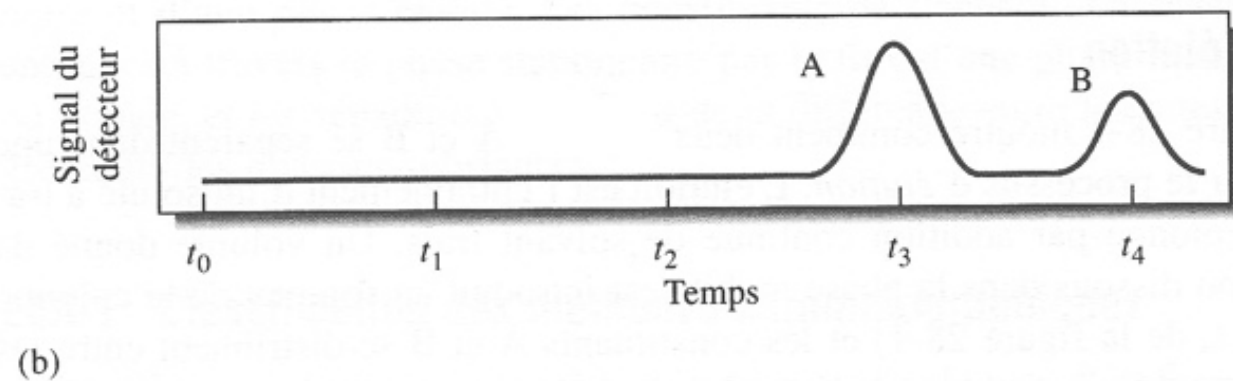
2) L'élution

⇒ La figure montre comment 2 espèces A et B se séparent dans une colonne par le processus d'élution.

L'élution est l'entraînement d'un soluté à travers une colonne par addition continue de solvant frais.



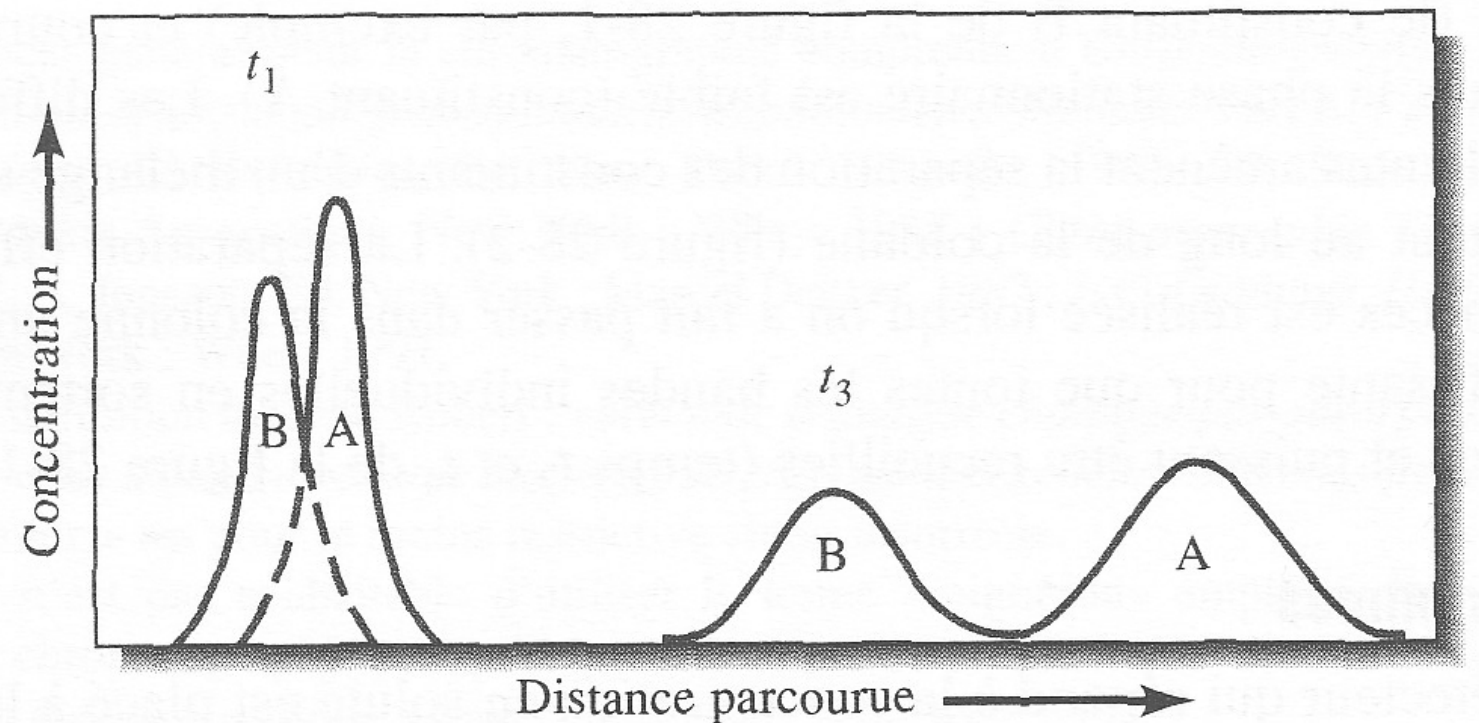
(a) Schéma montrant la séparation d'un mélange des constituants A et B par chromatographie d'élution sur colonne. (b) Le signal de sortie du détecteur en fonction du temps d'élution de l'expérience (a).



⇒ L'avancée graduelle du solvant entraîne les molécules de soluté vers le bas de la colonne en une série continue de transferts entre les 2 phases. Puisque le déplacement du soluté ne peut se produire que dans la phase mobile, la **vitesse** moyenne de progression d'un soluté **dépend du temps qu'il passe en phase stationnaire**.

⇒ Temps long pour les solutés qui sont fortement retenus (exemple de B) et court quand la rétention dans la phase stationnaire est faible (A).

Profils de concentration des pics des solutés A et B à deux moments différents au cours de leur migration dans la colonne.

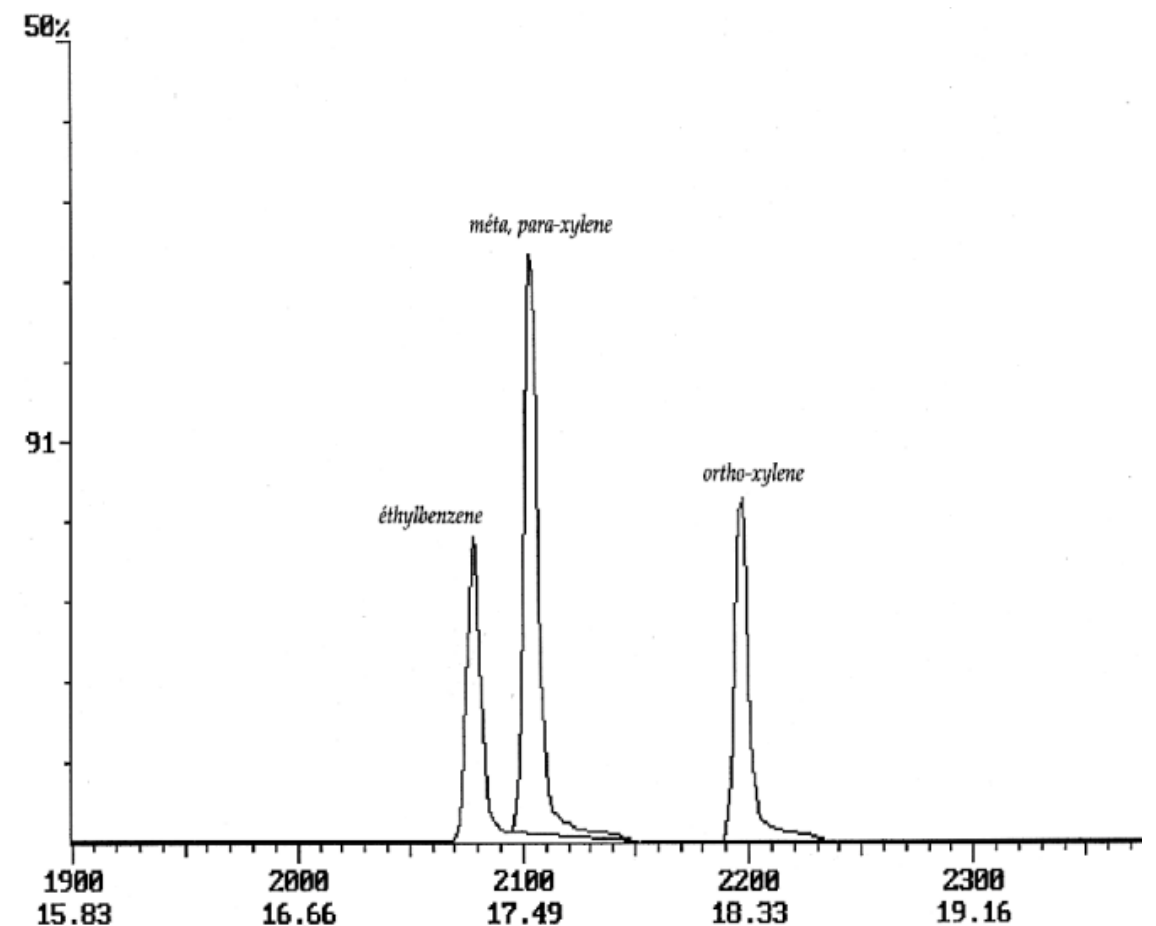


⇒ Les différences de vitesse résultantes amènent la séparation des constituants d'un mélange sous forme de **bandes** tout au long de la colonne.

2.1 Chromatogrammes

⇒ Si un détecteur qui répond à la concentration en soluté est placé à la sortie de la colonne et si son signal est enregistré en fonction du temps (ou du volume de la phase mobile écoulée), on obtient une série de pics symétriques. Ce graphique, qu'on appelle **chromatogramme**, est utilisé à la fois en analyse qualitative et quantitative.

Q/ Comment identifie-t-on les constituants d'un échantillon et comment peut-on déterminer leur quantité dans l'échantillon ?



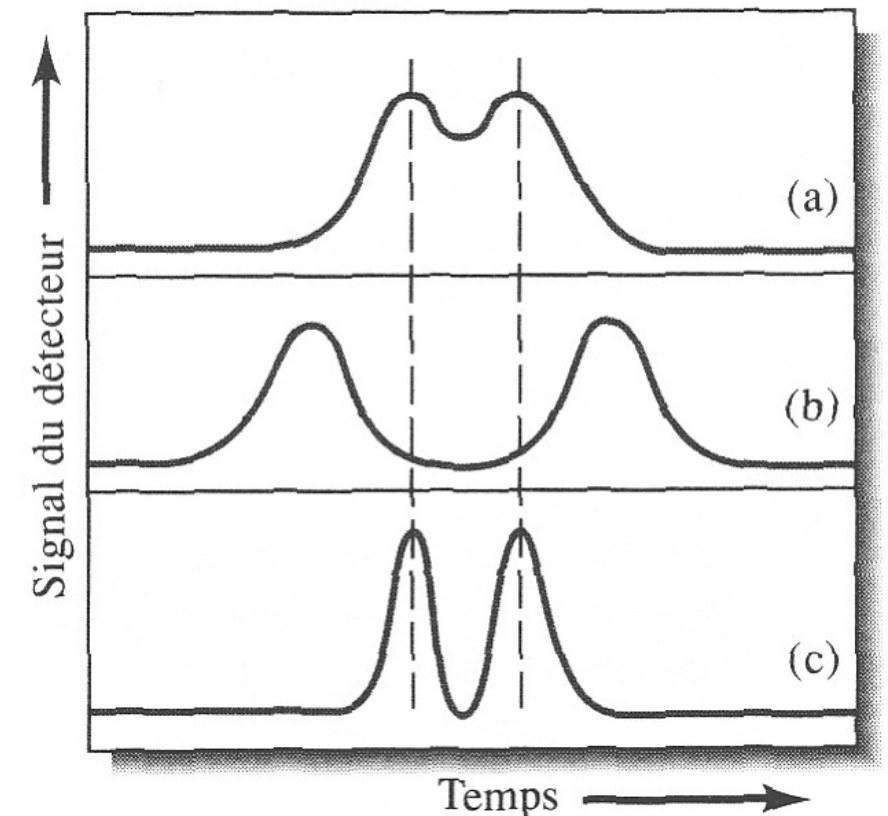
2.2 Influence de la vitesse relative de déplacement et de l'élargissement du pic sur la résolution

⇒ Si on revient à l'exemple précédent, puisque B est plus fortement retenu que A par la phase stationnaire, B se déplace plus lentement. Il s'ensuit que la distance entre les 2 bandes ↗ au cours de leur progression dans la colonne.

⇒ Cependant, il se produit en même temps un élargissement de chacun des 2 pics, ce qui ↘ l'efficacité de la séparation.

Bien que l'élargissement soit inévitable, on peut aisément établir des conditions telles qu'il se produise plus lentement que la séparation. Dans ce cas, la résolution devient possible à condition que la colonne soit assez longue.

Q/ Commenter les chromatogrammes (a), (b) et (c) :



⇒ Divers paramètres chimiques et physiques influencent les vitesses de séparation et d'élargissement des pics. C'est ainsi qu'on peut souvent améliorer le pouvoir séparateur en contrôlant les paramètres qui soit :

- (1) On ↗ la vitesse de séparation des pics ;
- (2) On ↘ leur vitesse d'élargissement.

⇒ Les **paramètres qui contrôlent les vitesses relatives de déplacement** des solutés à travers une phase stationnaire sont examinés dans le paragraphe suivant.

⇒ On considérera ensuite les **facteurs qui déterminent la largeur des pics**.

II - La vitesse de déplacement des solutés

Le pouvoir séparateur d'une colonne dépend principalement des vitesses relatives d'élution. Ces vitesses sont elles-mêmes déterminées par les **coefficients de distribution** des solutés entre les 2 phases.

1) Les coefficients de distribution en chromatographie

⇒ Toutes les séparations chromatographiques sont basées sur les différences de répartition des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire. Pour le soluté A, cet équilibre est :

$$A_{\text{mobile}} = A_{\text{stationnaire}}$$

⇒ La constante d'équilibre de cette réaction est appelée **rapport de distribution ou coefficient de distribution**, et est défini par :

$$K = D = \frac{C_S}{C_M}$$

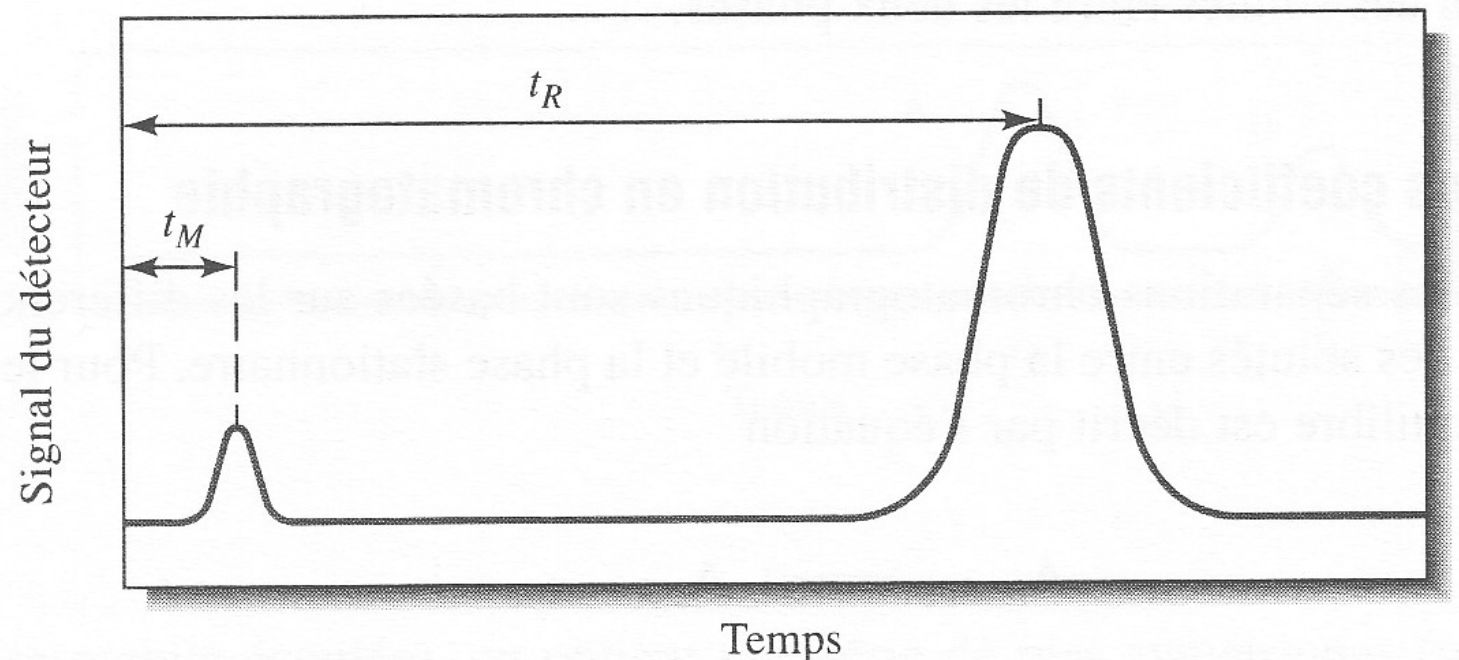
Où C_S est la concentration analytique du soluté dans la phase stationnaire et C_M celle de la phase mobile.

2) Le temps de rétention

⇒ La figure schématise un chromatogramme présentant 2 pics.

Le petit pic à gauche est celui d'une espèce **qui n'est pas retenue** par la phase stationnaire. L'intervalle de temps t_M requis avant que ce pic n'apparaisse est appelé **temps mort**. (C'est une mesure inverse de la vitesse moyenne de déplacement des molécules de la phase mobile).

Exemple de chromatogramme pour un mélange à deux constituants. Le petit pic à gauche correspond à un soluté qui n'est pas retenu sur la colonne et qui atteint le détecteur pratiquement à la même vitesse que l'éluant. Son temps de rétention t_M est donc approximativement égal au temps nécessaire pour qu'une molécule de la phase mobile parcoure la colonne.



⇒ L'échantillon contient souvent une telle espèce non retenue. Si ce n'est pas le cas, il est usuel d'en ajouter une.

⇒ Le grand pic à droite est celui d'un analyte. On appelle **temps de rétention t_R** , le temps requis pour que ce pic atteigne le détecteur.

3) Relation entre vitesse de déplacement et coefficient de distribution

⇒ La vitesse moyenne de déplacement du soluté $\langle v \rangle = L/t_R$ où L est la longueur utile de la colonne.

⇒ La vitesse linéaire moyenne u des molécules dans la phase mobile est donnée par :

$$u = L/t_M.$$

1/ Relier la vitesse de déplacement d'un soluté $\langle v \rangle$ en fonction de la vitesse linéaire moyenne u des molécules de la phase mobile :

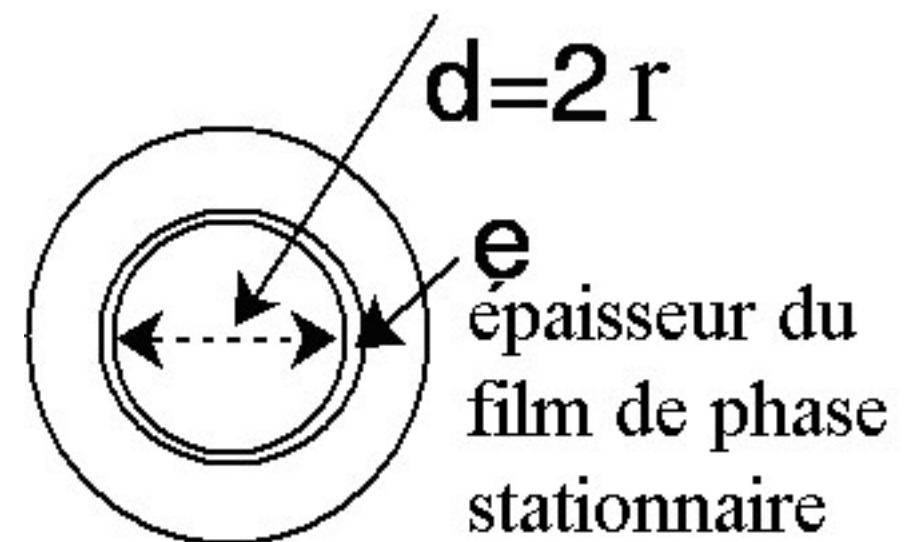
2/ Sachant que le débit D est une constante chromatographique, exprimer $\langle v \rangle$ en fonction des quantité de soluté dans la phase mobile n_M et quantité totale de soluté (dans les deux phases) $n = n_M + n_S$.

On rappelle que le débit est défini par $D = \text{quantité}/\text{temps}$.

3/ En déduire une expression finale de $\langle v \rangle$ en fonction de u , C_M , V_M , C_S et V_S , puis en fonction de u , K , V_M et V_S :

⇒ Ces deux volumes peuvent être estimés si l'on connaît la structure géométrique interne de la colonne. On définit le rapport de phase $\beta = V_M/V_S$

4/ Montrer que $\beta = d/4e$:



4) La vitesse de déplacement du soluté : le facteur de capacité

⇒ Le **facteur de capacité (rétention)** ou **coefficient de distribution massique** (UICPA) (à ne pas confondre avec la "capacité de la colonne" qui exprime la quantité maximale de substance qu'elle peut fixer) est un paramètre expérimental important qui permet de décrire la vitesse de progression des solutés dans les colonnes. Le facteur de capacité k'_A est défini en termes de **quantités de soluté A** par :

$$k'_A = \frac{C_s \cdot V_s}{C_M \cdot V_M} = K_A \cdot \frac{V_s}{V_M}$$

1/ En déduire une expression entre $\langle v \rangle$ et u :

2/ Pour montrer comment k'_A peut être obtenu à partir d'un chromatogramme, on remplace les vitesses par leur définition de base :

⇒ Lorsque $k'_A \ll 1$, l'élution est si rapide qu'il est difficile de déterminer le temps de rétention exact.

Par contre, si $k'_A \geq 20$ ou 30 , les durées d'élution deviennent exagérément longues.

⇒ Les séparations s'effectuent de manière optimale lorsque les valeurs de k'_A des divers solutés du mélange considéré sont comprises entre 1 et 5.

⇒ En CPG, on peut modifier k'_A en agissant sur la température et le remplissage de la colonne.

⇒ En CPL, les facteurs de capacité peuvent être souvent optimisés en agissant sur la composition de la phase mobile et de la phase stationnaire.

5) Les vitesses de progression différentielle : le facteur de sélectivité (ou de séparation) α :

⇒ Le **facteur de sélectivité α** d'une colonne pour les 2 espèces A et B est défini par :

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A}$$

Où K_B est le coefficient de distribution de l'espèce B qui est la plus retenue, et K_A celui de A, l'espèce la plus rapidement éluée.

Cette définition implique que **$\alpha > 1$** .

On peut écrire :
$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A}$$

Q/ Déterminer l'expression qui permet de déterminer α , à partir d'un chromatogramme selon :

III - L'élargissement des bandes et l'efficacité des colonnes

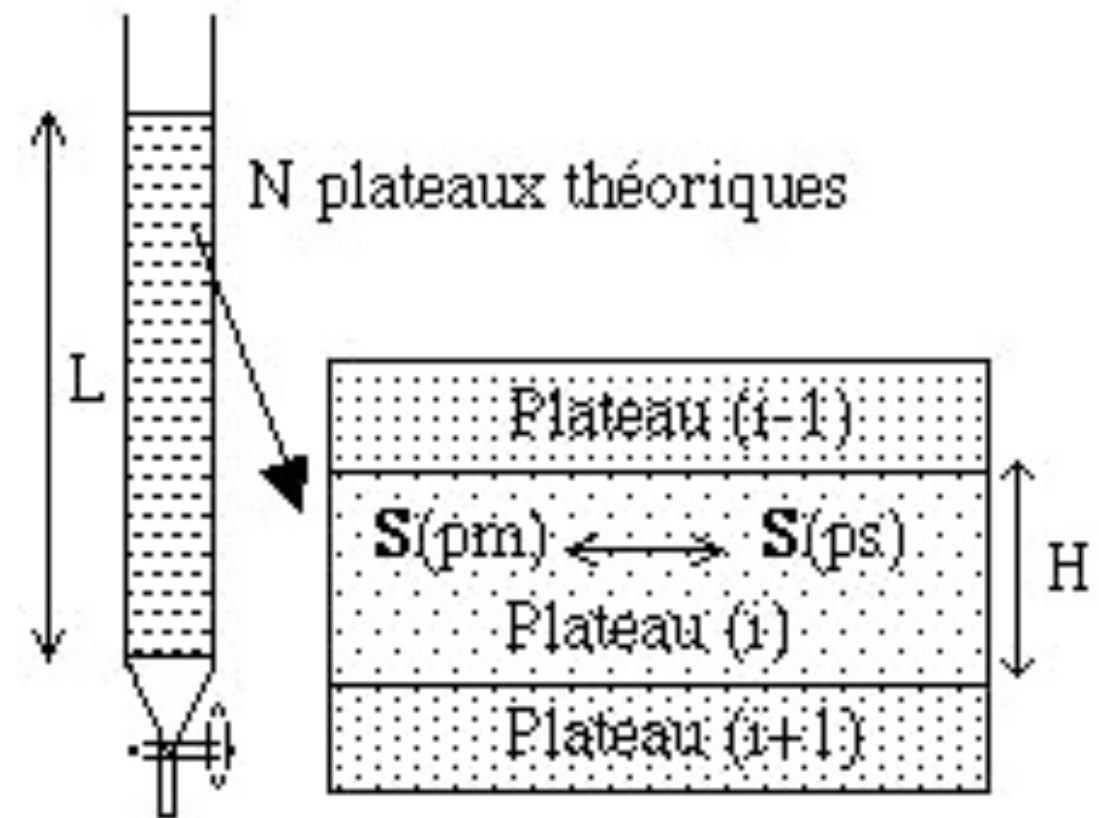
⇒ Une colonne de **N plateaux théoriques** est une colonne divisée en N petits disques cylindriques successifs.

On admet que la phase mobile progresse par sauts successifs d'un plateau théorique à l'autre.

⇒ Dans chaque plateau théorique, on observe une rétention du soluté S, du fait de l'équilibre de ce produit entre la phase mobile et la phase stationnaire.

⇒ Une colonne réelle aura donc "**N plateaux théoriques**" si elle se comporte comme une "colonne à distiller théorique" de N plateaux.

⇒ Pour exprimer l'efficacité d'une colonne de longueur L et de N plateaux théoriques, on définit la **hauteur H équivalente à un plateau théorique (ou HEPT)** :



$$H = L/N$$

1/ Comment varie l'efficacité d'une colonne en fonction de N ou H pour une colonne donnée ?

⇒ Ce paramètre varie entre 10 et 0,01 mm. Le paramètre H est intéressant car il est indépendant de la longueur de la colonne. Le tableau suivant montre le pouvoir de séparation des chromatographies les plus utilisées :

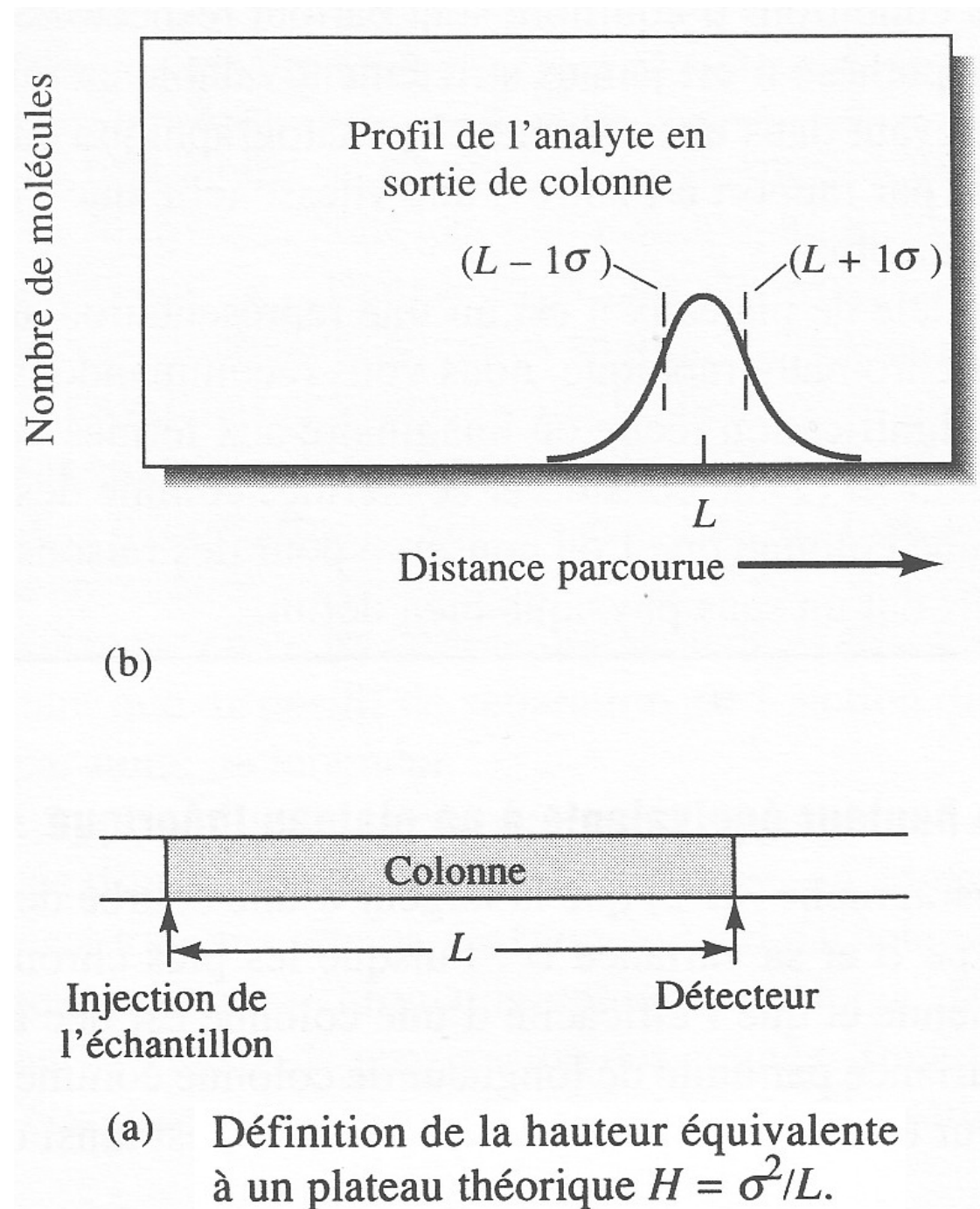
Type de chromatographies	Nombre de plateaux théoriques N	N/par mètre de colonne	H (HETP) en mm
CPG (colonne remplie de 2 m)	2000	1000	1
CPG (colonne capillaire de 25m)	100000	4000	0,25
CPL classique de 50 cm	100	200	5
HPLC de 10 cm	5000	50000	0,02

2/ Quelle est la colonne de CPG, respectivement de CPL la plus efficace ?

1 Définition de H, HEPT (point de vue statistique)

⇒ Puisque les pics chromatographiques sont d'allure gaussienne et que l'efficacité d'une colonne est liée à la largeur des pics, on utilise la variance par unité de longueur de colonne comme mesure de son efficacité. Ainsi :

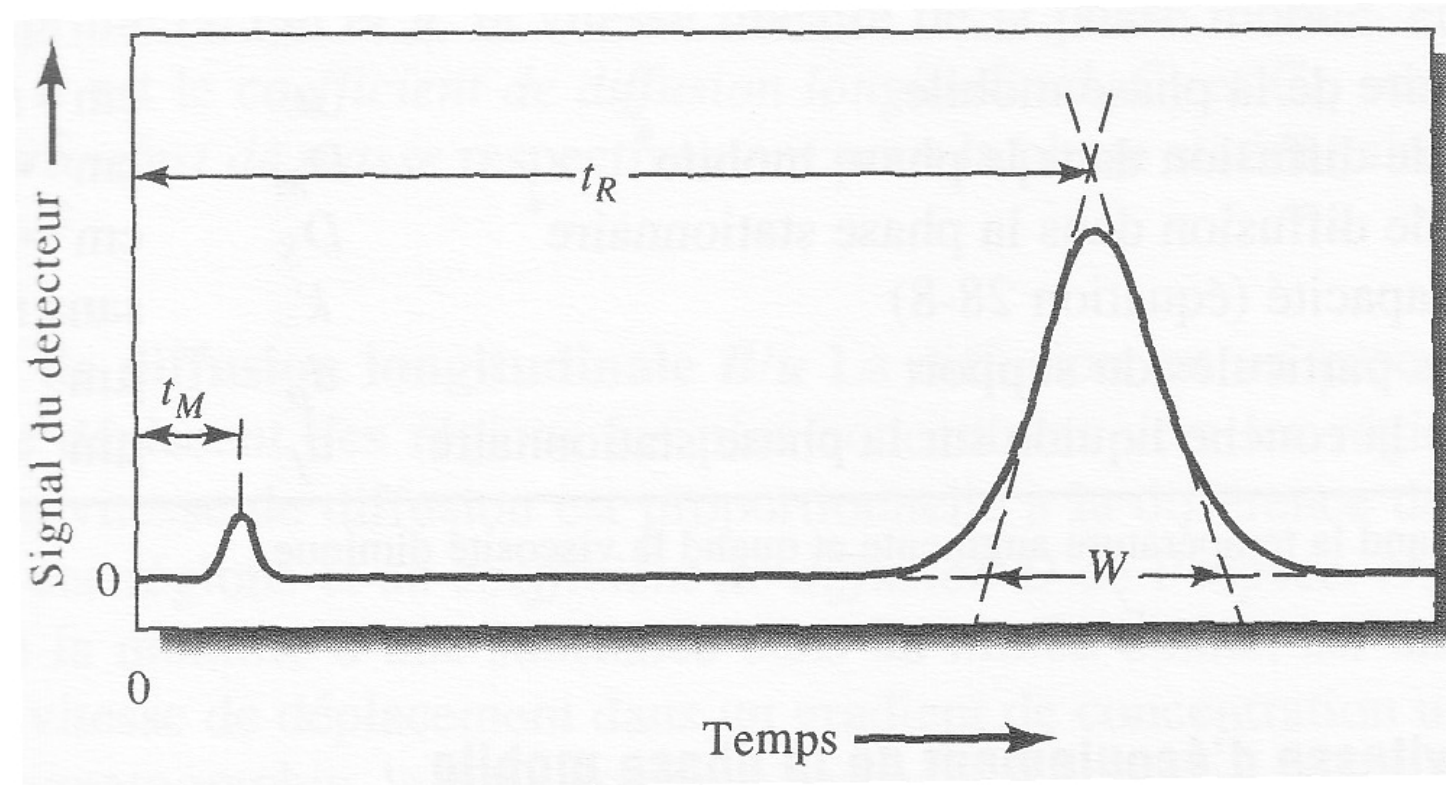
$$\begin{array}{c} \text{(cm)} \rightarrow \\ \text{(cm}^2\text{)} \swarrow \\ H = \frac{\sigma^2}{L} \\ \nwarrow \text{(cm)} \end{array}$$



2 Détermination expérimentale du nombre de plateaux théoriques dans une colonne

⇒ N et H sont les 2 paramètres utilisés dans la littérature et par les fabricants d'appareils pour évaluer les performances d'une colonne.

⇒ La figure ci-dessous montre comment on peut déterminer N à partir d'un chromatogramme :



Détermination de l'écart-type τ d'un pic chromatographique : $W = 4\tau$.

⇒ On mesure t_R , le temps de rétention d'un pic, et W , la base du triangle passant par les points d'inflexion de la courbe (en unités de temps).

⇒ On montre que N est donné par la relation :

$$N = 16. \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 = 5,54. \left(\frac{t_R}{\Delta} \right)^2$$

3) Les paramètres qui contrôlent l'efficacité d'une colonne

⇒ L'élargissement des pics, et la perte d'efficacité qui s'ensuit, résultent de la vitesse finie de plusieurs processus de transfert de masse pendant la progression du soluté. Certains des paramètres qui affectent ces vitesses peuvent être ajustés pour améliorer les séparations.

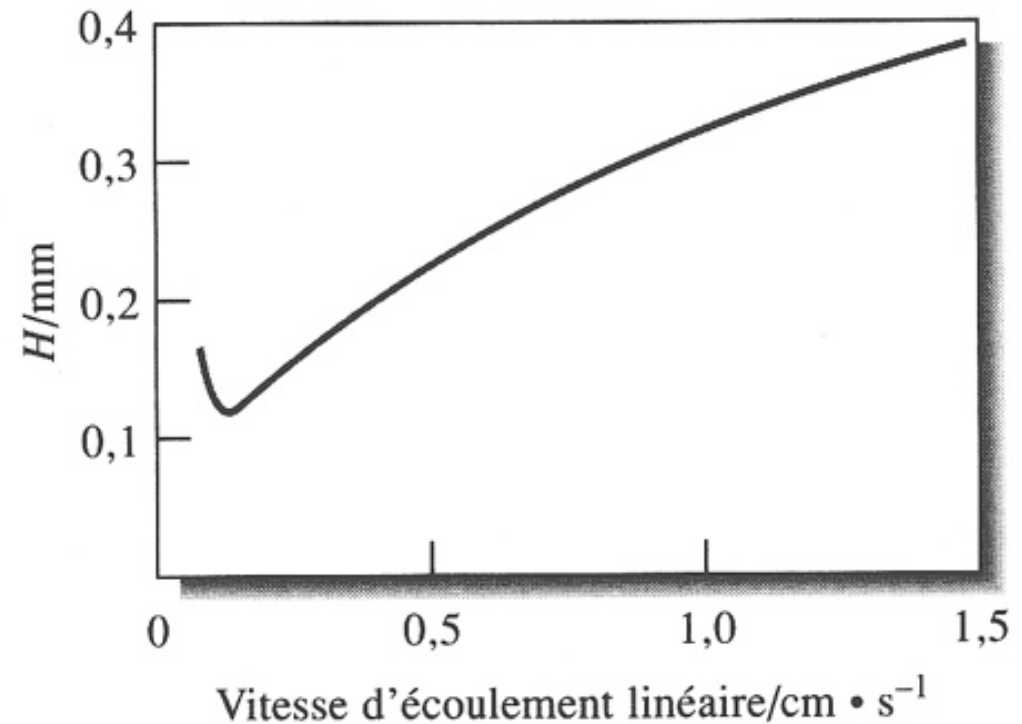
Paramètres qui affectent l'efficacité d'une colonne

Paramètre	Symbole	Unités usuelles
Vitesse linéaire de la phase mobile	u	$\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$
Coefficient de diffusion dans la phase mobile*	D_M	$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
Coefficient de diffusion dans la phase stationnaire*	D_S	$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
Facteur de capacité	k'	sans unité
Diamètre des particules du support	d_p	μm
Épaisseur de la couche liquide sur la phase stationnaire	d_f	μm

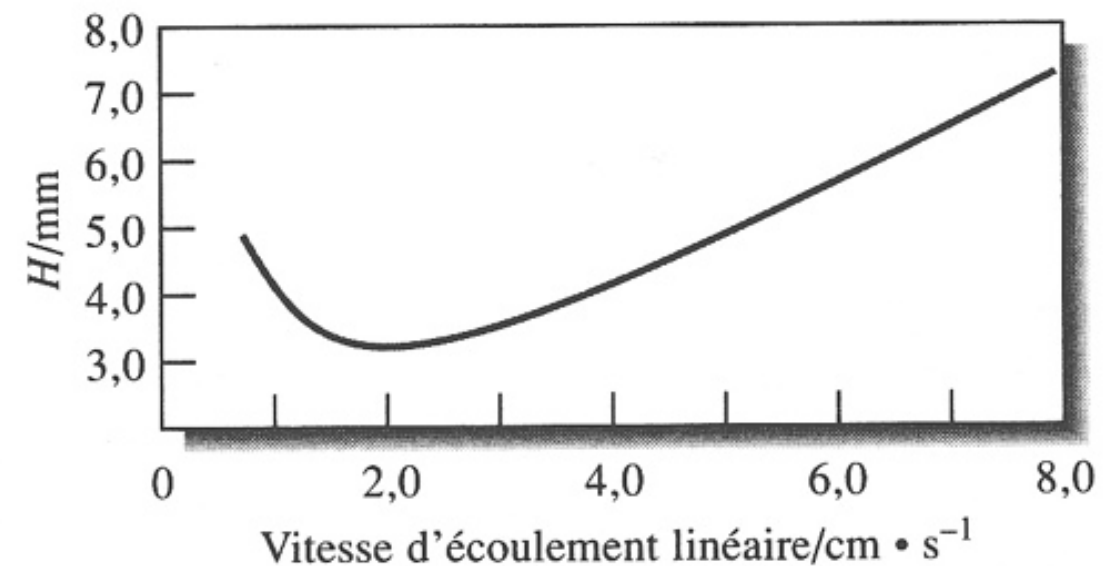
*Augmente quand la température augmente et quand la viscosité diminue.

3.1 Effet de la vitesse d'écoulement de la phase mobile

⇒ L'importance des effets cinétiques sur l'efficacité de la colonne dépend essentiellement de la durée du contact entre les 2 phases, qui dépend elle-même de la vitesse d'écoulement de la phase mobile.



(a) Chromatographie en phase liquide



(b) Chromatographie en phase gazeuse

Effet de la vitesse d'écoulement de la phase mobile sur la hauteur équivalente à un plateau théorique pour (a) la chromatographie en phase liquide et (b) la chromatographie en phase gazeuse sur colonne remplie.

1/ Comparer ces deux graphiques :

⇒ En général, les CPL sont obtenus à des vitesses d'écoulement plus faible que celles des CPG. Par ailleurs, les valeurs de H des colonnes de CPL sont plus faibles que celles de la CPG.

2/ Que pourrait-on dire sur l'efficacité des colonnes CPL par rapport à celle de CPG ?

Cet avantage est toutefois compensé par le fait qu'il est pratiquement impossible d'employer des colonnes liquides de plus de 25 à 50 cm (en raison des fortes pertes de charge), alors que les colonnes de CPG peuvent mesurer de 10 à 100 m. Par conséquent, c'est pour les colonnes de CPG que le nombre total de plateaux théoriques est le plus grand, et donc l'efficacité la meilleure.

3.2 Théorie de l'élargissement des pics : théorie dynamique de la chromatographie

⇒ Ce modèle issu de la mécanique des fluides a été mis au point par J.J. Van Deemter. En 1956, ce physicien a mis au point l'équation qui relie H (HEPT) aux caractéristiques physiques de la colonne et de la phase mobile :

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



u étant la vitesse linéaire de la phase mobile ;

⇒ Où les constantes A , B et C sont respectivement des coefficients de diffusion turbulente, de diffusion longitudinale et de résistance au transfert de masse.

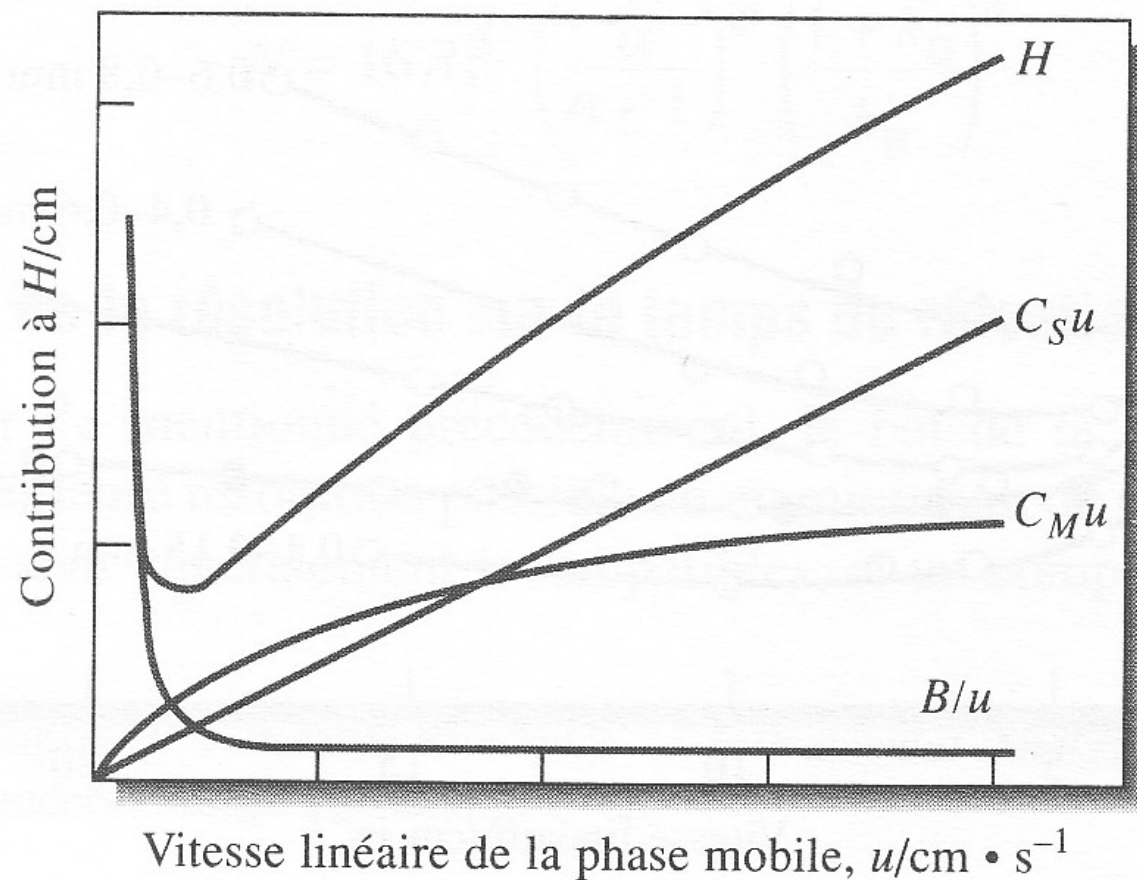
Sa version modernisée peut s'écrire :

$$\text{(cm)} \longrightarrow H = \frac{B}{u} + C_S \cdot u + C_M \cdot u \longleftarrow \text{(cm.s}^{-1}\text{)}$$

B est le coefficient de diffusion longitudinale, C_S et C_M les coefficients de transfert de masse respectivement pour la phase stationnaire et la phase mobile.

3.3 Effet de la vitesse de la phase mobile sur les termes de l'équation de Van Deemter

⇒ La figure montre la variation des 3 termes de l'équation de Van Deemter en fonction de la vitesse de la phase mobile. La courbe supérieure qui somme ces différents effets, démontre qu'il existe une vitesse d'écoulement optimale où H est minimale et l'efficacité de séparation maximale.

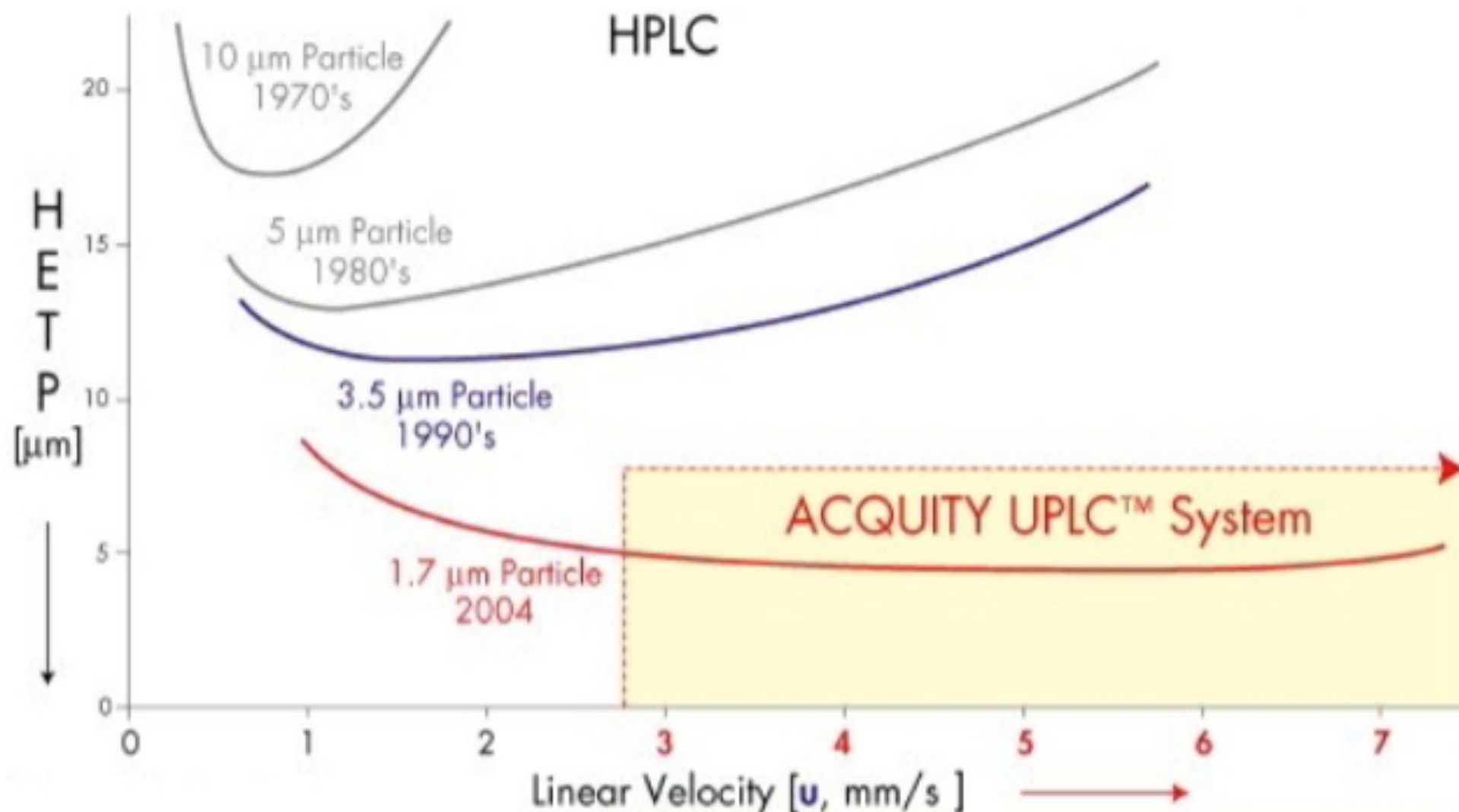


Contribution à H des divers coefficients de transfert de masse. $C_S u$ résulte de la vitesse de transfert de masse de et vers la phase stationnaire, $C_M u$ provient d'une limitation de la vitesse de transfert de masse dans la phase mobile et B/u est associé à la diffusion longitudinale.

3.4 Résumé des méthodes permettant de réduire l'élargissement des pics

Le diamètre des particules qui remplissent la colonne, et le diamètre de la colonne, sont deux paramètres importants dont le contrôle permet d'améliorer l'efficacité de la colonne.

L'effet de la granulométrie est illustré sur la série de courbes ci-dessous. par ailleurs, pour tirer parti de l'effet du diamètre de la colonne, on tend actuellement à réduire le diamètre des colonnes.



Q/ En étudiant le graphique précédent, que peut-on dire de l'efficacité des colonnes ?
Faire le lien avec le coefficient de transfert de masse.

Remarque : Si la phase mobile est gazeuse, la vitesse de diffusion longitudinale, et donc la valeur de H , peut être réduite en abaissant la température et donc le coefficient de diffusion D_M .

En CPL, l'effet de la température est faible car le terme de diffusion longitudinale influence peu la valeur globale de H .

IV - La résolution de la colonne

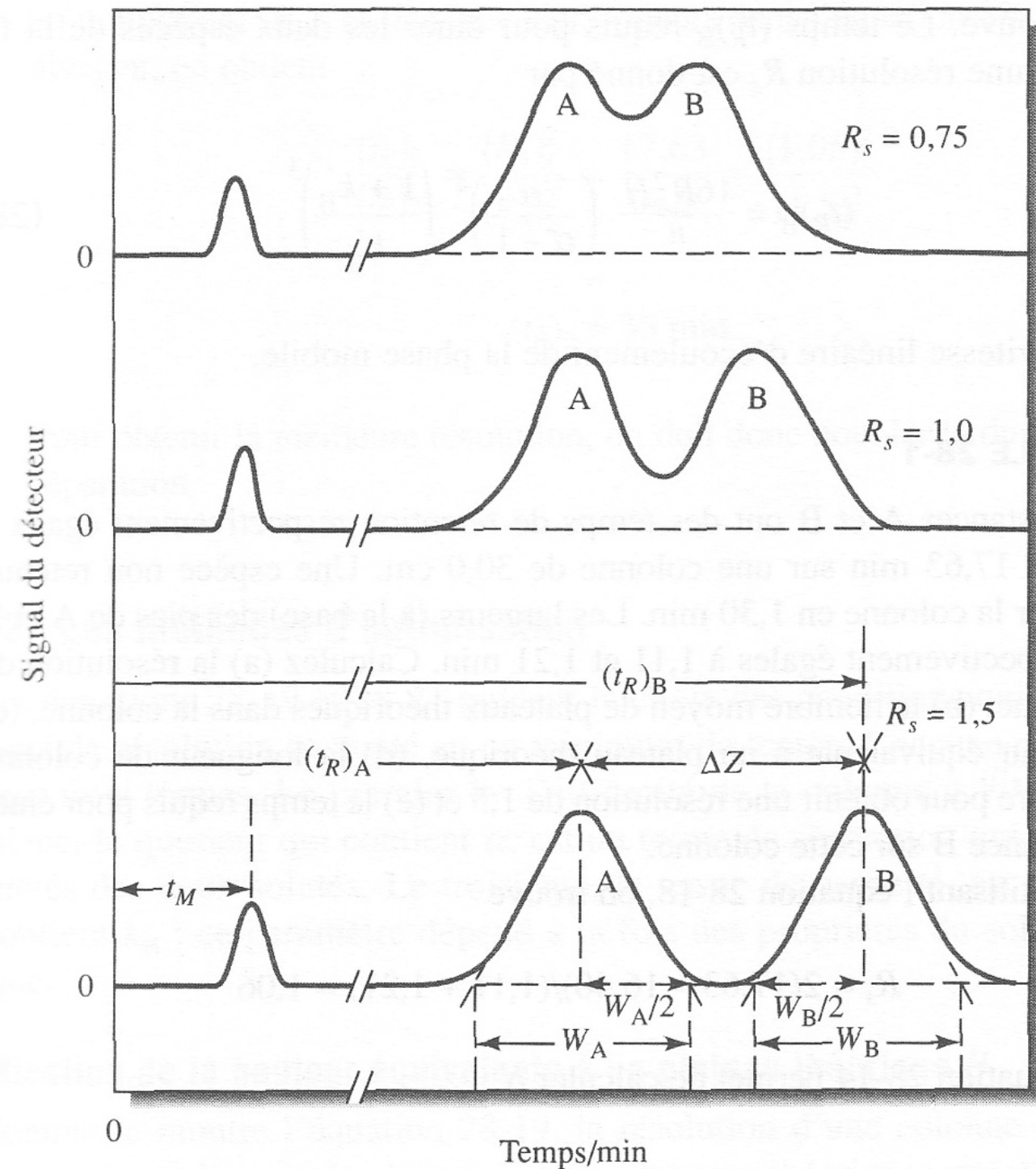
1) Définition

⇒ La **résolution R_s** d'une colonne donne une mesure quantitative de son aptitude à séparer 2 analytes.

⇒ La signification de ce terme est illustré sur la figure qui représente les chromatogrammes des espèces A et B sur 3 colonnes qui ont des degrés de résolution différents.

La résolution de chaque colonne est défini par :

$$R_s = \frac{2\Delta Z}{W_A + W_B} = \frac{2(t_{R_B} - t_{R_A})}{W_A + W_B}$$



Séparation pour trois résolutions :
 $R_s = 2 \Delta Z / (W_A + W_B)$.

➡ Une résolution de 1,5 permet la séparation pratiquement complète de A et B, ce qui n'est pas le cas d'une résolution de 0,75.

Pour une résolution de 1,5 le chevauchement est d'environ 0,3 % alors que pour une résolution de 1,0 le pic A contient environ 4 % de B et le pic B environ 4 % de A.

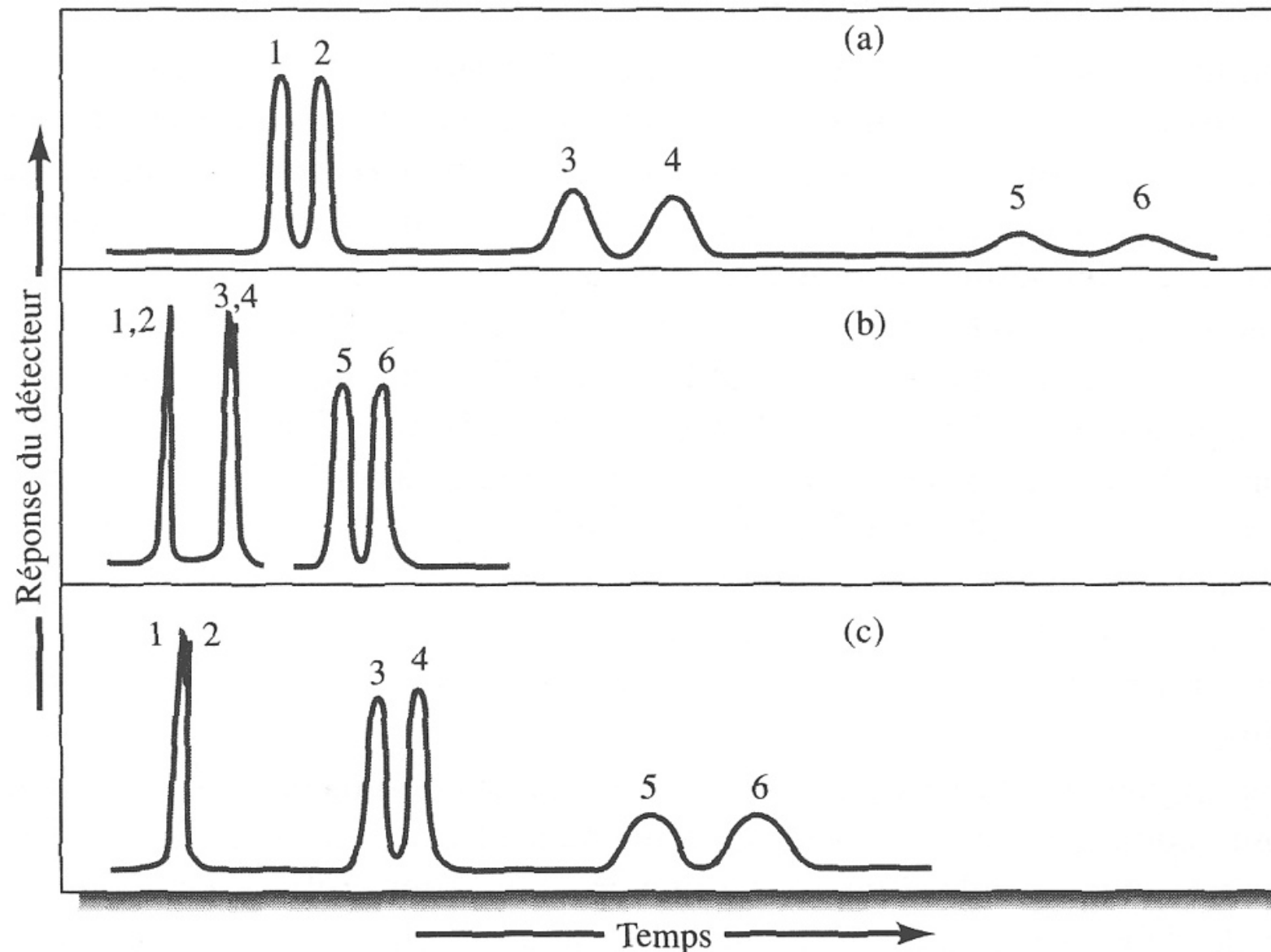
Pour une phase stationnaire donnée, on peut améliorer la résolution en allongeant la colonne, donc en ↗ N.

Q/ Quel inconvénient cela va-t-il induire ?

2) La résolution des mélanges complexes

⇒ La figure présente les chromatogrammes hypothétiques d'un mélange de 6 constituants groupés en 3 paires dont les coefficients de distribution, et dont les facteurs de capacité, sont extrêmement différents.

Résolution de mélanges complexes
par chromatographie



1/ Dans le chromatogramme (a), les conditions ont été ajustées pour que les facteurs de capacité des constituants 1 et 2 (k'_1 et k'_2) aient des valeurs optimales comprises entre 1 et 5. Est-ce le cas pour les autres constituants ?

2/ Dans le cas du chromatogramme (b), on modifie les conditions pour optimiser la séparation des constituants 5 et 6, que dire des valeurs de k' pour les 4 premiers pics ? Quelle en est la conséquence, et comment résoudre le problème ?

- ⇒ Ainsi, les conditions au début de l'élution doivent être celles qui produisent le chromatogramme (a). Immédiatement après l'élution des constituants 1 et 2, on modifie les conditions pour se placer dans la situation optimale de séparation des constituants 3 et 4, comme dans le chromatogramme (c).
- ⇒ Dès la sortie des pics de ces substances, l'élution doit se poursuivre dans les conditions que l'on a utilisées pour obtenir le chromatogramme (b).
- ⇒ Une telle procédure permet souvent d'obtenir une bonne séparation de tous les constituants d'un mélange en un minimum de temps.

Pour la CPL, les optimisations s'obtiennent en changeant la composition de la phase mobile pendant l'élution (**gradient de composition** ou **programmation de solvant**).

Pour la CPG, l'↗ de la température (**gradient de température** ou **programmation de température**) permet d'obtenir les conditions de séparation.

V - Applications de la chromatographie

1) Analyse qualitative

- ⇒ La chromatographie est couramment utilisée pour mettre en évidence la présence ou l'absence de substances dans des mélanges qui contiennent un nombre limité d'espèces connues.
- ⇒ Ainsi dans un hydrolysat de protéines, on peut détecter au moins 30 aa avec une faible probabilité d'erreur. Par contre, puisqu'un chromatogramme ne fournit qu'une seule information sur chaque espèce dans un mélange (**son temps de rétention**), l'utilisation de cette technique pour l'analyse qualitative d'échantillon complexes de composition inconnue est fortement limitée.
- ⇒ On a remédié à cette limitation en **couplant directement** la sortie des colonnes à des spectrophotomètres UV, IR ou à des spectromètres de masse (MS).
- ⇒ Le chromatogramme permet souvent de s'assurer de l'**absence** d'une espèce donnée. En effet, si un échantillon ne donne pas de pic au même temps de rétention qu'un étalon injecté dans les mêmes conditions expérimentales, c'est la preuve que le composé en question est absent (ou qu'il est présent à une cc inférieure à la limite de détection du système).

2) Analyse quantitative

2.1 Dosages basés sur la hauteur du pic

- ⇒ La hauteur d'un pic s'obtient en joignant par une droite les lignes de base de part et d'autre du pic en mesurant la longueur de la verticale abaissée sur cette droite depuis le sommet du pic.
- ⇒ Cette mesure peut habituellement s'effectuer avec une bonne précision et elle conduit à des résultats exacts, à moins que des variations de fonctionnement de la colonne ne modifient la largeur du pic pendant le laps de temps nécessaire à l'obtention des chromatogrammes de l'échantillon et des étalons.
- ⇒ Les paramètres qui doivent être contrôlés soigneusement sont la température de la colonne, la vitesse d'écoulement de l'éluant et l'injection de l'échantillon. L'influence de la vitesse d'injection de l'échantillon est particulièrement critique pour les 1^{er} pics d'un chromatogramme. Des erreurs relatives de 5 à 10 % ne sont pas rares lorsque l'injection se fait à l'aide d'une seringue.

2.2 Dosages basés sur l'aire du pic

⇒ L'aire du pic est indépendante des effets d'élargissement dus aux paramètres mentionnés dans le paragraphe précédent. C'est pourquoi, l'aire est un paramètre analytique plus satisfaisant que la hauteur. Par contre, la hauteur se mesure plus facilement, et pour les pics étroits, sa détermination plus exacte.

⇒ Les appareils modernes sont équipés d'intégrateurs qui fournissent des mesures précises des aires relatives des pics.

Si l'on ne dispose pas d'intégrateur, on peut le faire manuellement. Une méthode simple, applicable aux pics symétriques de largeur raisonnable, consiste à multiplier la hauteur du pic par sa largeur à mi-hauteur.

2.3 Étalonnage externe

⇒ On réalise un chromatogramme de référence, pour lequel on a injecté un volume V d'une solution de référence de cc $C_{\text{réf}}$ et on repère l'aire $A_{\text{réf}}$ du pic.

⇒ On réalise un chromatogramme de l'échantillon dans les mêmes conditions c.a.d injection du même volume V de l'échantillon dans le même solvant de cc $C_{\text{éch}}$, et on repère $A_{\text{éch}}$ du pic :

$$C_{\text{réf}} = K.A_{\text{réf}} \quad \text{et} \quad C_{\text{éch}} = K.A_{\text{éch}}$$

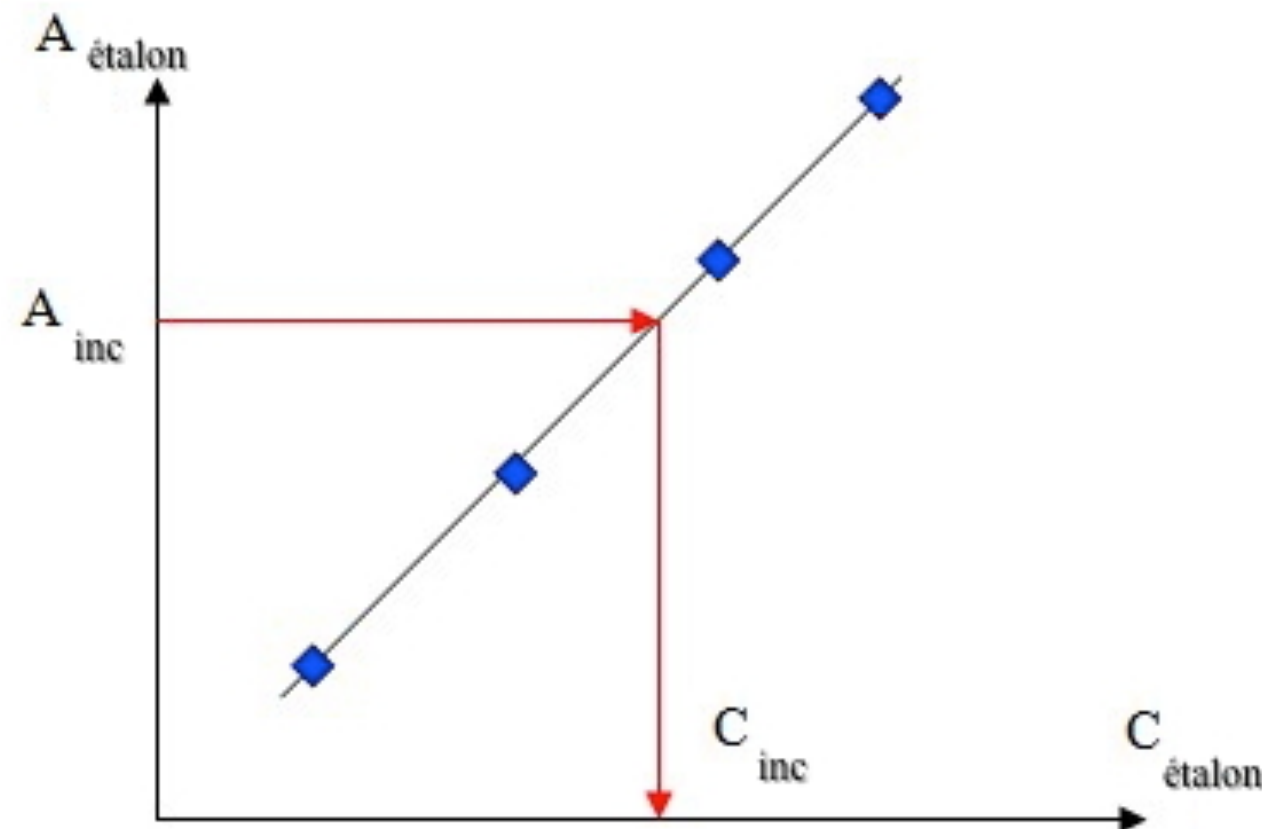
$$\Rightarrow C_{\text{éch}} = C_{\text{réf}} \cdot \frac{A_{\text{éch}}}{A_{\text{réf}}}$$

La méthode sera d'autant meilleure que $C_{\text{réf}}$ et $C_{\text{éch}}$ sont du même ordre de grandeur et si l'on effectue plusieurs échantillons.

2.4 Étalonnage à l'aide de solution connue (gamme)

⇒ La méthode consiste à préparer une série de solutions étalons dont la composition est proche de la solution inconnue. À partir des chromatogrammes des solutions étalons, on établit un graphe des aires des pics ou de leurs hauteurs en fonction de la cc.

⇒ La fonction ainsi obtenue doit être une droite qui passe par l'origine. Les analyses sont basées sur ce graphe, il faut donc fréquemment répéter l'étalonnage pour obtenir la meilleure exactitude.



⇒ La source d'erreur la plus importante propre à cette méthode est liée à l'incertitude sur le volume d'échantillon; il arrive aussi que la vitesse d'injection y contribue. Le volume des échantillons est habituellement petit ($\approx 1 \mu\text{L}$) et les incertitudes relatives associées à l'injection de volumes reproductibles de cette taille à l'aide d'une microsiringue peuvent être de l'ordre de plusieurs %. La situation est encore plus difficile en CPG où l'échantillon doit être injecté dans un sas porté à haute température. Dans ce cas l'évaporation qui se produit à l'orifice de l'aiguille peut entraîner de grandes variations du volume injecté.

2.5 Méthode de l'étalon interne

⇒ La meilleure précision en chromatographie quantitative s'obtient en utilisant des étalons internes, car on minimise les incertitudes introduites par l'injection de l'échantillon, la vitesse d'écoulement et les variations d'état de la colonne.

⇒ Dans cette méthode, une quantité soigneusement mesurée d'un étalon interne (**constitué d'une substance non présente dans le mélange à analyser**) est introduite dans chaque étalon et dans chaque échantillon; le rapport de l'aire (ou la hauteur) du pic de l'analyte à l'aire (ou la hauteur) du pic de l'étalon interne constitue le paramètre analytique.

⇒ Pour que cette méthode fournisse de bons résultats, il faut que le pic de l'étalon interne soit bien séparé des pics de tous les autres constituants présents dans l'échantillon, mais il doit être proche du pic de l'analyte.

⇒ L'utilisation d'un étalon interne bien adapté peut conduire à des précisions relatives de 0,5 à 1 %.

