



Chapitre 1: Généralités sur la chromatographie

Module: Techniques d'Analyses Chromatographiques

Master 1 chimie Analytique

2025/2026

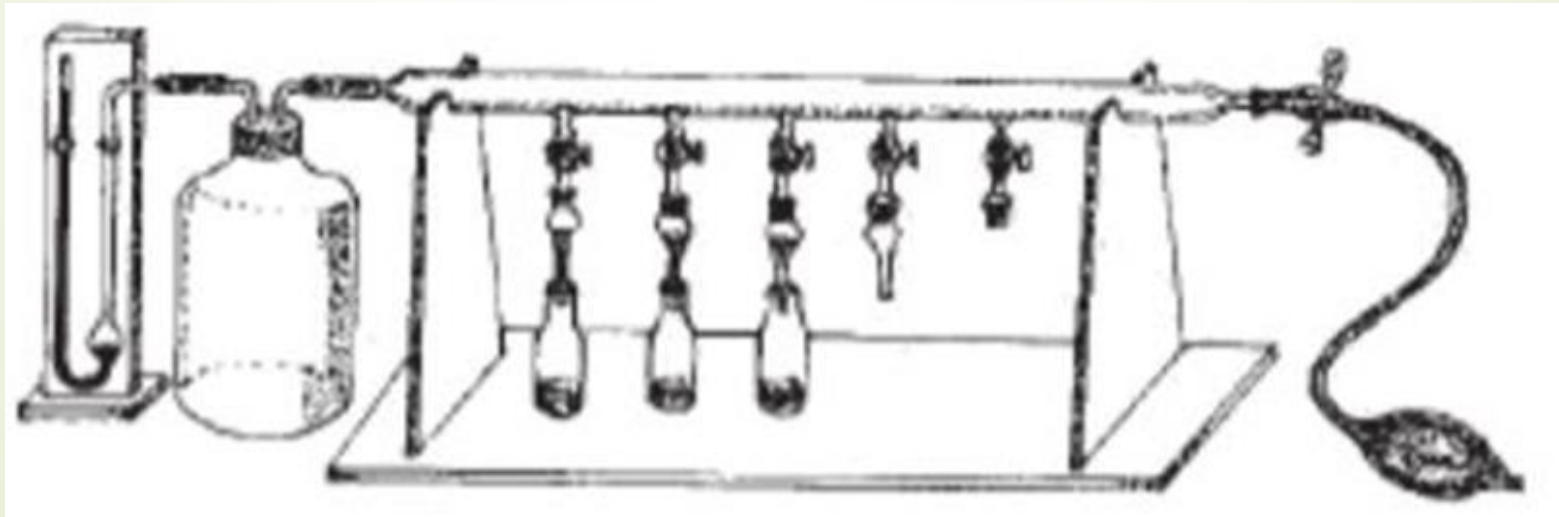


1. Définitions et principe de la chromatographie

La chromatographie est une méthode d'analyse utilisée pour séparer, identifier et quantifier les composants d'un mélange homogène, qu'il soit liquide ou gazeux. Ces composants, appelés solutés, sont entraînés par une phase mobile (liquide ou gazeuse) qui circule à travers ou le long d'une phase stationnaire, fixe, disposée soit dans une colonne, soit sur une surface plane. La phase stationnaire agit comme un frein, retardant différemment le passage des solutés, ce qui permet leur séparation.

Ce procédé a donné naissance à une méthode analytique instrumentale qui a un très grand domaine d'applicabilité et par suite se trouve très répandue (Chimie ; biochimie ; pharmacie ; industries chimiques, agro-alimentaires).

En 1906, un chimiste russe, Mikhail Tswett, sépare des pigments végétaux colorés sur une colonne remplie de carbonate de calcium pulvérulent, les pigments sont entraînés avec de l'éther de pétrole.



- Une **colonne** est remplie avec une **phase stationnaire** ou fixe.
- Une **phase mobile**, ou solvant organique (ou mélange de solvants) ou **éluant**, est introduite au sommet de la colonne et entraîne les constituants (ou solutés) du mélange.
- Le solvant entraîne les molécules de solutés. Il existe une série de **transferts entre les 2 phases**.
- Les constituants du mélange migrent avec des **vitesse**s différentes. Ils sont élués (déplacés) et recueillis séparément, en solution dans la phase mobile, dans un détecteur de concentration.
- Un **chromatogramme** présente des pics en fonction du temps.

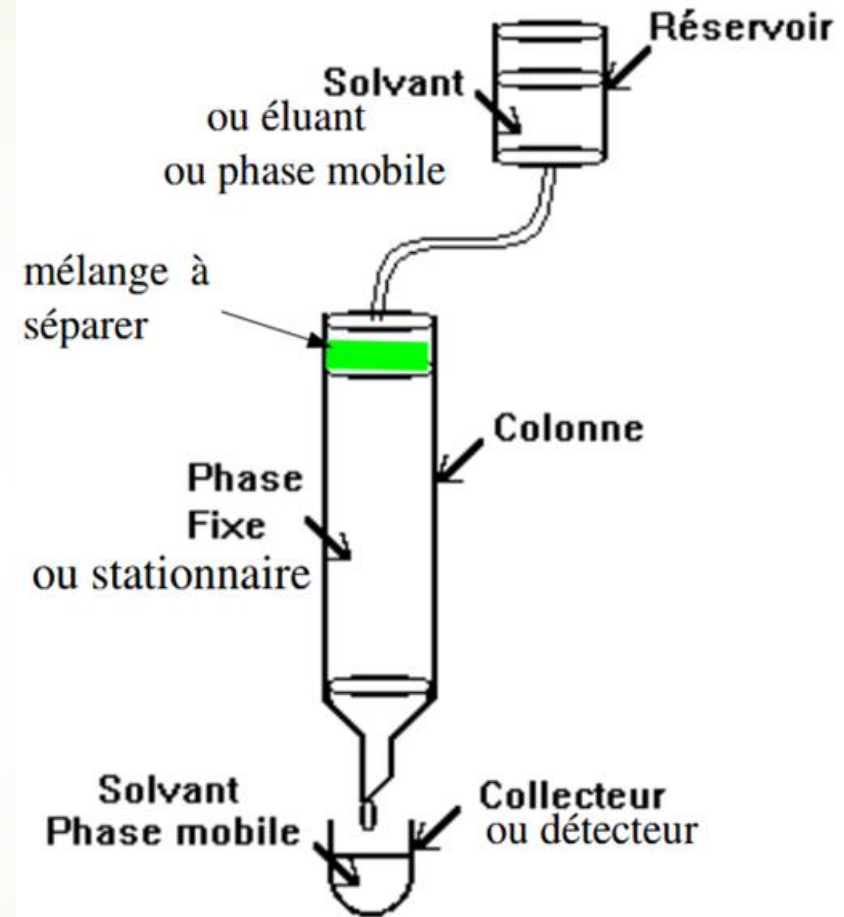
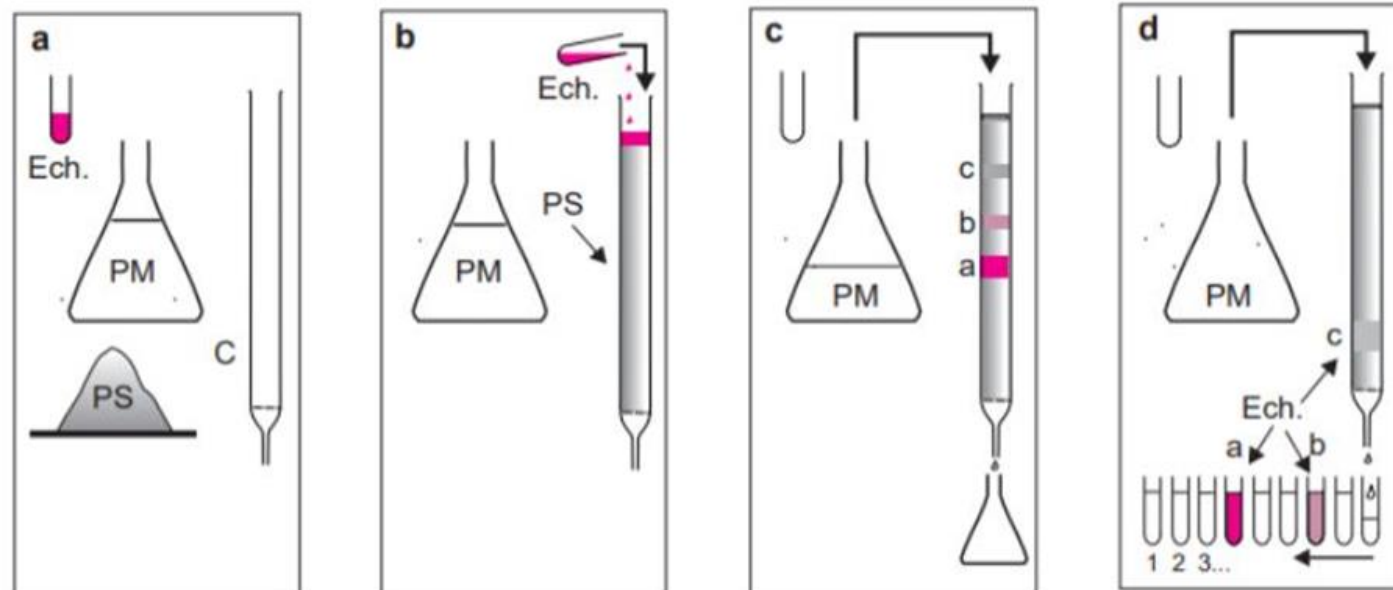
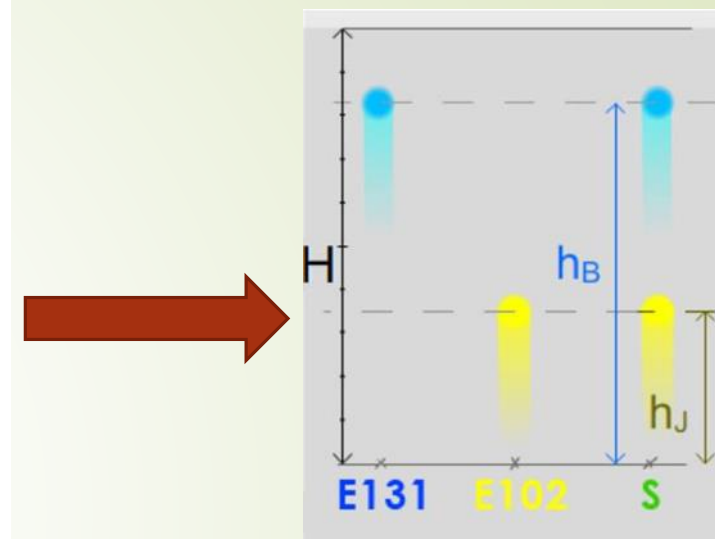


Fig. Chromatographie d'élu
tion sur colonne




Expérience de base en chromatographie

a) Les ingrédients nécessaires C, colonne, PS, phase stationnaire, PM, phase mobile et E, échantillon ; b), le dépôt de l'échantillon ; c) le début de l'élution ; d) la récupération des produits après séparation.



Le suivi de la séparation de sirop de menthe par la chromatographie sur couche mince (CCM)



2, Avantage : Séparation, identification et quantification de très faibles quantités de produits.

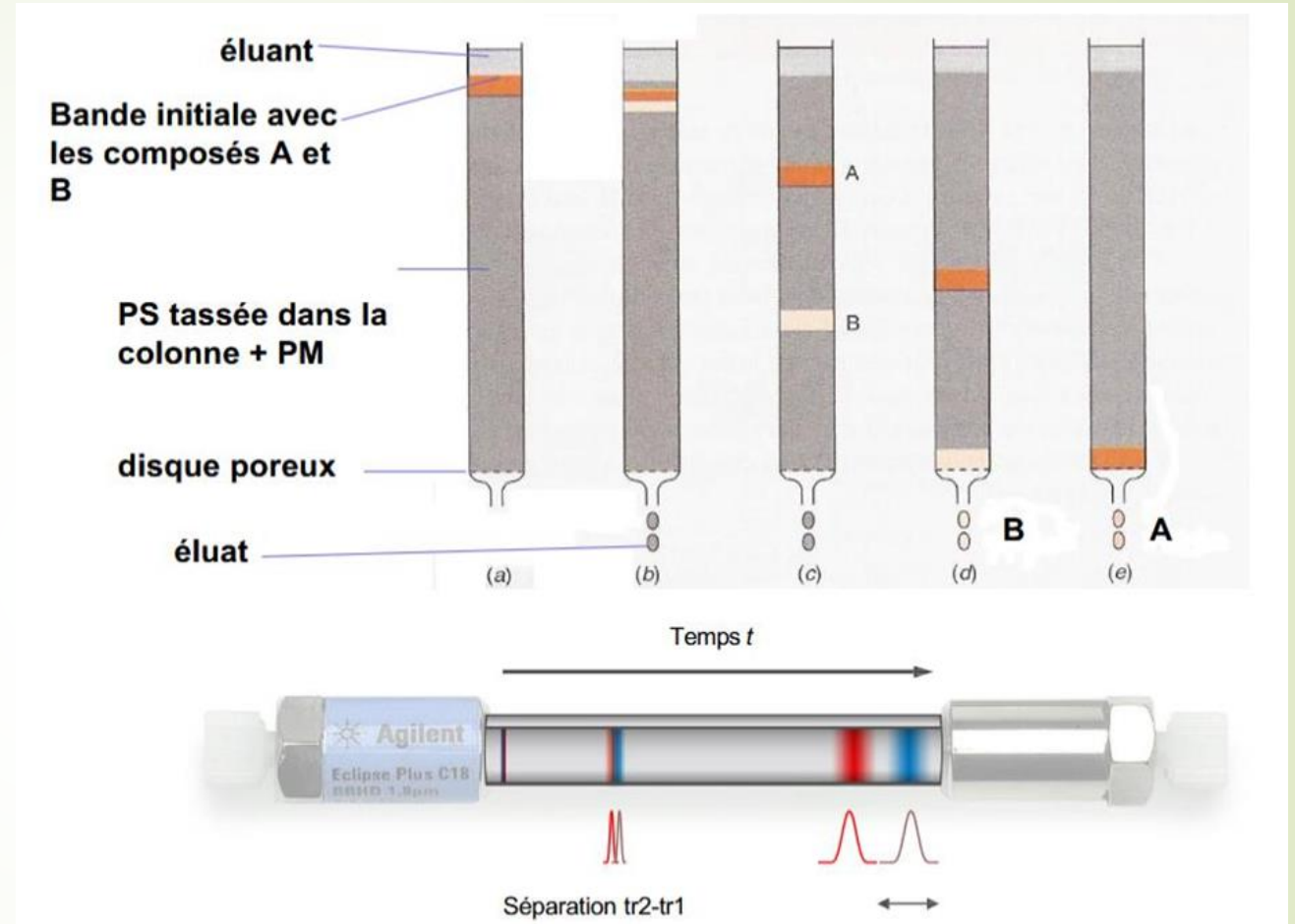
- ☐ Phase stationnaire : phase fixe soit sur la surface intérieure d'une colonne (CC) soit sur une surface plane (CCM).
- ☐ Phase mobile : phase qui se déplace à travers la phase stationnaire, en entraînant les analytes.
- ☐ La phase mobile ne doit pas interagir avec la phase stationnaire, mais uniquement avec les analytes (substances que l'on analyse).

3,Principe :

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants d'un mélange reposant sur les équilibres de concentration qui apparaissent lorsqu'un composé (soluté) est mis en présence de deux phases non miscibles : la phase stationnaire (emprisonnée dans la colonne) et la phase mobile (Fluide : gaz ou liquide) qui se déplace. [Fluide : Tout corps qui épouse la forme de son contenant (les liquides, les gaz). Opposé à solide].

soluté A (phase mobile) \leftrightarrow soluté A (phase stationnaire)

La séparation est basée sur l'entraînement différentiel des constituants du mélange. Ces derniers parcourent la phase stationnaire avec des temps proportionnels à leurs propriétés intrinsèques (taille, structure, ...) ou à leur affinité avec la phase stationnaire (polarité). La séparation idéale est schématisée sur la Figure ci-après :



On peut classer les méthodes chromatographiques de trois manières :

- selon la nature des phases
- selon la nature des phénomènes mis en jeu dans la séparation
- selon la technologie mise en œuvre.

4. Classification des méthodes chromatographiques

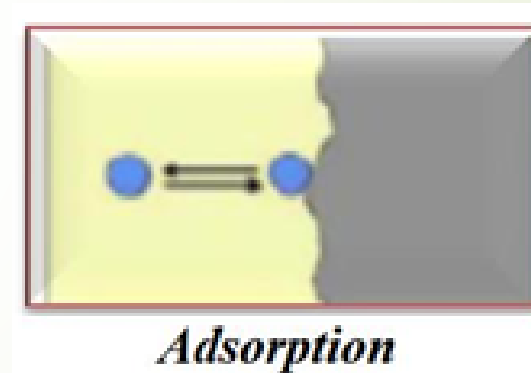
A . Classification selon la nature des phases

- ❑ Selon la nature de la phase mobile on distingue :
 - la chromatographie en phase liquide CPL
 - la chromatographie en phase gazeuse CPG
 - la chromatographie en phase supercritique CPS
- ❑ Selon la nature de la phase stationnaire (Pm/PS) on distingue :
 - la chromatographie gaz / solide CGS
 - la chromatographie gaz / liquide CGL
 - la chromatographie liquide / solide CLS
 - la chromatographie liquide / liquide CLL

B. Classification selon la nature des phénomènes mis en jeu

Cette classification repose sur la nature de la phase stationnaire et son interaction avec les molécules à séparer. On distingue ainsi :

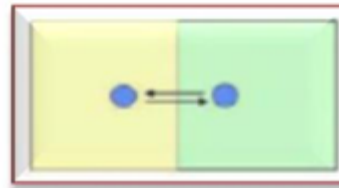
- ❑ La chromatographie d'adsorption : C'est une chromatographie liquide-solide.
 - La phase stationnaire Φ_s : un solide adsorbant qui va exercer une force de rétention (fixation) sur le soluté.
 - La phase mobile Φ_m : un mélange de solvants qui va être responsable de la force d'entraînement (déplacement).



A retenir:

- les Φ_s et Φ_m sont de natures différentes
- le pouvoir éluant de Φ_m dépend de la polarité du solvant.
- des liaisons faibles (Van der Waals, liaison hydrogène et interactions hydrophobes) sont impliquées selon la polarité de la Φ_s et les molécules adsorbées.

- ❑ **La chromatographie de partage** : C'est une chromatographie liquide-liquide. La phase stationnaire est un liquide fixé sur un support inerte (ex. : de l'eau sur la cellulose d'un papier). Cette chromatographie est ainsi dénommée car elle est basée sur le partage du soluté dans les deux phases liquides ; c'est-à-d les solutés migrent selon leur solubilité dans chacune des phases.

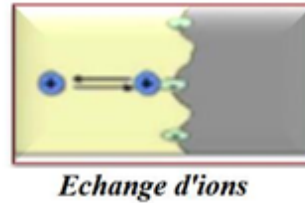


Partage

Un soluté A se répartit (se partage) entre deux solvants non miscibles, l'un aqueux, l'autre organique :



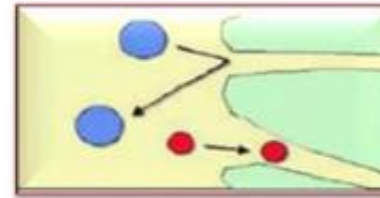
- ❑ La chromatographie d'échange d'ions : La phase stationnaire est un échangeur d'ions constitué par une résine porteuse de groupements ionisés négativement ou positivement, exerçant des interactions de type électrostatique avec les solutés ioniques du milieu.



La phase stationnaire solide est généralement poreuse et renferme dans ses pores une phase liquide qui peut jouer un rôle très important dans les séparations. On peut ainsi parler pour ce type de chromatographie de CLS mais aussi de CLL.

- ❑ La chromatographie d'exclusion (chromatographie de perméation ou de filtration sur gel) : La phase stationnaire est un solide poreux dont la dimension des pores est voisine de celle des molécules à séparer : celles qui sont trop volumineuses pour pénétrer dans les pores sont exclues de la phase stationnaire et sont éluées les premières.

Ici encore on peut parler indifféremment de CLS ou de CLL.



Exclusion

- ❑ La chromatographie d'affinité :

La phase stationnaire est un support macromoléculaire chimiquement inerte, sur lequel est greffé un effecteur qui présente une affinité biologique (bioaffinité) pour un soluté de l'échantillon à analyser (affinité enzyme-substrat, ligand-récepteur, antigène-anticorps).

Cette technique est souvent utilisée en biochimie et biotechnologie pour purifier des protéines, enzymes, anticorps, et autres biomolécules.

C. Classification selon la technique mise en jeu


Selon le support de la chromatographie on distingue:

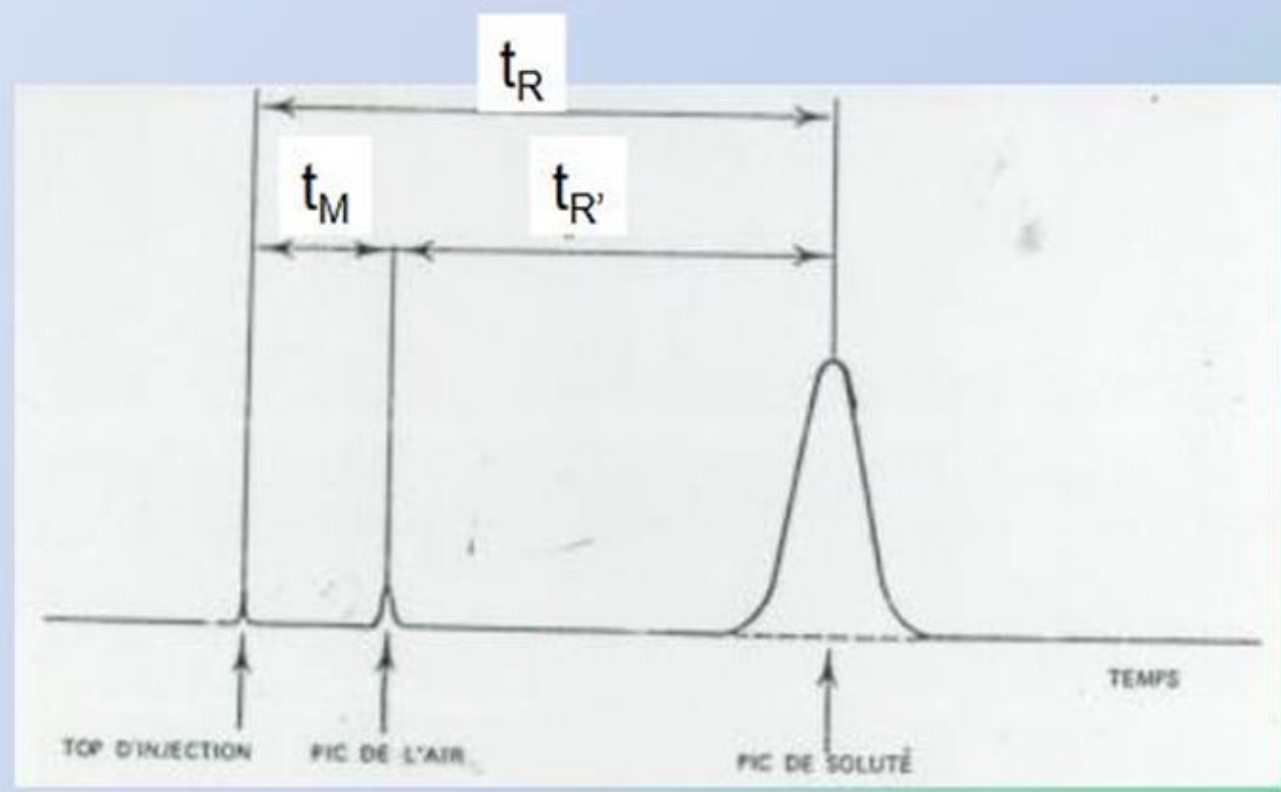
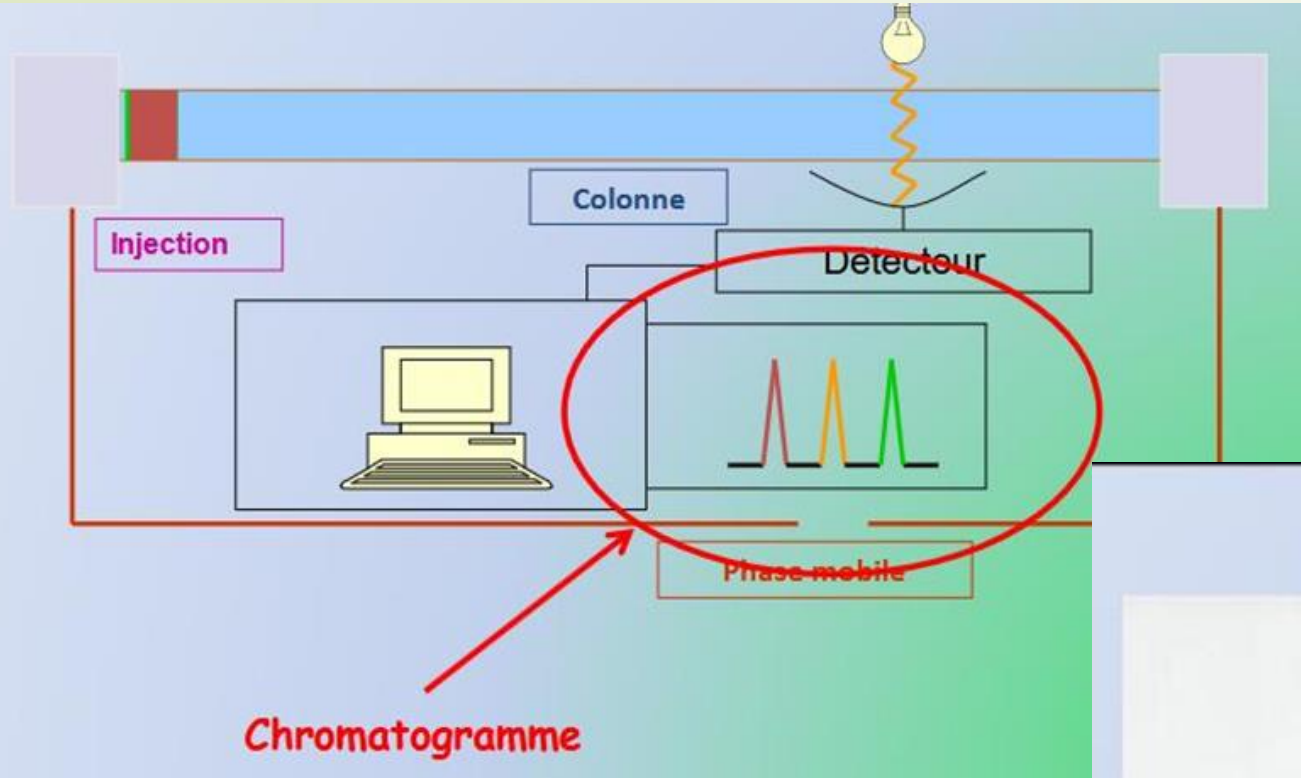
- ❑ La chromatographie sur colonne (CC) : la phase stationnaire est contenue dans une colonne en verre ou en métal
- ❑ La chromatographie planaire : on distingue deux types
 - a. **La chromatographie sur papier (CP)** : une surface plane de cellulose considérée comme support maintient par imbibition une phase stationnaire liquide.
 - b. **La chromatographie sur couche mince (C.C.M)**: la phase stationnaire est étalée sur une surface plane (chromatographie planaire) qui peut être en verre en feuille d'aluminium en une couche mince d'épaisseur uniforme de l'ordre de (0,2 à 2,5 mm) de gel de silice, de cellulose, d'alumine, ou parfois de grains de résines échangeuses d'ions



I.3. Grandeurs chromatographiques

Pour choisir une colonne en chromatographie, il est essentiel de connaître les paramètres influençant la séparation. Ces paramètres sont liés entre eux et permettent d'optimiser les conditions pour une séparation efficace, caractérisée par des pics bien distincts pour chaque composé.





Un chromatogramme doit être reproductible. Il faut donc préciser pour chaque analyse:

- 1- le type de colonne: marque, nature, diamètre, longueur, support,.....
- 2- la nature de l'éluent: solvant, si c'est un mélange préciser sa composition, débit, mode de détection,...
- 3- la quantité injectée, le début de l'injection sur le chromatogramme, la sensibilité du détecteur,....

I.3. 1. Rapport de distribution K du soluté

Les séparations chromatographiques sont basées sur la répartition des solutés dans deux phases: soluté A (phase mobile) \leftrightarrow soluté A (phase stationnaire)

Le coefficient de distribution ou coefficient de partage **K** est égal au rapport des concentrations du soluté **A** dans les deux phases:

$$K(A) = [A](stat) / [A](mob)$$

I.3. 2. Thermodynamique de la chromatographie

Les facteurs qui contrôlent la séparation sont surtout d'ordre thermodynamique: la rétention de l'échantillon sur la colonne est donc contrôlée thermodynamiquement.

$$\Delta G^\circ = -RT \cdot \ln K$$
$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

$$K_A = [A]_{\text{stat}} / [A]_{\text{mob}}$$

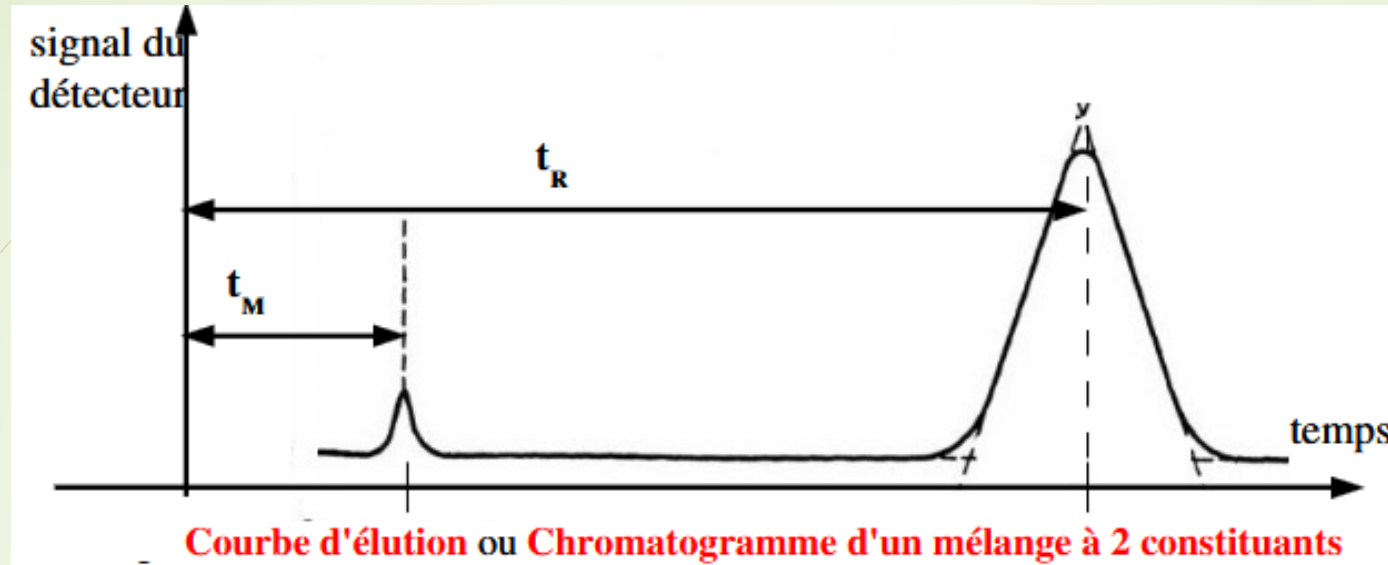
de la valeur de K on déduit ΔG° , ΔH° et $T\Delta S^\circ$

- Les trois fonctions sont < 0 . La réaction est spontanée.
- $\Delta S^\circ < 0$: l'entropie diminue quand le constituant quitte la phase mobile pour se fixer sur la phase stationnaire.

$$\text{Equation de van't Hoff: } d\ln K / dT = \Delta H^\circ / RT^2$$

permet de calculer l'effet de la température sur le temps de rétention.

I.3. 3. Temps de rétention du soluté



Le pic de gauche correspond au soluté qui n'est pas retenu par la phase stationnaire et qui atteint le détecteur à la même vitesse que celle de l'éluant. Son temps de rétention t_M est le temps nécessaire pour qu'une molécule de la phase mobile traverse la colonne.

t_M = temps mort = t_0 = temps nécessaire pour que le pic d'un constituant non retenu par la (PS) apparaisse (retention time of an unretained peak or solvent front).

t_R = temps de rétention d'un constituant retenu par la (PS) (retained peak)
= temps écoulé entre l'injection et le moment où le constituant sort de la colonne

I.3. 4. Volume d'élution ou volume de rétention V_r

Le volume d'élution (de rétention) V_r de chaque soluté représente le volume de phase mobile nécessaire pour le faire migrer d'une extrémité à l'autre de la colonne. Il correspond sur le chromatogramme au volume de la phase mobile qui s'est écoulé entre l'instant de l'injection et celui correspondant au maximum du pic. Si le débit D est constant: $V_r = t_r \cdot D$

D est le débit de la phase mobile (flow rate); c'est un volume par unité de temps: cm^3/s ou mL/s .

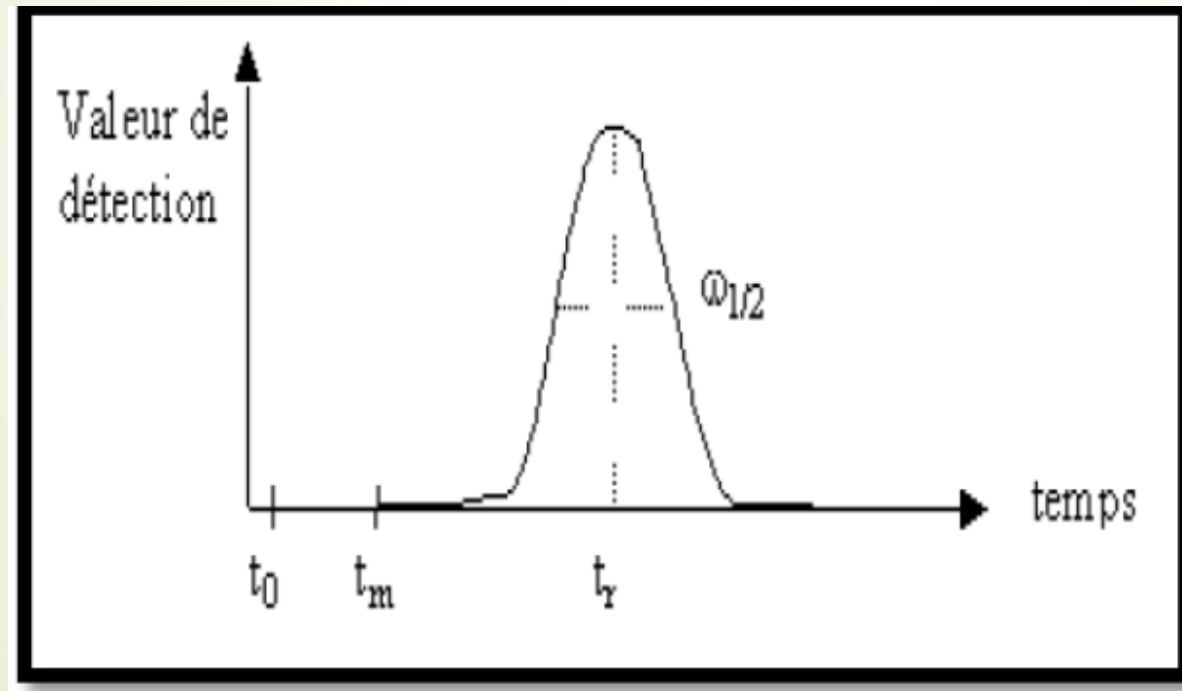
I.3. 5. Volume de rétention réduit V'_r

Il correspond au volume de phase mobile dans lequel le composé est dilué en sortie de colonne. Il vaut par définition : $V'_r = t_r' \cdot D$

I.3. 6. Volume d'un pic, V_{pic}

V_{pic} est le volume de phase mobile dans lequel le composé est dilué en sortie de colonne, d'où $V_{pic} = w \cdot D$

w : correspond à la largeur du pic à la base .



1.3. 7. Volume de la phase mobile dans la colonne (volume mort V_m)

Correspond au volume interstitiel accessible. Il peut être calculé d'après le chromatogramme, à condition d'introduire un soluté non retenu par la phase stationnaire.

On peut l'exprimer en fonction de t_m et du débit D : $V_m = t_m \cdot D$

1.3. 8. Volume de la phase stationnaire

Ce volume désigné par V_s n'apparaît pas sur le chromatogramme.

RQ: Dans les cas simples on le calcule en retranchant (annulant) du volume total interne de la colonne vide et le volume de la phase mobile.

1.3. 9. Facteur de capacité ou facteur de rétention K'

Le facteur de capacité K' est le rapport de la quantité d'un même soluté dans la phase stationnaire et dans la phase mobile.

$$K' = \frac{C_s}{C_m} \times \frac{V_s}{V_m} = K \frac{V_s}{V_m}$$



V_s : volume de la phase stationnaire

V_m : volume de la phase mobile ou volume mort

Dans la mise au point des séparations on fait en sorte que **K'** ne dépasse pas **10**, afin de ne pas trop allonger (renouveler) le temps de passage des composés (élution trop longue). Par contre, lorsque **K'** est beaucoup plus petit que **2**, l'élution est si rapide qu'il est difficile de déterminer le temps de rétention exact. La séparation est optimale pour **$2 < k' < 10$** afin que le temps de passage des constituants ne soit pas trop long; **$k'=5$** =valeur "idéale".



En **CPG**, on peut modifier **K'** 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.

K' est aussi le rapport du temps passé par un soluté dans la phase stationnaire sur le temps passé par ce même soluté dans la phase mobile. **K'** peut être déterminé expérimentalement par l'équation suivante :

$$K' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

I.3. 9. Facteur de capacité ou facteur de rétention K'

Le facteur de rétention exprime mathématiquement la capacité plus ou moins grande de la colonne à retenir chaque constituant.

Le temps de rétention est ainsi lié au facteur de capacité par la relation :

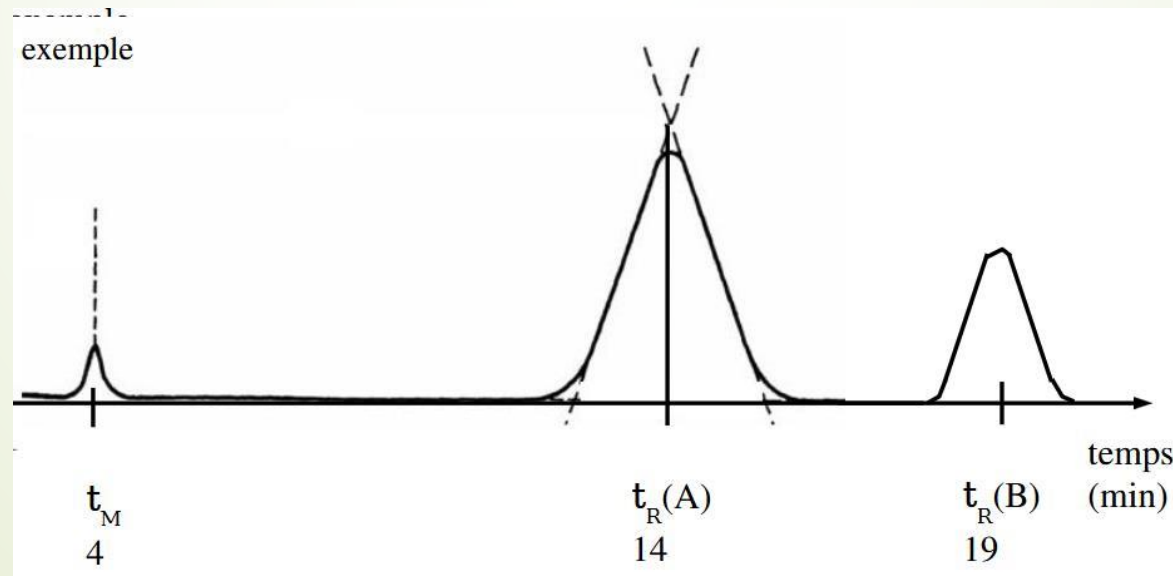
$$tr = (1 + K')$$

I.3. 10. Facteur de sélectivité ou de séparation:

Une colonne doit pouvoir séparer deux composés dont les pics sont adjacents. Pour caractériser la distance séparant les sommets de deux pics consécutifs A et B, on utilise le **facteur de sélectivité** (ou **rétenion relative**) défini par la relation:

$$\alpha = K_B / K_A$$

α = rapport de distribution du constituant **B** le plus retenu sur le rapport de distribution du constituant **A** le moins retenu (1^{er}, pic). α est toujours > 1



$$k'_A = K_A \cdot V_S / V_M \quad k'_B = K_B \cdot V_S / V_M \quad \text{donc: } K_B / K_A = k'_B / k'_A \text{ et}$$

$$\alpha = k'_B / k'_A$$

$$\alpha = [(t_R(B) - t_M) / t_M] \cdot [t_M / (t_R(A) - t_M)]$$

$$\alpha = t'_R(B) / t'_R(A)$$

K'_A et K'_B sont les facteurs de capacité des solutés A et B. la séparation est bonne pour $\alpha > 1.5$

Le facteur de sélectivité exprime la position relative de 2 pics sur le chromatogramme.

pour le soluté A: $K_A = [A]_S / [A]_M$ et $\Delta G_A^\circ = -RT \cdot \ln K_A$

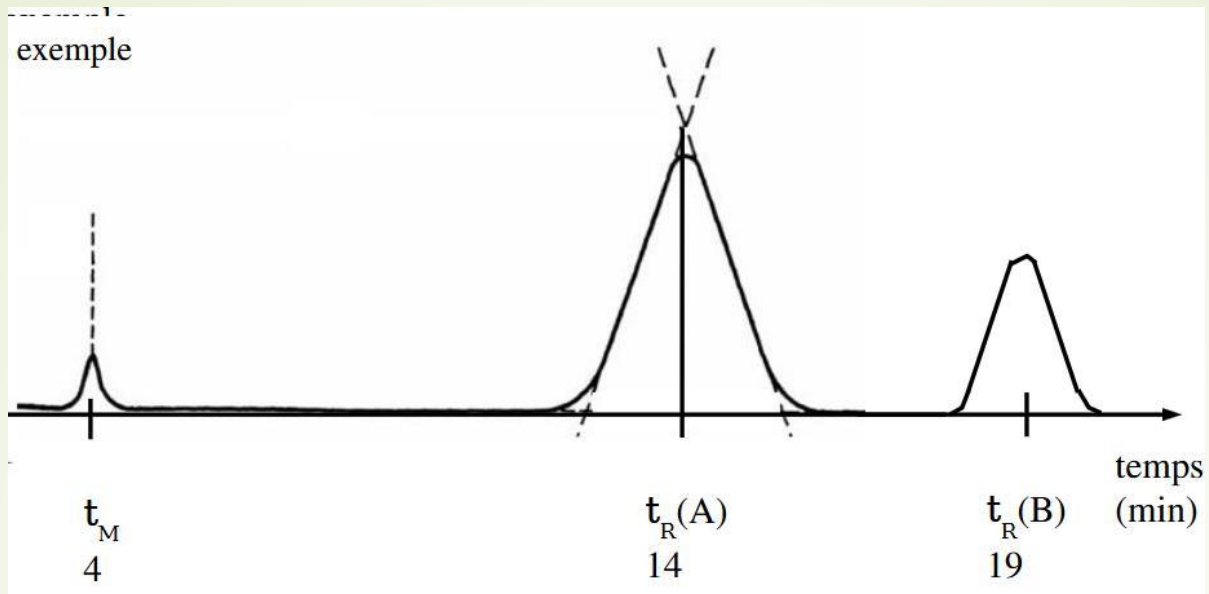
enthalpie libre de dissolution du soluté A dans la phase stationnaire

pour le soluté B: $K_B = [B]_S / [B]_M$ et $\Delta G_B^\circ = -RT \cdot \ln K_B$

$$\Delta G_B^\circ - \Delta G_A^\circ = -RT \cdot (\ln K_B - \ln K_A) = -RT \cdot (\ln K_B / K_A) = -RT \cdot \ln \alpha$$

$$\Delta G_B^\circ - \Delta G_A^\circ = -RT \cdot \ln \alpha$$

$$\alpha = K_B / K_A \quad \alpha = \exp (\Delta G_A^\circ - \Delta G_B^\circ) / RT$$



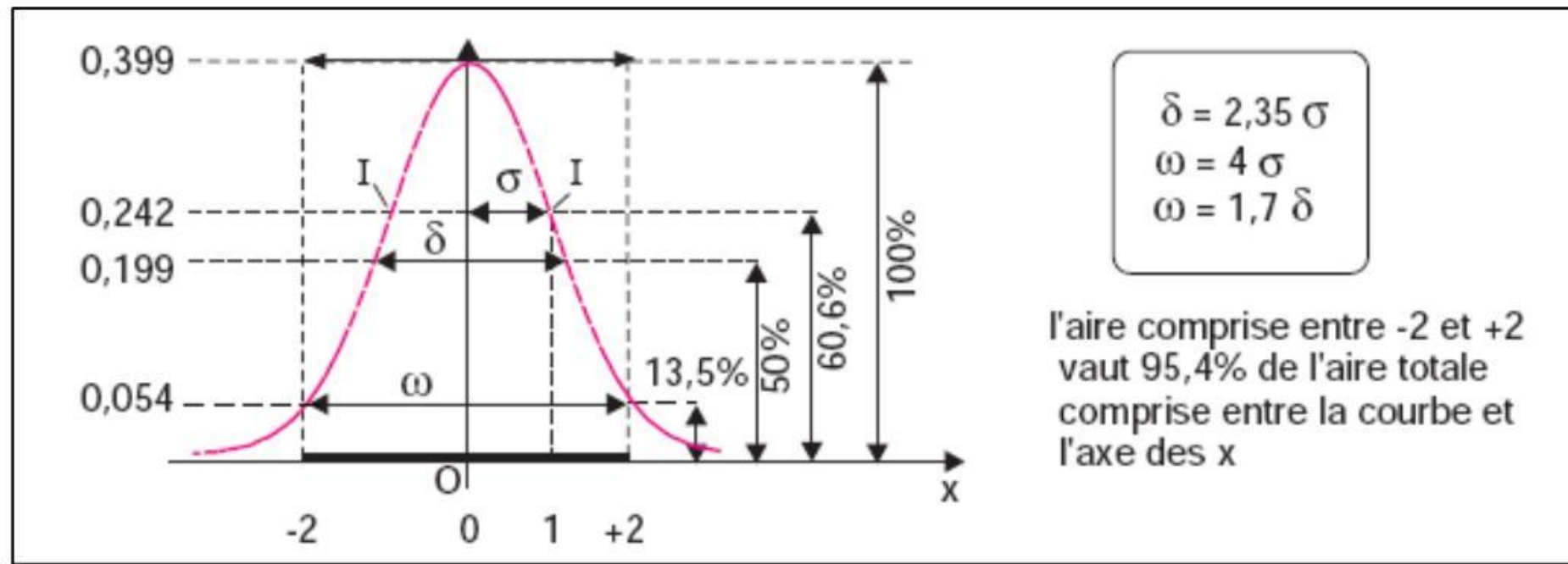
facteur de rétention: $k'_A = (t_R - t_M) / t_M = t'_R / t_M = 10/4 = 2,5$

$$k'_B = 15/4 = 3,75$$

facteur de sélectivité ou de séparation: $\alpha = t'_R(B) / t'_R(A) = 3,75 / 2,5 = 1,5$

I.3. 11. Courbe de gauss

Les pics chromatographiques ont une allure gaussienne
L'aire des pics est calculée en assimilant le pic à un triangle.

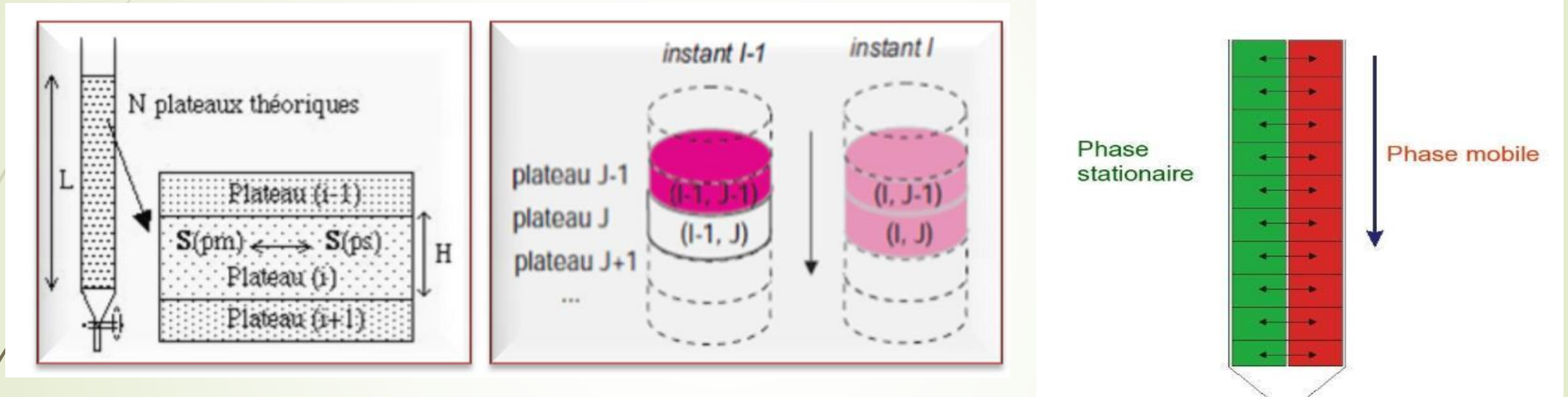


I.3. 12. Efficacité d'une colonne : Notion de plateaux théoriques (Hauteur équivalente d'un plateau théorique)

La largeur d'un pic est caractéristique de l'efficacité de la séparation : plus le pic est fin plus la chromatographie est efficace. L'efficacité est mesurée par le nombre de plateaux théorique N_{th} .

Une colonne de N plateaux théoriques est une colonne divisée en N petits disques cylindriques successifs. On admet que la phase mobile progresse (améliore) non pas de façon continue, mais 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 $[S]_m$ et la phase stationnaire $[S]_s$.

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



Dans cette théorie, les pics de chromatographie ont une forme gaussienne et la variance σ^2 est reliée au nombre de plateaux théoriques **N** et au temps de rétention **tr** par la relation: **$N\sigma^2=tr^2$**

Sur le chromatogramme (précédent), s représente la demi-largeur du pic à **60,6 %** de sa hauteur et t_r le temps de rétention du composé. t_r et s doivent être mesurés dans la même unité (temps, distances ou volumes écoulés, si le débit est constant). Si on exprime s en unités de volume (en faisant intervenir le débit), **4σ** correspond au « volume du pic » soit **95 %** du composé injecté.

Par suite des propriétés de la courbe de Gauss (**$w = 4\sigma$**), il en résulte: **$N = 16 t_r^2 / w^2$**

Les pics étant assez souvent déformés à la base, cette dernière est rarement employée : on utilise de préférence la formule équivalente: **$N = 5,54 t_r^2 / \sigma^2$** est très utilisé en HPLC.

Pourtant il serait plus judicieux d'utiliser **N_{eff}** (nombre de plateaux effectifs) puisqu'il dépend vraiment du temps passé dans la phase stationnaire.

$$N_{eff} = 16 \frac{t_r'^2}{\omega^2} = 5,54 \frac{t_r'^2}{\delta^2}$$



Pour comparer des colonnes de différentes longueurs, on définit la hauteur équivalente à un plateau Théorique (**HEPT** ou H).

$$**HEPT** = L/N$$

Plus les plateaux théoriques sont étroits (**H** petit), plus la colonne est efficace.



I.3. 13. Le modèle cinétique 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 une équation qui relie **H** (HEPT) aux caractéristiques physiques de la colonne et de la phase mobile (théorie des taux):

$$H = A + B/u + C.u$$

C'est une description mathématique pour comprendre la forme des pics. Les 3 termes **A**, **B** et **C** contribuent à l'élargissement des pics.

- **$u = L / t_m$** = vitesse moyenne de déplacement ou d'écoulement des molécules de la **P.M.** (mm.s^{-1})
- **A** : lié à l'anisotropie d'écoulement; dépend de la taille et de la répartition des particules de la **PS**.

La largeur de la bande dépend des chemins que peuvent suivre les molécules durant l'élution. Les molécules de soluté arrivent en sortie de colonne à des instants différents. C'est le phénomène de diffusion turbulente (**A**).

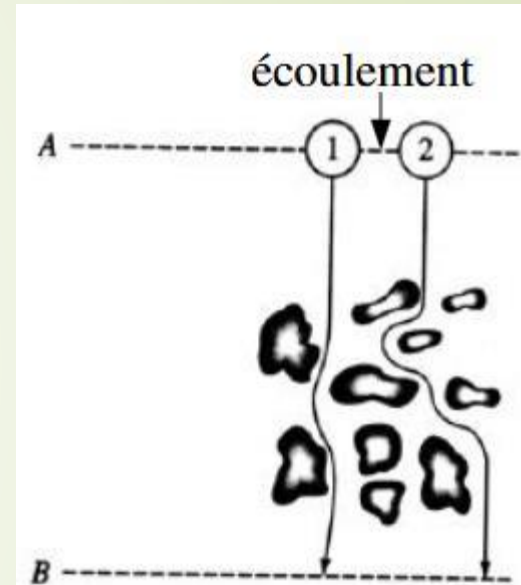
Le chemin parcouru par la molécule **2** est supérieur à celui de la molécule **1**. **1** arrive en **B** avant **2**. Le trajet dépend du diamètre des particules qui remplissent la colonne.

A = facteur de diffusion d'Eddy = $2 \lambda \cdot dp$ (μm) ou terme de diffusion turbulente

λ = cte concernant la régularité du remplissage (voisin de **1**)

dp = diamètre des particules. **A** grand si **dp** grand.

Plus les particules sont petites, plus le remplissage est homogène, plus **A** petit et plus l'efficacité de la colonne augmente. La contribution de **A** est nulle pour une colonne capillaire de chromatographie en phase gaz.



- **B/u** : terme de diffusion moléculaire longitudinale **$B/u = 2 \cdot \delta D_M$**

inversement proportionnel à la vitesse d'écoulement de la phase mobile. **B/u** petit si **u** grand.

L'efficacité d'une colonne augmente avec la vitesse de la **P.M.**

B = terme lié à la diffusion moléculaire longitudinale (en **$cm^2 \cdot s^{-1}$**).

g = cte sans dimension liée à l'espace entre les particules de remplissage. **$g = 0,6$** pour les colonnes remplies et **$1,0$** pour les colonnes capillaires.

D_M = coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile (en **$cm^2 \cdot s^{-1}$**). Il est 5 fois (+) grand en CPG qu'en CPL. La contribution de la diffusion longitudinale est considérée comme négligeable.

- $C \cdot u = (C_s + C_m) \cdot u$

= terme de **résistance au transfert de masse** du soluté entre les deux phases.

Le transfert de molécules entre la PM et la PS n'est pas instantané. Par ex. les molécules éloignées de la PS peuvent être entraînées avant d'être transférées sur la PS.

Le terme C devient important quand la vitesse d'écoulement (cm.s^{-1}) de la phase mobile ou son débit ($\text{cm}^3.\text{s}^{-1}$) est trop rapide. Cette résistance empêche la formation de l'équilibre: soluté dans PM-soluté dans PS.

Plus **u petit**, plus les molécules pénètrent dans la PS et **plus la colonne est efficace**.

- C_s , terme de transfert de masse dans la phase stationnaire; est proportionnel à d_f^2 / D_s

d_f = épaisseur moyenne de la couche de PS déposée sur les particules du support solide.

D_s = coefficient de diffusion du soluté dans la phase stationnaire

- C_m , terme de transfert de masse dans la phase mobile; est proportionnel à d_p^2 / D_m

d_p = diamètre des particules de remplissage.

D_m = coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile.

Les **colonnes efficaces** sont **régulièrement remplies, avec un d_p le plus faible possible**.

Il est aussi préférable d'**utiliser un solvant de faible viscosité pour minimiser C**.

L'**élargissement longitudinal** du pic provient du déplacement des molécules dans des directions parallèles à l'écoulement

L'**élargissement dû au transfert de masse** provient de la diffusion dans une direction perpendiculaire à l'écoulement.

La **courbe de van Deemter** est une hyperbole.
 Il existe un **minimum** de **$H=L/N$** . Il correspond à une **efficacité maximale de la colonne**, pour une **vitesse u optimale** (ou un **débit optimal**) et pour un nbre de plateaux théoriques N maximal.

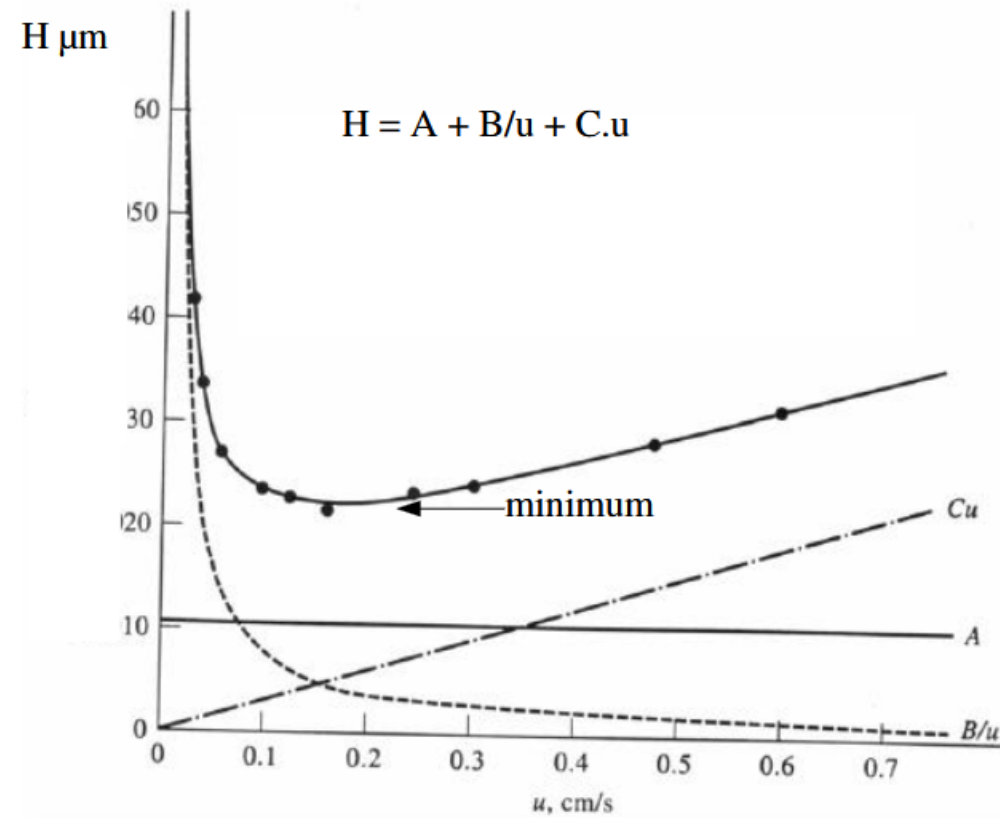


Fig. **Courbe de van Deemter** d'une colonne de chromatographie. Les points sont les données expérimentales. Les courbes inférieures représentent les termes A , B/u et $C.u$.

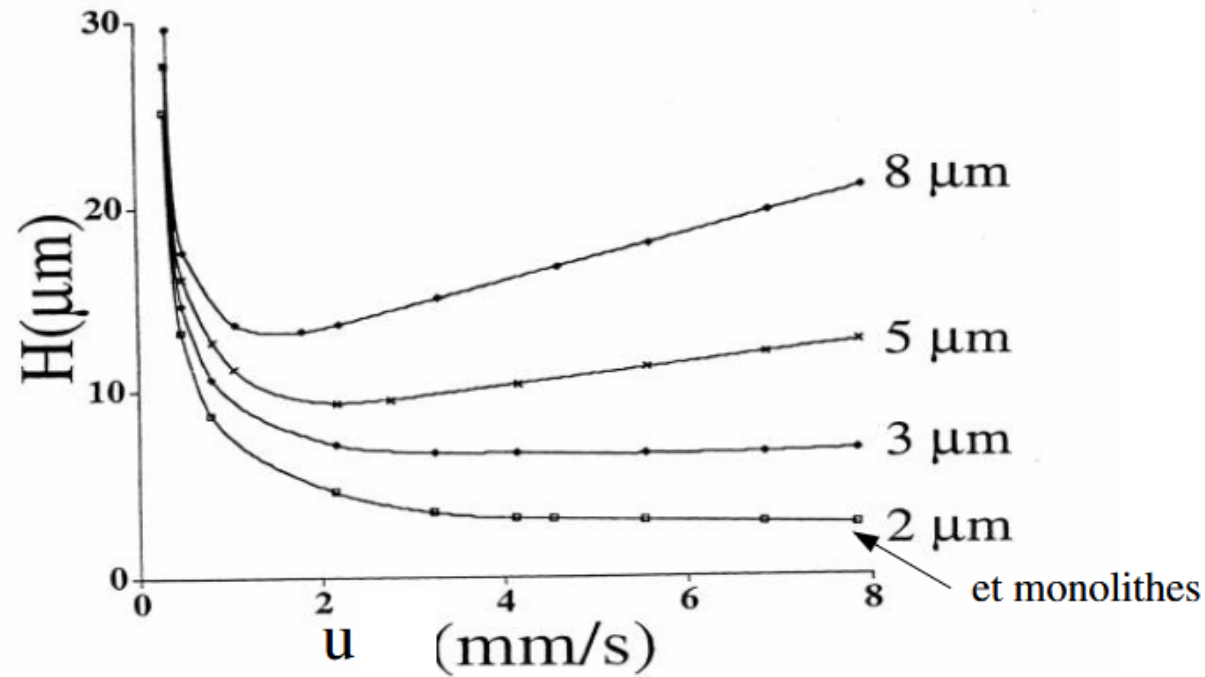


Fig. Hauteur équivalente à un plateau théorique en fonction de la vitesse de la phase mobile pour des colonnes avec différents diamètres de particules

Pour des particules de diamètre inférieur à 5 μm , H garde sa valeur minimale quand $u \uparrow$.

Des colonnes à particules de petit diamètre ou remplies d'un monolithe, peuvent être utilisées avec des grandes vitesses de phase mobile sans perte d'efficacité.

I.3. 14. Résolution des pics:

La résolution est la grandeur qui caractérise l'aptitude d'un système chromatographique (colonne, solutés, solvants) à séparer 2 solutés. Le but de la chromatographie est d'obtenir la meilleure résolution dans le temps le plus court.

Le paramètre de résolution R quantifie la qualité de cette séparation.

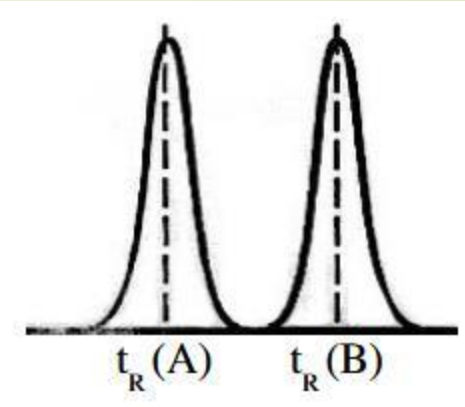
Bien qu'on la mesure, en général, sur deux pics contigus, elle peut être calculée sur n'importe quel couple de pics

$R < 1$: mauvaise résolution

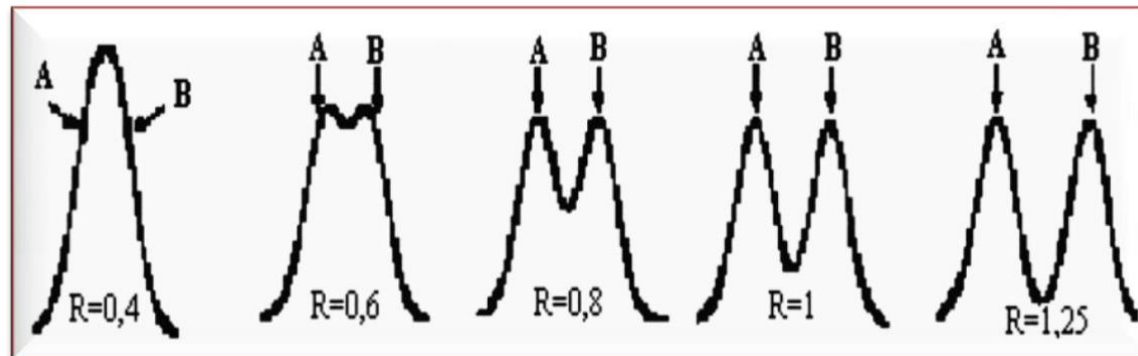
$1 < R < 1,4$: résolution acceptable

$1,4 < R < 1,6$: résolution optimale

$R > 1,6$: résolution trop bonne car le temps d'analyse est rallongé



$$R = 2 \frac{tr_2 - tr_1}{\omega_1 + \omega_2}$$



I.4. Optimisation d'une analyse chromatographique

La résolution et le temps d'élution sont les deux variables dépendantes les plus importantes à considérer.

Dans toute optimisation, le but est de réussir une séparation suffisante du ou des composés intéressants en un minimum de temps. Les paramètres qui conditionnent **R** et **tr** sont le nombre de plateaux théoriques **N**, le facteur de capacité **a** et le facteur de sélectivité **k'**

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{1 + k'_2} \right)$$

I.4.1. Modification de la hauteur équivalente à un plateau théorique

La résolution d'une colonne est par définition proportionnelle à la racine carrée du nombre de plateaux théoriques qu'elle contient. L'augmentation du nombre de plateaux entraîne un allongement de la durée de la séparation, sauf si cette augmentation est obtenue en réduisant H. Les méthodes permettant de minimiser H sont la diminution de:

- ✓ diamètre des particules du support
- ✓ la température (CPG)
- ✓ l'épaisseur du film liquide (HPLC)

1.4.2. Modification du facteur de capacité

La séparation peut souvent être améliorée de manière significative en modifiant le facteur de capacité k'_2 . L'augmentation de k'_2 améliore le facteur de résolution au détriment de la durée de l'élution. Les valeurs optimales de k' sont généralement comprises entre 2 et 5.

Le moyen le plus usuel pour améliorer la résolution est d'optimiser k' :

- ✓ pour les phases mobiles gazeuses, k' peut être contrôlé en modifiant la température.
- ✓ pour les phases liquides des changements de composition du solvant permettent souvent d'agir sur k' de manière à obtenir de meilleures séparations.

1.4.3. Modification du facteur de sélectivité

L'optimisation de k' et de N ne suffisent pas pour donner une bonne séparation de deux solutés en un temps raisonnable si α est proche de 1. Dans ce cas on doit chercher à augmenter α tout en maintenant k' entre 1 et 10. Plusieurs options sont possibles, on peut :

- ✓ modifier la phase mobile
- ✓ modifier la température de la colonne
- ✓ modifier la composition de la phase stationnaire
- ✓ utiliser des effets chimiques spéciaux.

Une augmentation de température entraîne également une augmentation de k' mais elle a peu d'effet sur la valeur de α en chromatographie liquide-liquide ou liquide-solide. Par contre la température a une influence sur l'échange d'ions et sera un paramètre à optimiser.

I.5. Analyse qualitative et quantitative

1.5.1. Analyse qualitative

Elle sert essentiellement à l'identification des composants d'un mélange. Elle consiste à identifier les solutés par leur temps de rétention qui pour des conditions données (solvant, débit, colonne etc) est caractéristique du composé. Il peut bien sur arriver que deux composés différents mais très proches aient le même temps de rétention. On doit donc s'assurer préalablement qu'un pic donné correspond bien à un seul soluté. C'est l'objet de toute la phase de mise au point des conditions opératoires utilisées. On admet ici pour la suite que chaque pic correspond à un seul composé

1.5.2. Analyse quantitative

Une fois identifiés le ou les solutés intéressants, celui-ci permet l'analyse quantitative grâce à la relation:

$$m_i = K_i A_i$$

m_i : la masse du soluté i injecté

A_i : l'aire du pic représentant ce soluté.

K_i : le coefficient de proportionnalité.

a) Mesure de l'aire de pic A_i

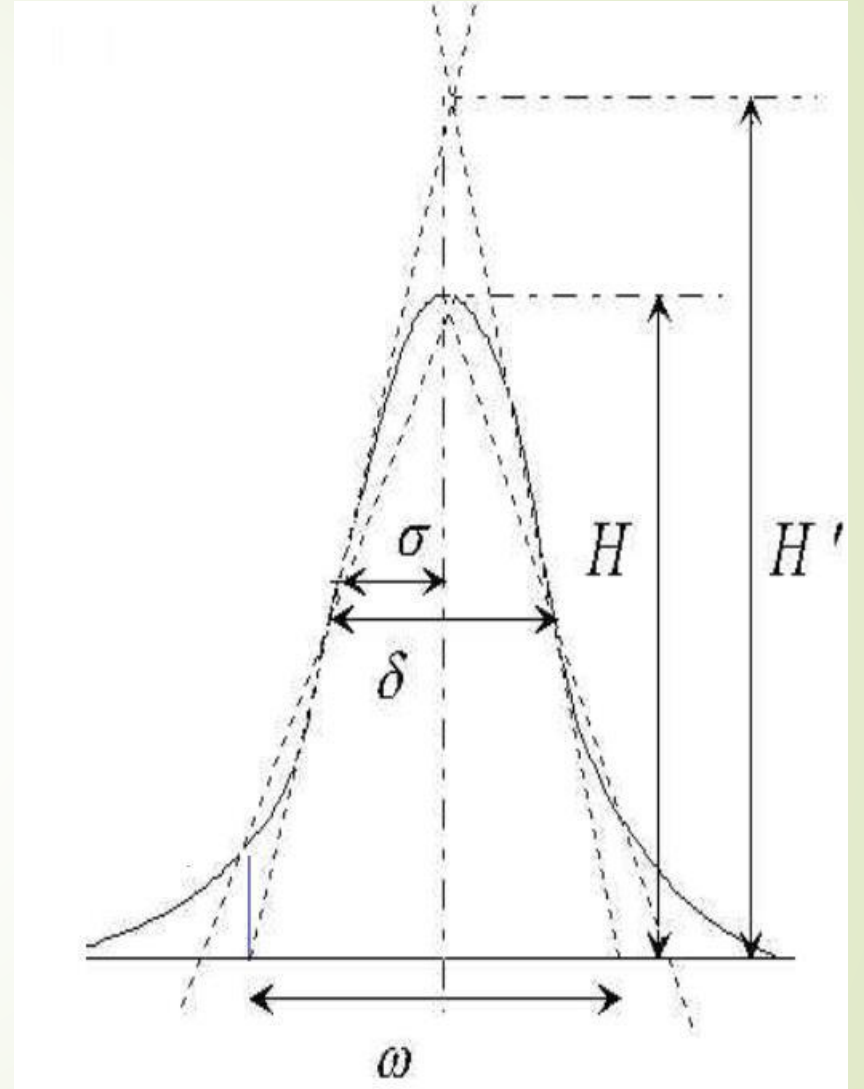
On utilise essentiellement la triangulation manuelle et l'intégration automatique.

la triangulation : on assimile le pic à un triangle soit en traçant les tangentes aux points d'inflexion de la courbe et en calculant l'aire:

$$A_i = \frac{1}{2} H' \times \omega,$$

soit en mesurant la largeur à mi-hauteur et en calculant l'aire par:

$$A_i = H \times \delta$$



b) Détermination du coefficient de proportionnalité

Il est impossible avec les chromatographes courants de calculer le coefficient de proportionnalité par mesure directe de l'aire du pic enregistré quand on introduit une masse exacte, connue, d'un soluté d'un injecteur. Les seringues d'injection ne permettent pas de repérer le volume d'échantillon avec une précision suffisante. On aura donc recours à des méthodes d'étalonnage, qui, comme en analyse qualitative, feront de la chromatographie quantitative un procédé relatif vis-à-vis de substances connues. Voici les principales méthodes utilisées.

- Normalisation interne : en considérant que tous les K_i sont égaux (séries homologues telles que alcanes, alcools, etc..). On obtient alors les pourcentages en masse de chaque soluté de la manière suivante:

$$m_i \% = \frac{A_i}{\sum_i A_i} \times 100$$

- **Etalonnage interne** : dans cette méthode, on compare individuellement chacun des pics à évaluer au pic d'une substance étalon E, convenablement choisie, introduite en proportion connue dans le mélange à analyser. il convient évidemment que le pic étalon ne soit confondu avec aucun des pics du chromatogramme.

$$m_e = K_e \times A_e$$

soit

$$\frac{m_i}{m_e} = \frac{K_i}{K_e} \times \frac{A_i}{A_e}$$

On définit alors: $K_{i/e} = \frac{K_i}{K_e}$

On calculera donc la réponse de chaque soluté concerné par rapport à l'étalon. La méthode est générale Elle est précise et reproductible.

- **Etalonnage externe :** Cette technique n'est valable qu'avec une excellente qualité d'injection. On injecte une masse m_e de composé étalon en solution (V_e injecté).

$$m_e = K \times A_e \quad \text{soit} \quad K = \frac{m_e}{A_e}$$

On injecte un même volume de solution contenant le composé (m_i) et on mesure m_i .

$$m_i = K \times A_i \quad \text{soit} \quad m_i = \frac{m_e}{A_e} \times A_i$$