

# Chromatographie Sur couche mince (CCM)

# INTRODUCTION

---

La chromatographie sur couche mince :

- technique mise au point par Ismailov et Schreiber (1938),
- permet de séparer et d'identifier les constituants d'un mélange,
- facile à mettre en œuvre, sensible et pas chère,
- technique automatisée grâce au développement de l'électronique et de l'informatique.

## **Principe**

- technique de séparation basée sur des phénomènes d'adsorption,
- les constituants du mélange sont entraînés par la phase mobile se déplaçant par capillarité le long du support (phase stationnaire).

# INTRODUCTION

---

## **Avantages**

- Temps de développement courts (2 à 60 min);
- Distances de séparation petites ;
- Très bonne résolution ;
- Très haute sensibilité ;
- Très petites quantités d'échantillon utilisées.

## Description

### La phase stationnaire:

- Dépôt d'une couche mince (100 -200  $\mu\text{m}$ ) de PS sur une plaque en verre (plastique ou aluminium);
- les phases stationnaires utilisées: alumine, gel de silice, acétylène, polyamide.

Polydimethyl siloxane*	Polarité croissante ↓
Methyl/Phenylsiloxane*	
Cyanopropylsiloxane*	
Carbowax (polyéthylenglycol)*	
Phase inverse (gel de silice modifié. C-18 ; C-8)	
Paper	
Cellulose	
Amidon	
Sulfate de calcium	
Silice (gel de silice)	
Florisil (silicate de magnésium)	
Oxyde de Magnésium	
Alumine (oxyde d'aluminium; acide, basique ou neutre)	
<i>*ph stat CG</i>	

**Tableau 1:** phases stationnaires usuelles énumérées par polarité croissante.

## Description

### La phase mobile (éluant) :

Le choix des solvants d'éluion est guidé par les caractéristiques des substances à séparer. On considère que les substances sont hydrophiles (soluble dans l'eau) ou hydrophobes (insoluble dans l'eau), puis on contrôle leurs propriétés acides, basiques, ou neutres et enfin la possibilité de réactions chimiques avec le solvant d'éluion aussi bien qu'avec l'adsorbant.

Hexane et éther de pétrole	
Tétrachlorure de carbone	
Benzène	
Dichlorométhane	
Chloroforme	
Éther éthylique	
Acétate d'éthyl	
Acétone	
Propanol	
Éthanol	
Méthanol	
Eau	
Acide acétique	

↓  
Ordre croissant de polarité

**Tableau 2:** série éluotropique des solvants

## Description

### Elution de certains groupes fonctionnels :

En général, le composé le moins polaire est élué rapidement (ou restera moins de temps sur la phase stationnaire) et le plus polaire est élué plus lentement (ou passe plus de temps sur la PS).

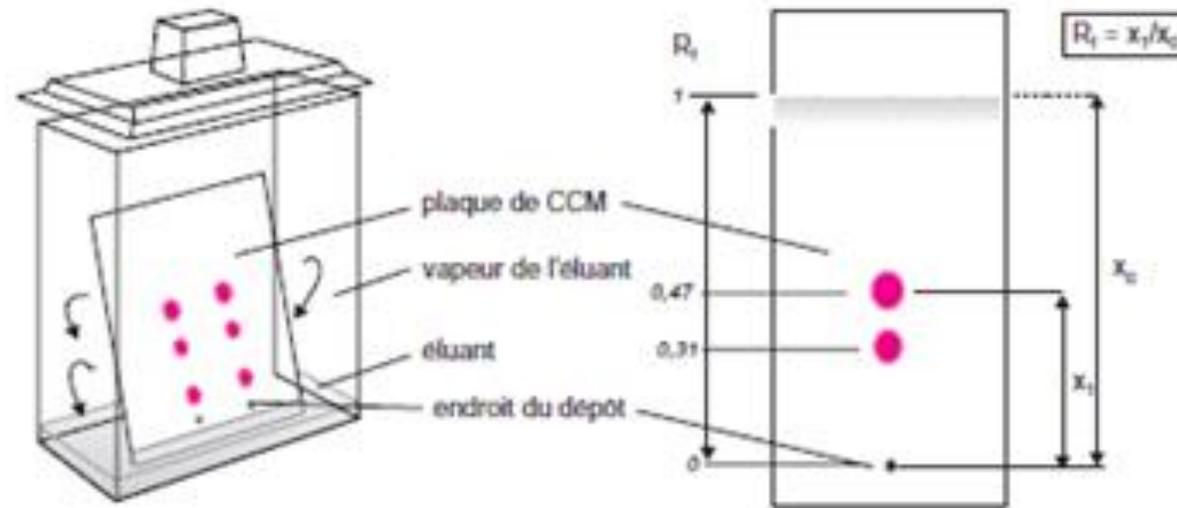
Alcanes	<b>Polarité croissante des groupes fonctionnels</b> 
Halogénures d'alkyles	
Alcènes	
Diènes	
Hydrocarbures aromatiques	
Halogénures d'hydrocarbures aromatiques	
Ethers	
Esters	
Cétones	
Aldéhydes	
Amines	
Phénols	
Acides carboxyliques	
Acides sulfoniques	

**Tableau 3:** ordre d'élution de certains groupes fonctionnels sur la silice ou l'alumine

# Préparation de la CCM

## 1. Dépôt de l'échantillon:

- découpe d'une plaque de dimensions (environ 3x10 cm),
- tracer au crayon de graphite une ligne de base à 1 cm du bas de la plaque,
- dépôt d'un goutte de l'échantillon (qq nL – qq mL) dissous dans un solvant convenable.
  - *capillarité*: à l'aide d'un capillaire (spot de 1 – mm) de diamètre.
  - *vaporisation*: sous l'effet d'un courant d'azote, dépôt d'une petite bande horizontale.



**Figure 1:** dépôt d'un échantillon et développement d'une CCM

### 2. Développement de la plaque:

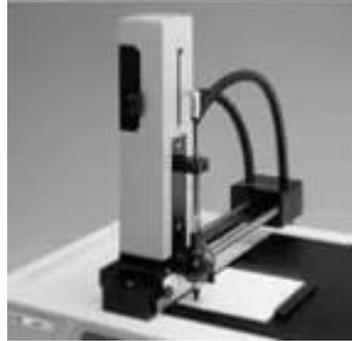
- l'éluant se déplace par capillarité du bas vers le haut de la plaque en entraînant les composés dissous dans l'échantillon,
- traçage du front de solvant à 1 cm du bord supérieur de la plaque,
- séchage de la plaque.

### 3. Révélation post-chromatographique:

- **constituants colorés:** la révélation est immédiate (détection visuelle).
- **constituants non colorés:**
  - ***révélation chimique:*** on utilise un révélateur chimique approprié  
acide phosphomolibdique, vanilline, solution de  $\text{KMnO}_4$ , vapeur d'iode bissublimé.  
ninhydrine/alcool (acides aminés), bactéries luminescentes.
  - ***révélation instrumentale:*** on utilise un densitomètre en éclairant la CCM avec une lampe UV(254 nm ou 366 nm).

## Préparation de la CCM

---



**Appareil de dépôt automatique en CCM**



**lampe UV - CCM**



**Densitomètre UV-vis-fluo CCM**

## CCM bi-dimensionnelle

---

Cette technique utilisée quand le mélange à séparer contient un grand nombre de composés que l'on veut séparer. Dans ce cas, une tache peut révéler un maximum d'information.

- dans un angle de la plaque, on réalise la tache.
- on laisse élué dans un premier éluant.
- on tourne la plaque de  $90^\circ$  et on l'élué dans un deuxième éluant.

On obtient alors une cartographie de l'échantillon analysé.

# CCM bi-dimensionnelle

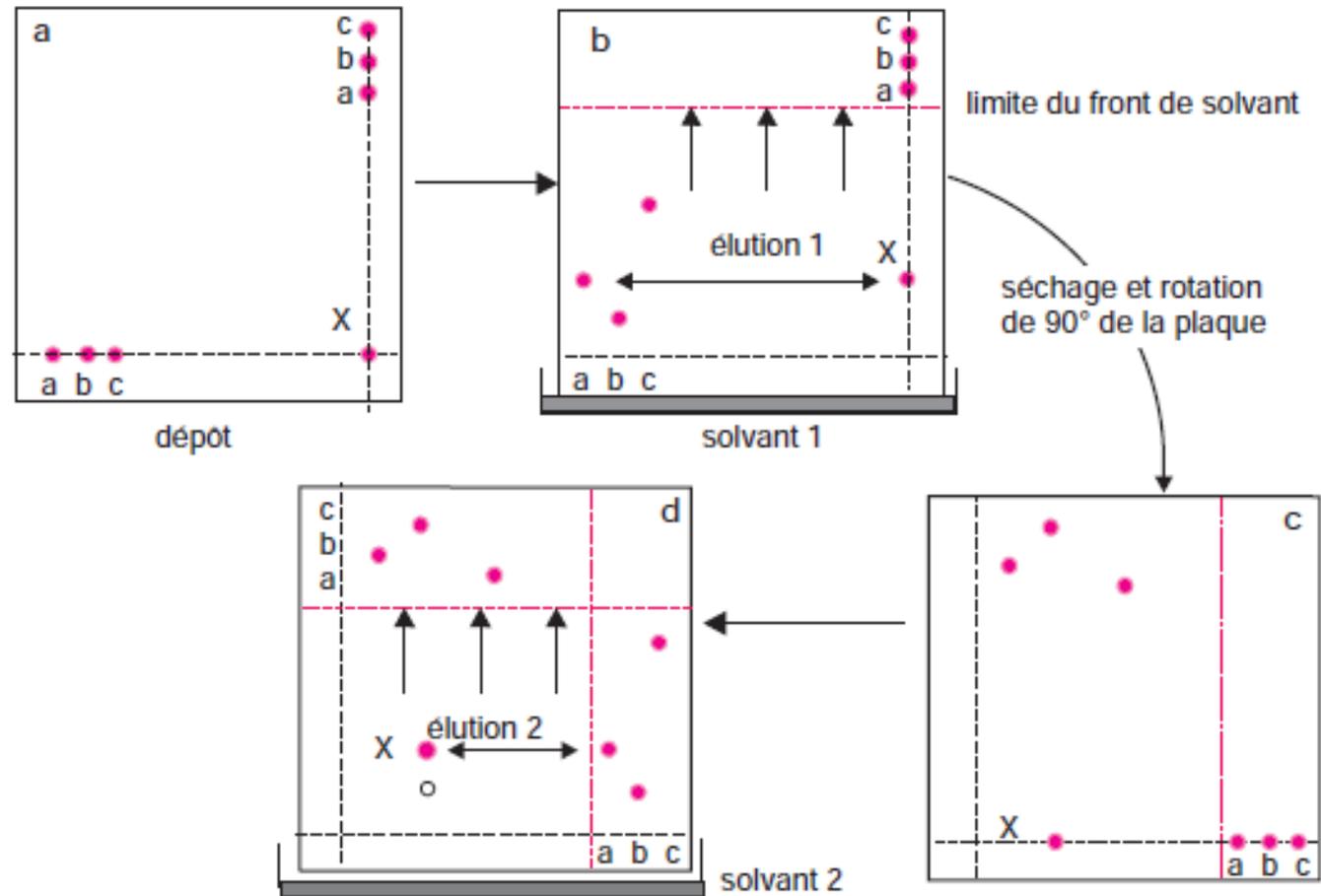


Schéma d'une CCM bi-dimensionnelle

## CARACTÉRISATION DE LA CCM

- Le rapport frontal **Rf** : correspond à sa migration relative par rapport à celle du solvant.

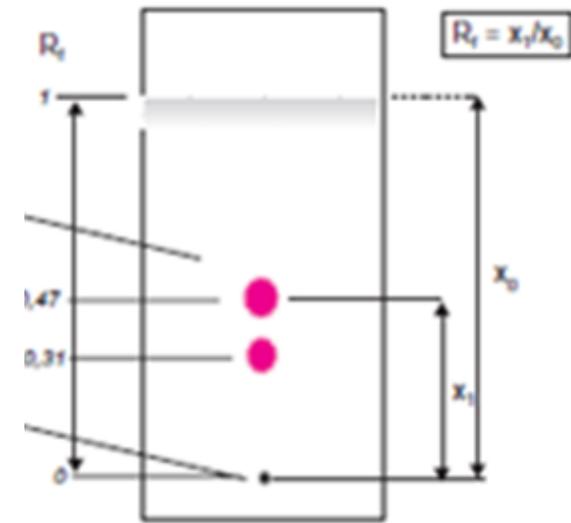
**Rf**= distance parcourue par le soluté/distance parcourue par le solvant

$$\mathbf{Rf} = X_1/X_0$$

- L'efficacité **N** de la plaque pour un composé dont la distance de migration est x et le diamètre du spot  $\omega$  est:  $N = 16(x/\omega)^2$

- La hauteur équivalente à un plateau théorique:  $H = \frac{x}{N}$

- la résolution:  $R_s = \frac{2[x_2 - x_1]}{\omega_1 + \omega_2}$



Caractérisation d'une CCM

## Phases stationnaires

---

### **Chromatographie à polarité de phase normale:**

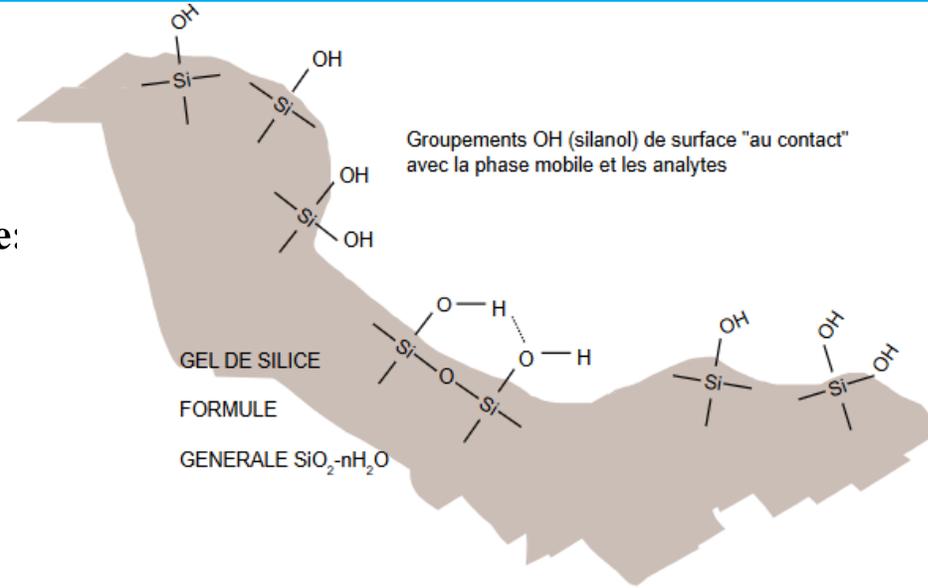
- la phase stationnaire est polaire et hydrophile: groupements (amine, nitrile, di-alcool) greffés sur la silice
- la phase mobile est un solvant apolaire et de nature lipophile: hexane, ether isopropylique ( le soluté le moins polaire est élué en premier).

### **Chromatographie à polarité de phase inversée:**

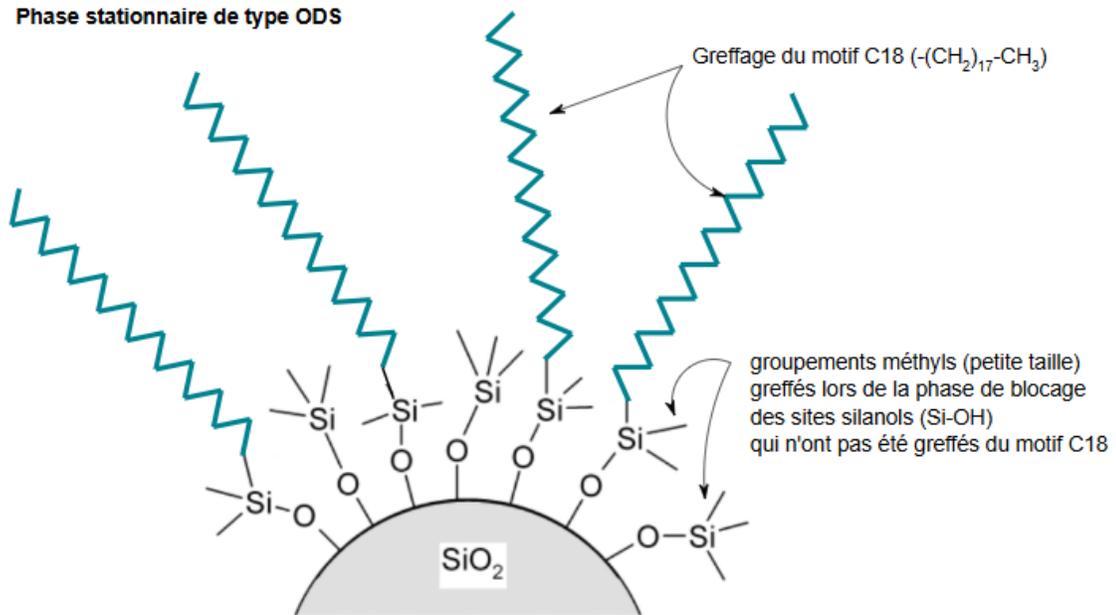
- la phase stationnaire est apolaire et hydrophobe: constituée d'hydrocarbure avec des chaines alkyles de C<sub>4</sub> – C<sub>30</sub>, des groupements propyle, phényle ou di-phényle.
- la phase mobile est un solvant polaire H<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>OH, CH<sub>3</sub>CN.

# Phases stationnaires

## Phase normale:



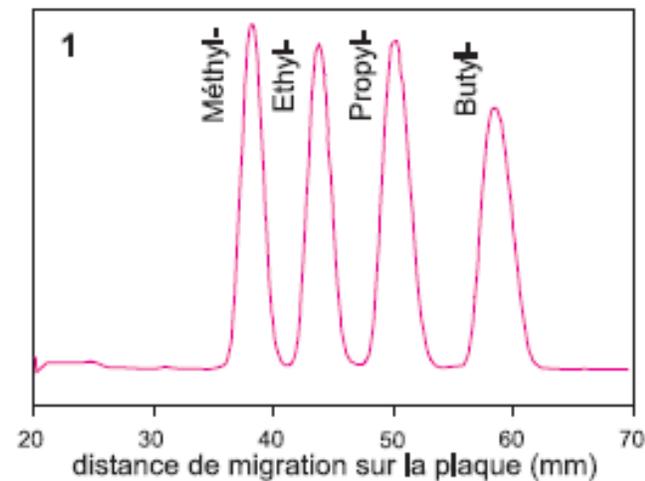
## Phase inversée:



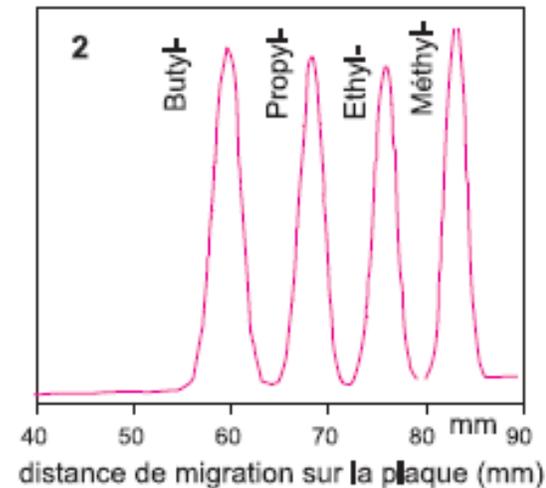
## Phases stationnaires

Étude de la séparation de parabènes sur des phases différentes:

1. *phase polaire* avec un éluant peu polaire; l'ordre de migration (du plus petit déplacement vers le plus grand) correspond à l'ordre de polarité décroissante.
2. en *phase inverse peu polaire*, l'ordre de migration correspond à l'ordre de polarité croissante.



phase normale, (gel de silice 5µm)  
éluant Acétonitrile/Eau, 50:50



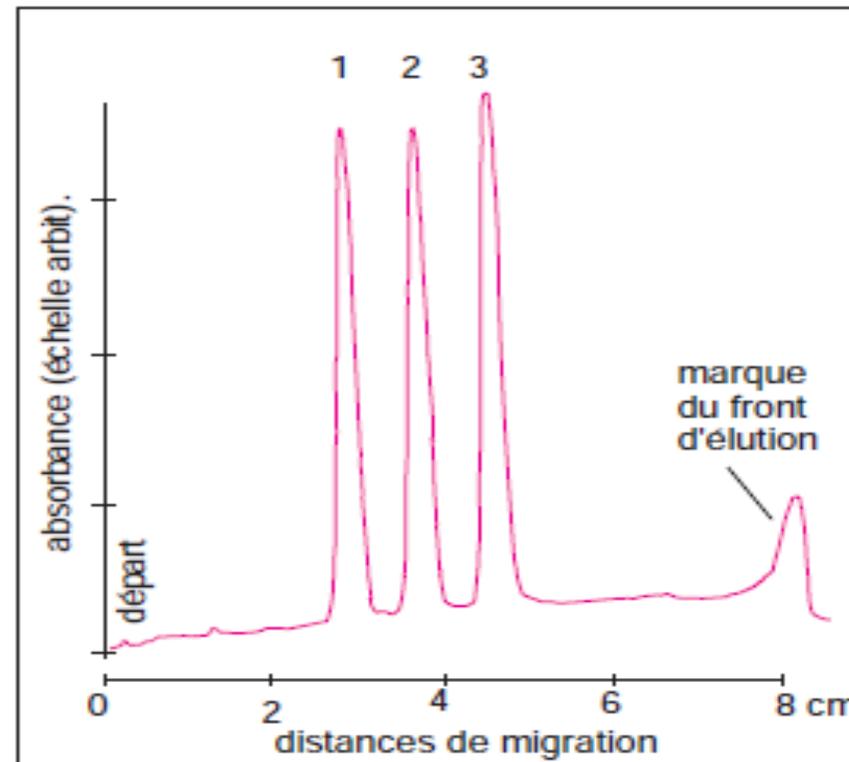
phase inverse (gel de silice RP-18, 5µm)  
éluant pentane/Acide acétique 80:20

Élution sur CCM en phase normale et en phase inversée

## CCM quantitative

Pour rendre la CCM quantitative, il faut quantifier les taches:

- Examiner la plaque CCM sous l'optique d'un **densitomètre (ou scanner)**,
- Mesurer l'absorption (fluorescence) à une ou plusieurs longueurs d'ondes,
- Tracer un **pseudo chromatogramme** comportant des pics dont on mesure les aires.



Séparation de 3 solutés sur une plaque CCM

# Chromatographie Liquide Sur colonne (CLC)

## INTRODUCTION

---

La chromatographie sur colonne est subdivisée en plusieurs types qui dépendent de l'appareillage utilisé :

- chromatographie classique,
- chromatographie en phase gazeuse (CPG)
- chromatographie liquide à haute pression (HPLC).

La chromatographie sur colonne classique est une technique de séparation préparative: le mélange peut atteindre plusieurs grammes.

### **Inconvénients :**

- l'élution nécessite de grandes quantités de solvant,
- technique très lente ; peut durer plusieurs heures,
- mise au point difficile ; nécessite de nombreux essais...

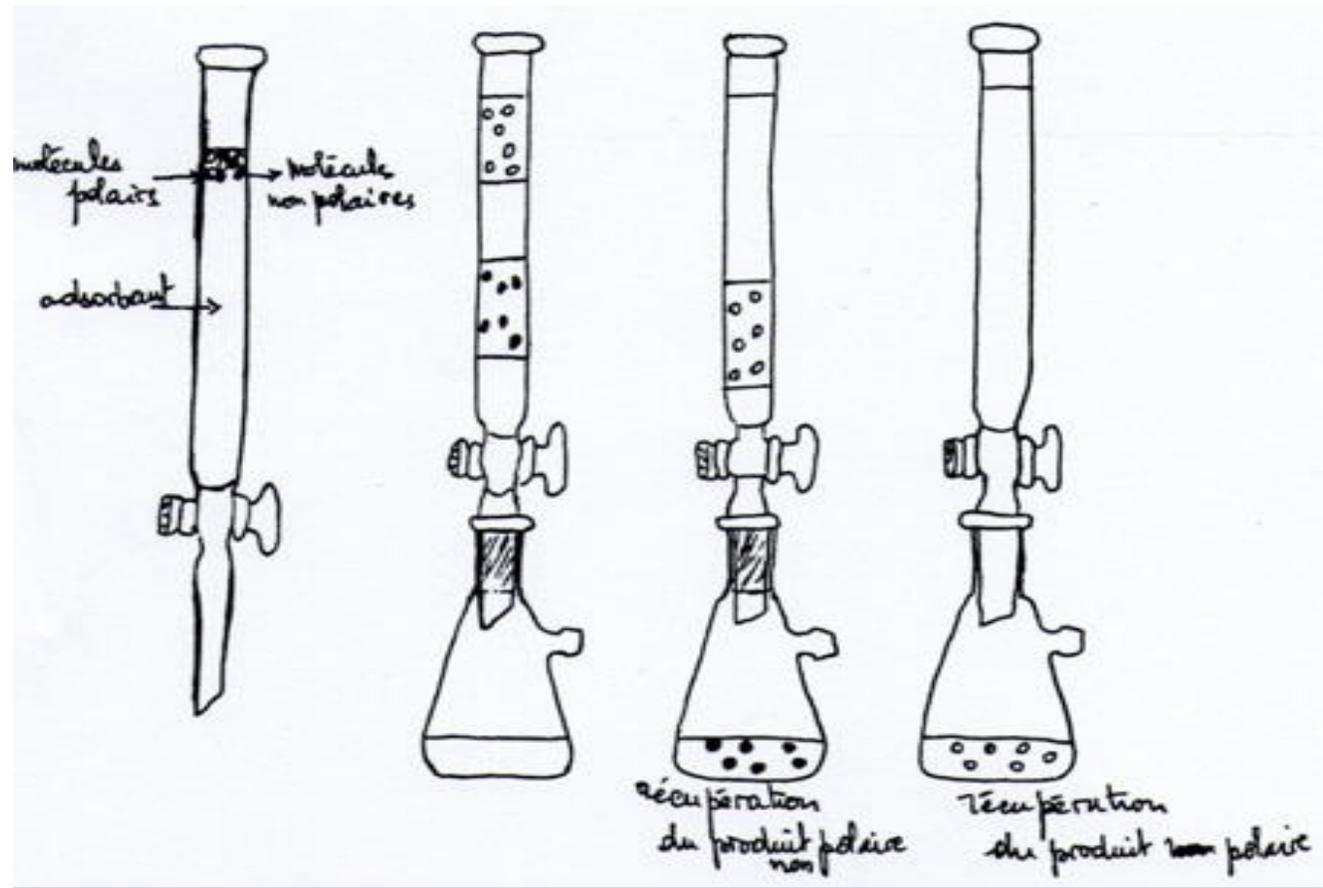
## Principe de la CLC :

---

La CLC se base sur des phénomènes d'adsorption; la séparation des composants résulte de l'écoulement continu d'un éluant à travers une colonne par gravité ou sous l'effet d'une faible pression.

- **PS**: le gel de silice ou l'alumine.
- **PM** : un seul solvant ou un mélange de deux solvants de polarité différente:
  - L'élution commence avec le solvant le moins polaire puis on augmente la polarité de l'éluant progressivement pour accélérer le déplacement des constituants.
  - L'échantillon en solution concentrée est déposé au sommet;
  - Les molécules sont entraînées vers le bas de la colonne à des vitesses variables selon leur affinité pour l'adsorbant et leur solubilité dans l'éluant.
  - Le chromatogramme se développe en formant une succession de zones cylindriques qui se séparent en migrant vers le bas.
  - Chaque zone est recueillie séparément.

## Principe de la CLC :



Représentation d'une séparation par chromatographie sur colonne

## Facteurs dont dépend la séparation :

---

### Adsorbant :

- Choix approprié de l'adsorbant: pour une meilleure séparation et pour éviter l'amorce de réactions indésirables (déshydratation Alcools tert/Alum-AC, hydrolyse Esters sur Alum-Base...).
- Adsorbants usuels: alumine (acide, base ou neutre), gel de silice...
- Granulométrie: 50 – 200  $\mu\text{m}$  pour assurer une vitesse d'élution satisfaisante
- Remplissage uniforme de la colonne, pour assurer un échange rapide du composé adsorbé entre **PM** et **PS**.
- Quantité de l'adsorbant: 30 – 50 g d'adsorbant / 1 g d'échantillon à séparer; peut être augmentée si la séparation est difficile.



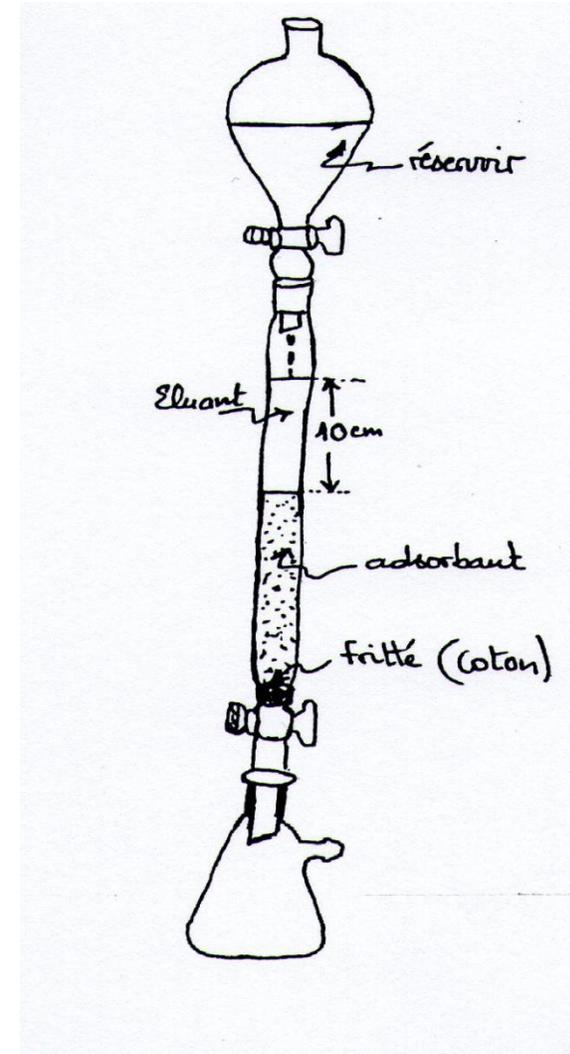
## **Éluant :**

- En général, l'éluant est un mélange de 2 solvants de polarité différente.
- On commence l'éluion par le solvant le moins polaire pour entraîner les molécules les moins polaires. Ensuite, on augmente la polarité de l'éluant graduellement par ajout du solvant le plus polaire pour que les molécules polaires migrent vers le bas de la colonne.
- Ne pas employer de solvant plus polaire que l'éther diéthylique ou  $\text{CHCl}_3$  lorsqu'on utilise l'alumine ou le gel de silice pour éviter des réactions indésirables et la dissolution de l'adsorbant.

## Facteurs dont dépend la séparation :

### Dimensions de la colonne :

- les colonnes sont dotées à la base d'une plaque d'arrêt (disque en verre fritté, en porcelaine) permettant la percolation du solvant et la rétention de l'adsorbant.
- la hauteur de la colonne: l'adsorbant occupe une hauteur égale à 10 fois le diamètre de la colonne et un espace de 10 cm au moins doit être réservé au dessus de l'adsorbant pour disposer le support supérieur et le solvant.



## Facteurs dont dépend la séparation :

---

### La vitesse d'élution :

- La vitesse d'élution doit être constante et suffisamment lente pour assurer la meilleure séparation possible.
- L'élution ne doit pas être trop lente pour éviter l'élargissement des bandes: séparation médiocre.
- Une vitesse élevée n'est autorisée que si les composés à séparer ont des polarités très différentes.

## Recherche des conditions opératoires :

---

Rechercher les conditions opératoires par **CCM** :

- Choix d'un mélange de deux solvants appropriés de polarité différente;
- Les  $R_f$  des constituants doivent être différents pour assurer une meilleure **séparation** possible et l'utilisation d'une **quantité modérée de solvant**.

## Remplissage de la colonne :

---

- Remplissage doit être homogène et exempt de bulles d'air,
- Conserver les surfaces **inf** et **sup** de l'adsorbant horizontales (pour éviter la déformation des chromatogrammes).

### 1. Par voie humide :

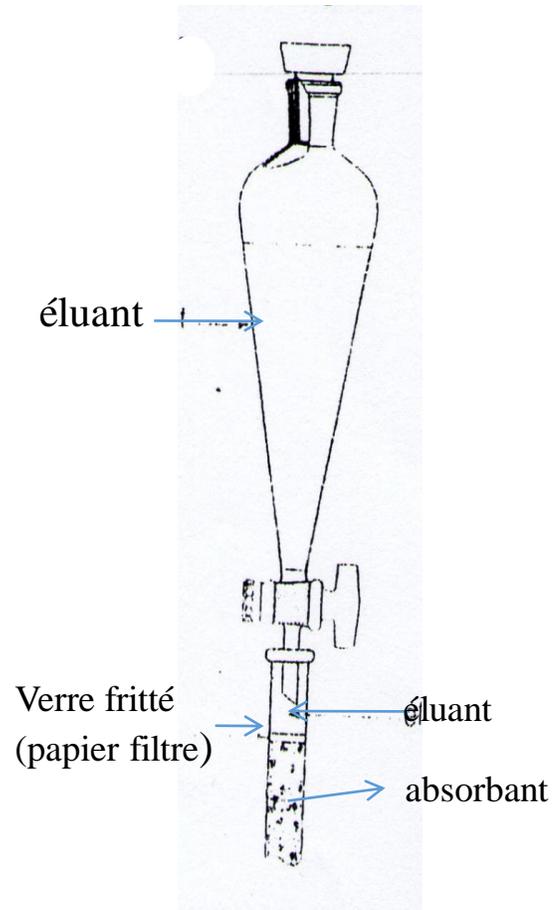
- Préparation d'une bouillie homogène et fluide en versant l'adsorbant, par petites quantités, dans le solvant le moins polaire.
- Remplissage de la colonne fixée en position verticale (la bouillie est versée par petites portions successives en frappant sur les parois de la colonne pour assurer un bon tassement). A chaque fois, on laisse couler le solvant lentement. On poursuit l'opération jusqu'à ce que la totalité de la bouillie soit introduite
- On laisse décanter et on garde le niveau de solvant supérieur à celui de l'adsorbant.

### 2. Par voie sèche :

- Dans une colonne remplie au 2/3 de **solvant le moins polaire**, on verse l'adsorbant, en petites quantités successives (pour assurer un bon tassement);
- On termine l'opération comme dans le cas précédent.

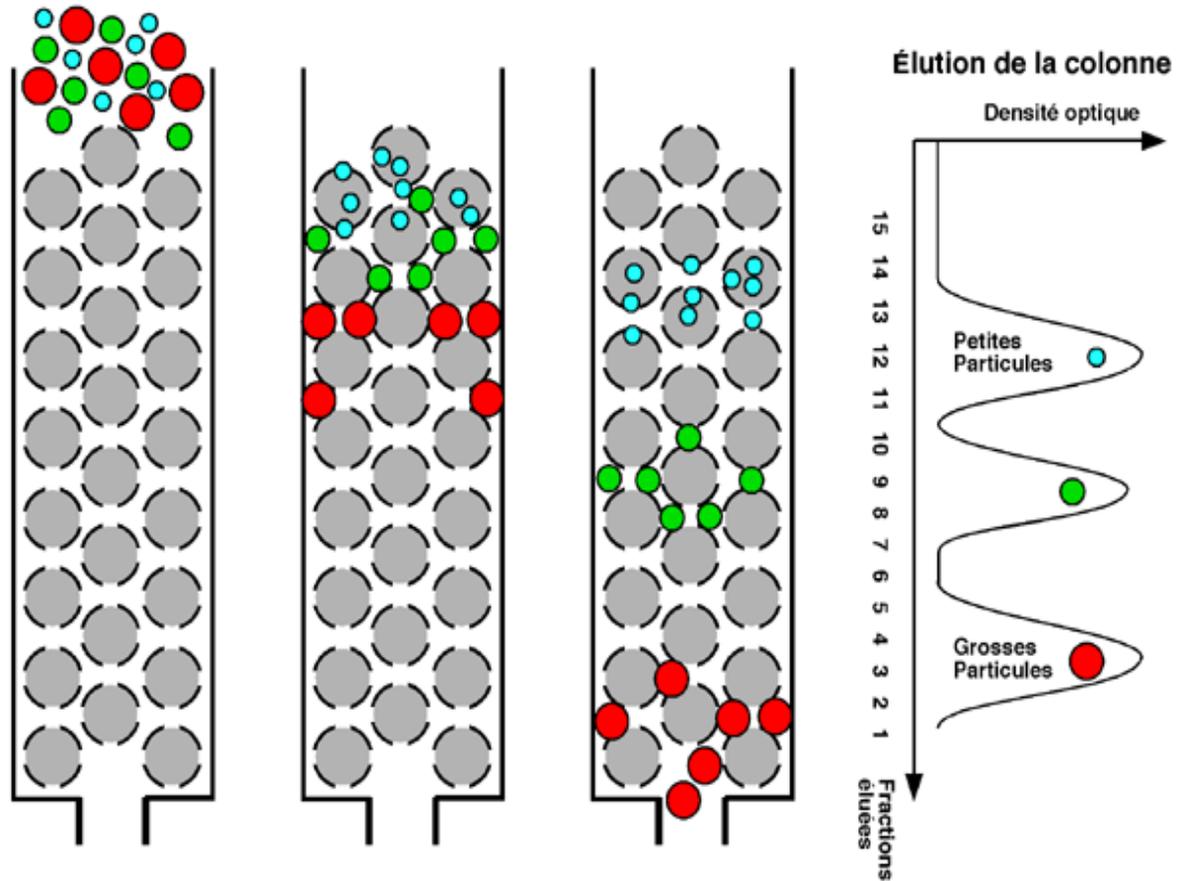
## Dépôt de l'échantillon et séparation :

- Ajuster le niveau de solvant légèrement au dessus de l'adsorbant (colonne exempt de fissures et de bulles d'air).
- A l'aide d'une pipette capillaire, on verse l'échantillon concentré dans le solvant (veiller à ce que la distribution soit homogène: introduire une rondelle de papier filtre (verre fritté) au dessus de l'adsorbant).
- Alimenter la colonne en solvant à l'aide d'une ampoule de coulée disposée à sa tête (la pointe de l'ampoule doit être immergée dans le solvant).
- Ouvrir le robinet légèrement (débit de 5-50 gouttes/min: débit faible pour des séparations difficiles).
- Dans de petits flacons, on recueille des fractions de volume constant des constituants du mélange qui se séparent dans la colonne.
- Réunir les fractions identiques (éliminer les fractions de zones de recouvrement)
- Les composés ainsi séparés sont généralement **d'une grande pureté**.



## Identification :

1. **Composés colorés:** repérage facile, les fractions identiques sont réunies.



## Identification :

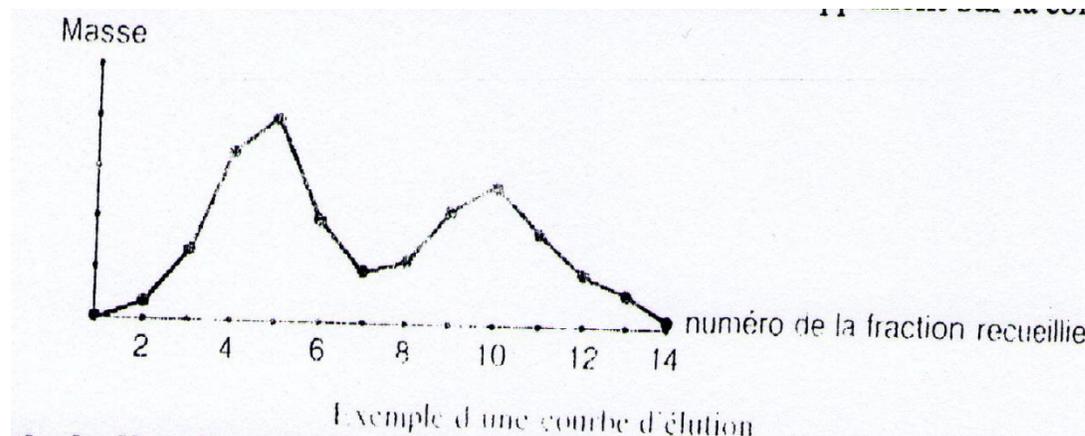
2. **Composés non colorés:** l'analyse des fractions se fait selon deux méthodes :

- **Méthode d'analyse physique :**

Analyse des fractions par: CPG, HPLC, IR, UV-Vis, RMN...

- **Méthode de profil de séparation chromatographique :**

- évaporer le solvant et peser la masse du résidu.
- tracer de la courbe de la masse en fonction du numéro d'ordre de chaque fraction.
- la fin du développement sur la colonne est déterminée par la comparaison de la masse d'échantillon déposé avec celle des résidus recueillis.



**Profil de séparation chromatographique**

# Chromatographie Généralités

# 1. Historique

---

**Mikhaïl SEMENOVITCH TSVET (1872-1920) :**

Botaniste

En 1906, Tswett utilisait la chromatographie pour séparer les pigments végétaux.

Il a appelé la nouvelle technique '**Chromatographie**'  
**Chroma** signifie 'couleur' et **Graphiein** signifie 'écrire'.



**Important: 12 prix Nobel** décernés pour les travaux consacrés à la chromatographie

## Historique

---

- **1903, Michel Twestt**, séparation des pigments végétaux dans une colonne remplie de carbonate de calcium,
- **1931, KUHN et LEDERER**, séparation des isomères du carotène et de la xanthophyle,
- **1934, ZECHMEISTER et CHOLNOKY**, édition du premier livre sur la chromatographie.
- **1938, KUHN** reçut le Prix Nobel.
  - IZMAILOV et SCHRAIBER**, édition d'un livre sur La chromatographie en phase mince
  - Chromatographie d'échange d'ions** sur zéolithes.
- **1941, MARTIN-SYNGE** , La chromatographie de partage,
- **1944, CONSDEN-GORDON, MARTIN**, La chromatographie sur papier,
- **1948, TISELIUS**, Prix Nobel (1<sup>er</sup> détecteur optique: mesure d'indice de réfraction, 1<sup>er</sup> système de gradient d'élution)
- **1952, MARTIN et SYNGE**, Prix Nobel et **MOORE et STEIN**, Prix Nobel, Chromatographie d'échange ionique
- **1959, PORATH, FLODIN**, Chromatographie sur gel
- 1969, HPLC, FPLC**, Avènement de la chromatographie liquide moderne .
- **1979** : première séparation chirale par HPLC.
  - 1980** : autres techniques modernes: chromatographie en phase supercritique, électrochromatographie, etc... et développement de nouveaux matériaux de phases stationnaires.

## 2. Définition IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)

---

### Chromatographie:

- procédé physico-chimique de séparation d'un mélange homogène liquide ou gazeux.
- principe repose sur l'équilibre de concentrations des composés entre deux phases en contact: la *phase stationnaire* et la *phase mobile* qui se déplace.
- séparation est basée sur l'entraînement différentiel des constituants du mélange.

**Phase stationnaire** phase qui reste en place dans une colonne ou sur une surface plane.

**Phase mobile** phase qui se déplace sur ou à travers la phase stationnaire, entraînant l'analyte avec elle.

**Élution** processus au cours duquel les analytes sont entraînés à travers une phase stationnaire par le mouvement d'une phase mobile. **En mode isocratique** la composition de la phase mobile reste inchangée tout au long de l'analyse. Par contre, **en mode gradient** ou **élution graduée**, la composition de la phase mobile change au cours de l'analyse.

**Chromatogramme** signal enregistré en fonction du volume d'élution (temps de rétention).

## 3. Classification

---

### 3.1 Suivant la nature des phases

#### Selon la nature des phases :

- Selon 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 phase stationnaire on distingue:

- la chromatographie gaz / solide **CGS**
- la chromatographie gaz / liquide **CGL**
- la chromatographie liquide / solide **CLS**
- la chromatographie liquide / liquide **CLL**

- La chromatographie **en phase supercritique** : chromatographie dans laquelle la phase mobile est un gaz comprimé ( $T_{critique} 50^{\circ}C$  et à  $P_{critique}$ : 15MPa)

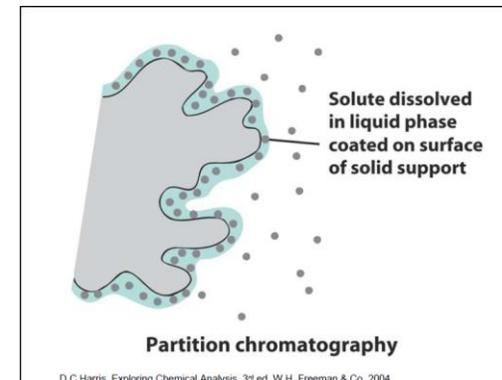
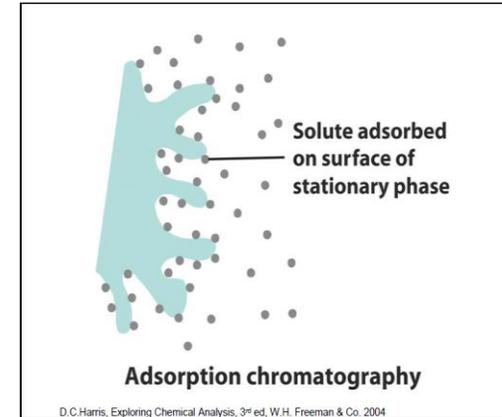
### 3. Classification

#### 3.2 Suivant le mécanisme d'échange

Selon la nature des phénomènes mis en jeu dans la séparation

- Chromatographie **d'adsorption** basée sur les processus répétés d'adsorption/ désorption par la phase stationnaire (solide).

- Chromatographie **de partage** basée sur les différences de solubilité des molécules entre la phase stationnaire (liquide) et la phase mobile.

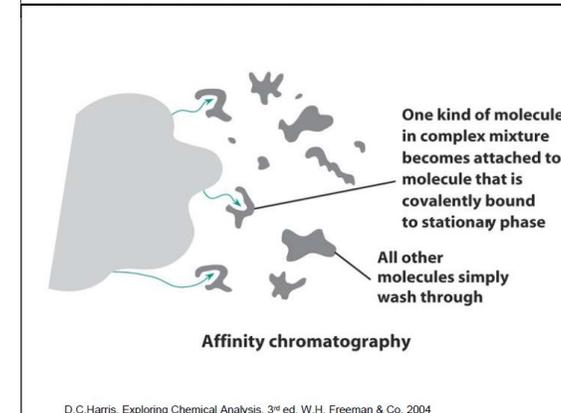
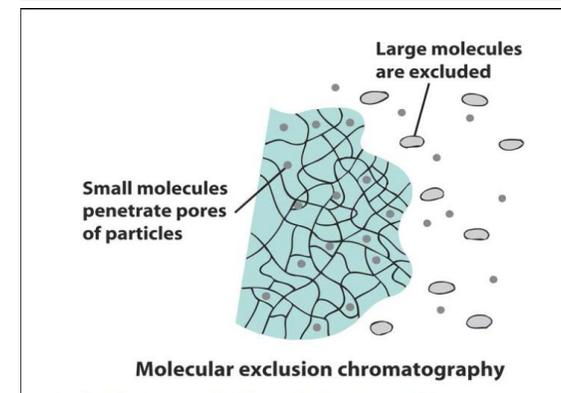
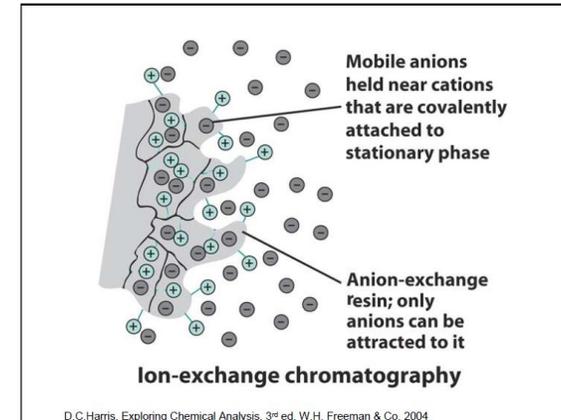


### 3. Classification

- Chromatographie **d'échange d'ions** Échange entre une phase stationnaire ionisée et un soluté ionisé ou ionisable.

- Chromatographie **d'exclusion** basée sur la séparation des molécules en fonction de leur taille.

- Chromatographie **d'affinité** association entre une molécule poly-fonctionnelle et une phase stationnaire comportant des sites stériquement définis et de capacité d'échange multiple.



## 3. Classification

---

### 3.3 Suivant le procédé utilisé

- **Selon la présentation de la PS :**

- Colonne : CPG, HPLC,...
- Planaire : papier ou couche mince (CCM).

- **Selon les modalités de migration de la PM :**

- chromatographie d'éluion : entrainement des solutés en dehors de la phase stationnaire.
- développement : l'éluion s'effectue, les solutés restent sur la phase stationnaire.

### 3. Classification

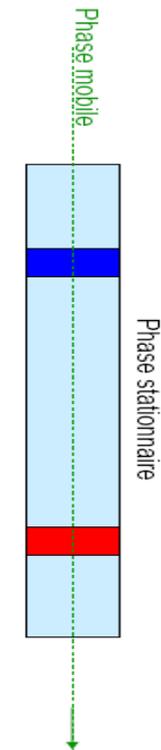
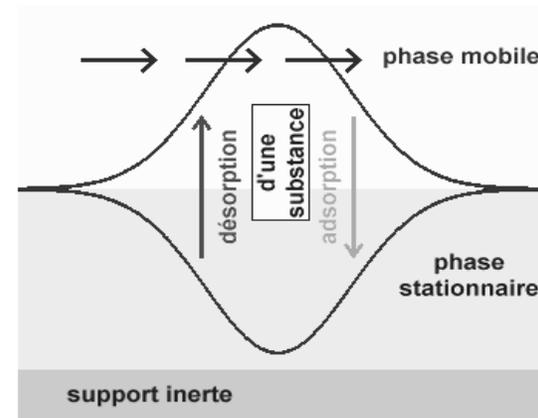
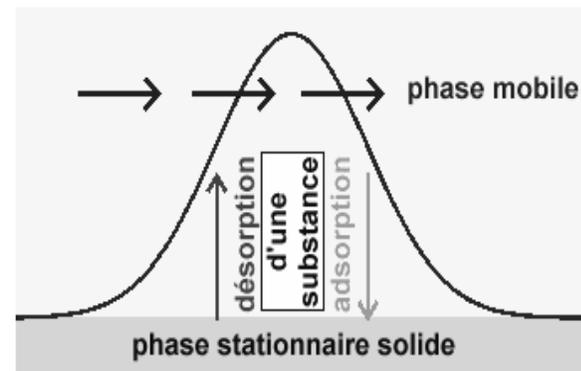
Le tableau suivant résume les diverses classifications de la chromatographie

Classification générale	Méthode spécifique	Phase stationnaire	Type d'équilibre
<b>Chromatographie en phase liquide (LC)</b> (phase mobile = liquide)	Liquide/liquide (ou de partage)	Liquide adsorbé sur un solide	Partage du soluté entre des liquides immiscibles
	Liquide/phase greffée	Espèces organiques greffées à une surface solide	Partage du soluté entre le liquide et la phase greffée
	Liquide/solide* (ou d'adsorption)	Solide	Adsorption
	Ionique (anionique ou cationique)	Résine échangeuse d'ions	Échange entre les ions de l'échantillon et ceux de la phase stationnaire
	Exclusion	Matériau poreux	Partage/tamisage
<b>Chromatographie en phase gazeuse (GC)</b> (phase mobile = gaz)	Gaz/liquide	Liquide immobilisé sur un solide par imprégnation ou par greffage	Partage entre le gaz et un liquide
	Gaz/solide	Solide poreux	Adsorption
<b>Chromatographie en fluide supercritique (SFC)</b> (phase mobile = fluide supercritique)		Espèces organiques greffées à une surface solide ou liquide adsorbé sur un solide	Partage entre le fluide supercritique et la phase stationnaire

\* Les chromatographies sur couche mince (CCM) et sur papier entrent aussi dans cette catégorie

### 4.1 Le processus chromatographique

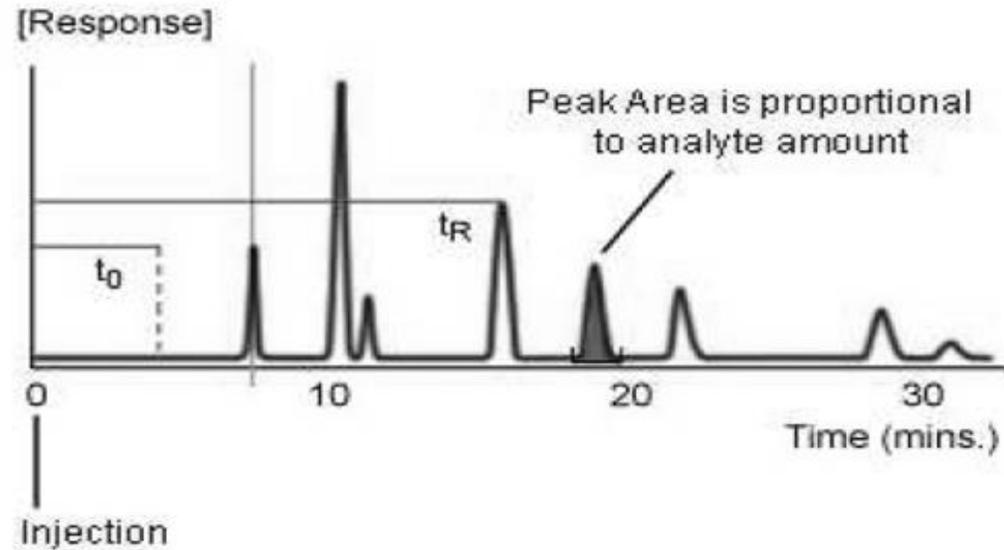
- La phase mobile est continuellement introduite sur la colonne.
- L'échantillon est introduit sans arrêter le flux de phase mobile.
- Les solutés se répartissent entre les deux phases.
- Les composés sont élués en fonction de leur affinité vis-à-vis des phases.
- Les solutés sont détectés en sortie de colonne par le détecteur



## 4 Théorie de bases – Grandeurs fondamentales

**4.2 Chromatogramme** : résultat de l'analyse est le chromatogramme (ensemble de pics).

- Le pic chromatographique représente la distribution statistique des temps de transit du composé dans la colonne :



On caractérise un chromatogramme par certains paramètres importants :

$t_0$  = temps mort

$t_R$  = temps de rétention

$h$  = Hauteur du pic

$\omega$  = Largeur du pic (intersection des tangentes des pt d'inflexion et des abscisses)

$\delta$  = largeur du pic à mi-hauteur.

## 4 Théorie de bases – Grandeurs fondamentales

Un pic d'élution idéal ressemble à la courbe de Gauss (loi Normale de distribution des erreurs aléatoires)

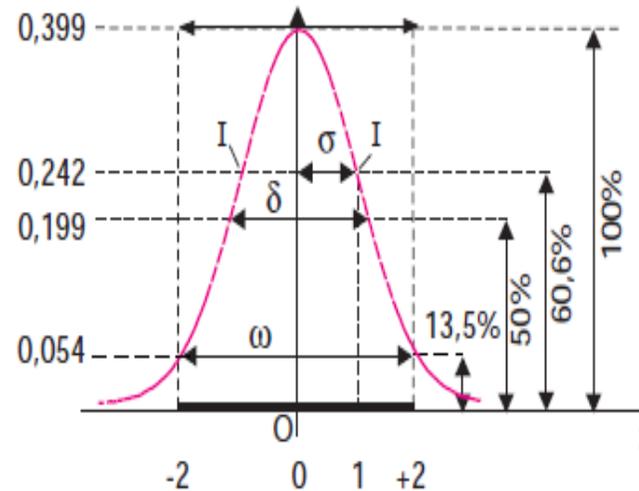
La fonction de densité de probabilités s'écrit sous la forme :

$$y = \frac{1}{2\sigma\sqrt{2\pi}} \cdot \left[ -\frac{(t-t_R)}{2\sigma^2} \right]$$

$y$  : signal en fonction du temps du détecteur situé en sortie de colonne;

$\sigma$  : écart-type du pic d'élution ( $\sigma^2$  = la variance).

$t_R$  : temps de rétention



$$\begin{aligned} \delta &= 2,35 \sigma \\ \omega &= 4 \sigma \\ \omega &= 1,7 \delta \end{aligned}$$

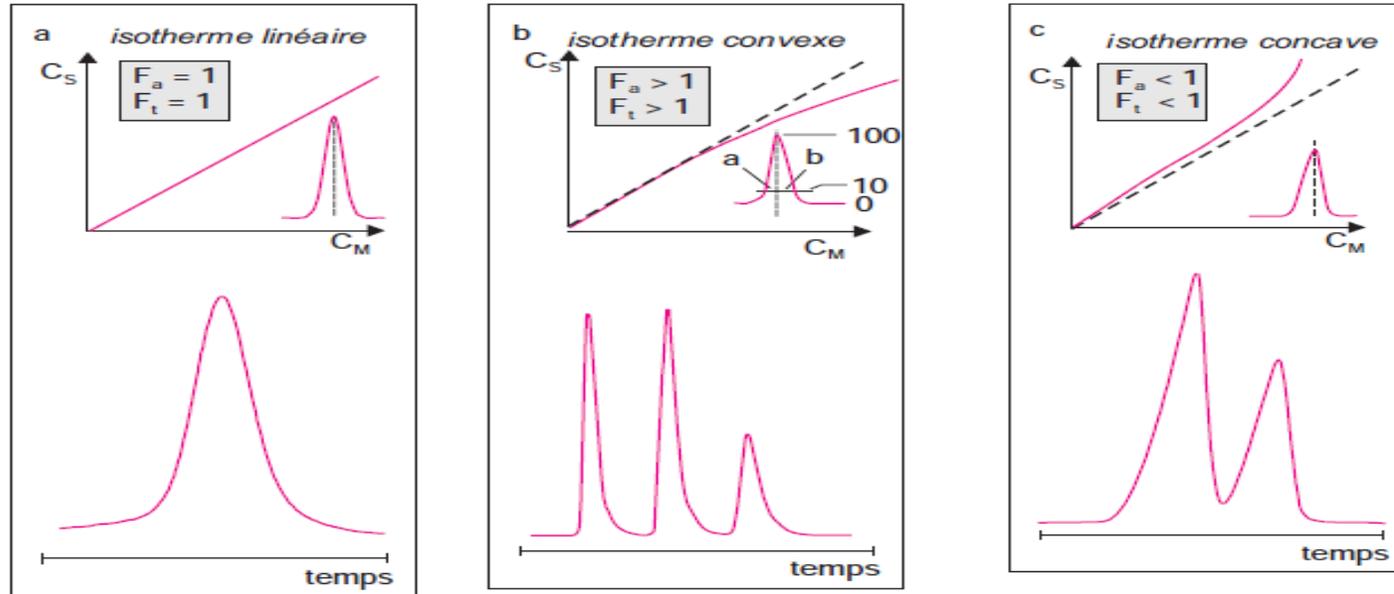
l'aire comprise entre -2 et +2  
vaut 95,4% de l'aire totale  
comprise entre la courbe et  
l'axe des x

Pic chromatographique idéal (Gaussienne)

Substance éluée localisée dans une tranche faible de la colonne avec une valeur  $Y$

- 2 pts d'inflexion à  $\pm\sigma$ , situés à 60,7% de la hauteur du pic ;
- caractérisés par  $2\sigma$  = distance entre  $-\sigma$  et  $+\sigma$  (écart type) ;
- largeur :  $\delta=2.35\sigma$  ;
- largeur à la base:  $\omega=4\sigma$

### Non-idéalité des pics chromatographiques



L'asymétrie observée d'un pic est traduite par:

- le facteur d'asymétrie ( $F_a$ ): 
$$F_a = \frac{b}{a}$$

- le facteur de traînée ( $F_t$ ): 
$$F_t = \frac{a+b}{2a}$$

(mesures de **a** et **b** à 10 % de la hauteur du pic)

4.3 Coefficient de distribution **K** (ou de partage) est donné par:

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

$C_S$  : concentration molaire de l'analyte dans la phase stationnaire,

$C_M$  : concentration molaire de l'analyte dans la phase mobile.

- des valeurs élevées de  $K$  indiquent une migration lente ;
- des valeurs faibles de  $K$  indiquent une migration rapide.
- plus les constantes de partage de deux constituants dans un mélange sont différentes plus la séparation est facile.

4.4 Grandeurs de rétention :

1 **temps de rétention ( $t_R$ )** est le temps requis à un soluté pour atteindre le détecteur après avoir traverser la colonne.

Sur la figure 1,  $t_R$  représente le temps écoulé entre l'injection du produit  $t_0$  et le sommet du pic de cet analyte sur le chromatogramme.

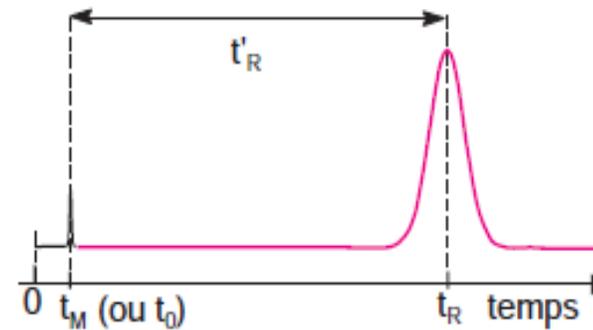


Fig. 1 : schéma d'un chromatogramme

## 4 Théorie de bases – Grandeurs fondamentales

### ***Le temps de rétention dépend***

- du couple soluté-phase stationnaire en CPG
- du triplet soluté-phase stationnaire-phase mobile en CL
- du débit de la phase mobile
- de la masse de phase stationnaire dans la colonne
- de la température de la colonne
- de la longueur de la colonne

### ***Le temps de rétention ne dépend pas***

- de la quantité de soluté injecté
- de la nature et de l'abondance des autres constituants
- de la nature de la phase mobile en CPG.

**2 temps mort  $t_M$**  est le temps requis pour un composé non retenu par la colonne pour atteindre le détecteur.

**3 temps de rétention corrigé  $t'_R$**  est donnée par.  $t'_R = t_R - t_M$ .

**4 vitesse linéaire moyenne** de migration d'un analyte :  $v = L/t_R$

et **celle de la phase mobile** :  $u = L/t_M$

### 5 Le volume de rétention (VR)

On définit le volume de rétention :  $VR = t_R \cdot D = t_R \cdot v \cdot s$

où : D: débit de la phase mobile  
v : vitesse linéaire de la phase mobile ;  
s : section réduite de la colonne ;

sachant que :  $s = s' \cdot \varepsilon$  (s' : section de la colonne )

et  $\varepsilon = V_M / V_T$  ( $\varepsilon$  : porosité).

**6 le volume mort (VM)** volume de la phase mobile (correspond au volume interstitiel accessible).

Il est égale à :  $VM = t_M \cdot D$ .

**7 Relation volume de rétention VR et coefficient de distribution K**

$$VR = VM + K VS.$$

VS : volume de la phase stationnaire (masse, surface spécifique, selon les unités de K).

*Remarque:* cette relation ne s'applique que dans le cas d'élution linéaire c'est-à-dire quand K varie linéairement avec la concentration du composé dans chaque phase.

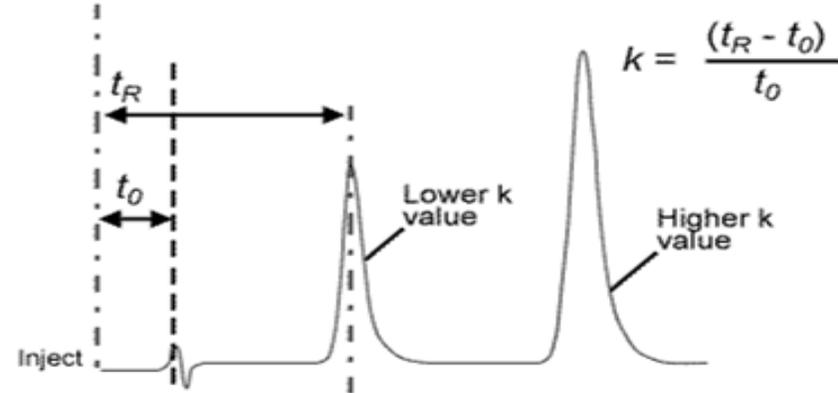
### 4.5 Grandeurs de rétention relatives :

#### 1 Facteur de rétention ou facteur de capacité $k'$ :

exprimé par:

$$k' = \frac{K \cdot V_S}{V_M}$$

ou: 
$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$



$k'$  décrit la vitesse de progression d'un soluté dans la colonne:

- $k'$  élevée indique que le composé est fortement retenu par la colonne (passe un temps significatif à interagir avec la phase stationnaire) ;
- il est préférable d'avoir :  $1 < k' < 10$ .
  - si  $k' < 1$ , le soluté sort rapidement de la colonne et n'est pas séparé des impuretés;
  - si  $k' > 20$ , le soluté est retenu dans la colonne, le temps d'élution devient trop long.

•  $k'$  est indépendant :

- de faibles variations de débit ;
- des dimensions de la colonne.

### 2 Sélectivité d'une colonne ou facteur de séparation $\alpha$ :

décrit la séparation de deux solutés (A) et (B) dans une colonne

$$\alpha = \frac{t_R(B) - t_M}{t_R(A) - t_M}$$

Où: (B) est l'espèce la plus retenue.

Toujours  $\alpha > 1$ .

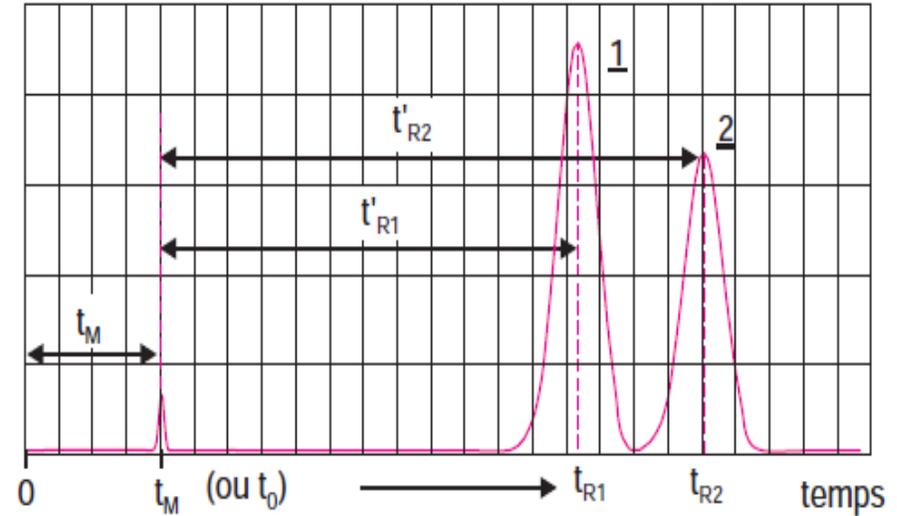
Il s'agit du rapport des **temps de rétention réduits**.

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

$$k' \cdot t_M = t_R - t_M$$

$$k' = K \frac{V_S}{V_M}$$

$$\alpha = \frac{k'(B)}{k'(A)} = \frac{K(B)}{K(A)}$$



### 3 Efficacité (Nombre de plateaux théoriques) N

Le nombre d'étages théoriques mesure la dispersion de l'analyse lors de sa traversée de la colonne. La colonne est efficace si les pics obtenus sont étroits.

Le nbre de plateaux théoriques :

$$N = (t_R / \sigma)^2$$

$$N = 16(t_R / \omega_{1/2})^2 = 5,54 \left( \frac{t_R}{\delta} \right)^2$$

Où :  $\omega$  : largeur du pic à la base,  
 $\delta$  : largeur du pic à mi-hauteur.

• Plus un pic est étroit, plus  $\omega$  et  $\delta$  sont faibles, plus N est élevé.

• N dépend :

- de la longueur de la colonne,
- de la granulométrie : plus les grains sont petits, plus la perte de charge est importante,
- de l'épaisseur du film de la phase stationnaire,
  - film sur paroi ou sur support,
  - si film est épais, le partage est plus lent, les échanges sont plus lents, les pics sont plus larges.
- de la T (CPG) et de la viscosité du solvant (CLHP),
- du débit de gaz vecteur (voir de la courbe de Van Deemter),
- de la nature des composés.

## 4 Théorie de bases – Grandeurs fondamentales

4 Hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT ou H) vaut:

$$H = \frac{L}{N} \quad \text{où: } L : \text{longueur de la colonne,} \\ N : \text{nombre de plateaux.}$$

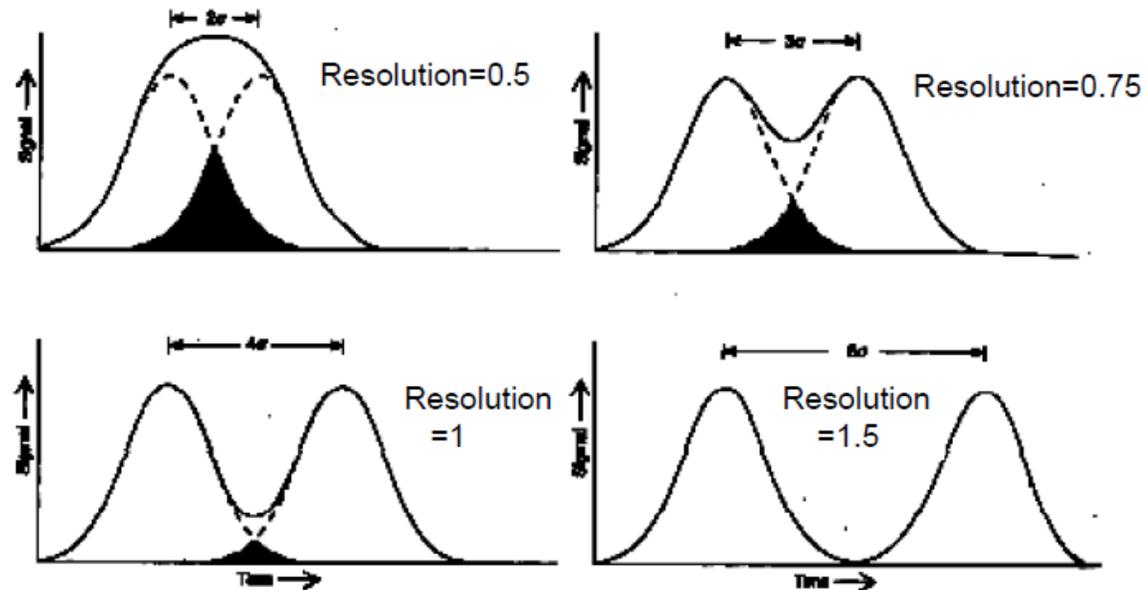
5 Résolution est une mesure quantitative de la séparation de deux substances.

Elle est définie par la relation suivante:

$$R_s = \frac{\Delta Z}{(\omega_A/2) + (\omega_B/2)} = \frac{2\Delta Z}{(\omega_A + \omega_B)} \quad R_s = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{(\omega_A + \omega_B)}$$

quand  $R_s = 1,5$  la séparation est complète ( 2 solutés sont totalement séparés) ;

quand  $R_s = 1$  (séparations mais avec 2 % de recouvrement des 2 pics) ;



Exemple des solutés A et B sur 4 colonnes aux pouvoirs de résolution différents

##### 6 Effet des facteurs de rétention ( $k'$ ) et de sélectivité ( $\alpha$ ) sur $R_s$ :

On sait que: 
$$R_s = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{\omega_A + \omega_B}$$

En admettant que les temps de rétention des analytes A et B sont suffisamment voisins :

$$\omega_A = \omega_B \approx \omega \quad \text{alors} \quad R_s = \frac{[(t_R)_B - (t_R)_A]}{\omega}$$

Sachant que:  $N = 16 \left( \frac{t_R}{\omega} \right)^2 \Rightarrow R_s = \frac{[(t_R)_B - (t_R)_A] \cdot \sqrt{N}}{4 \cdot (t_R)_B}$

Réarrangée en fonction des facteurs de capacité des analytes A et B : 
$$R_s = \frac{[k'_B - k'_A] \sqrt{N}}{(1 + k'_B) \cdot 4}$$

On substitue  $k'_A$  par  $\alpha$ :  $\alpha = \frac{k'_B}{k'_A}$  on obtient: 
$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left[ \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right] \cdot \frac{k'_B}{1 + k'_B}$$

Et on peut calculer l'efficacité: 
$$N = 16 \cdot R_s^2 \left[ \frac{\alpha}{\alpha - 1} \right]^2 \left[ \frac{1 + k'_B}{k'_B} \right]^2$$

Formes simplifiées cas où  $K_A = K_B$  ( $k'_A = k'_B = k'$  est la moyenne de  $k'_A$  et  $k'_B$ ) de sorte que:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot [\alpha - 1] \cdot \frac{k'}{1 + k'} \quad N = 16 \cdot R_s^2 \left[ \frac{\alpha}{\alpha - 1} \right]^2 \left[ \frac{1 + k'}{k'} \right]^2$$

### 7 Effet de la résolution sur le temps de rétention :

Le facteur limitant d'une chromatographie est l'élution de l'analyte le plus retenu par la colonne (B), on peut écrire:

$$v_B = \frac{L}{(t_R)_B}$$

Sachant que:  $v_B = u \frac{1}{1+k'_B}$  et  $N = \frac{L}{H}$

On obtient:  $(t_R)_B = \frac{N.H.(1+k'_B)}{u}$

Combinée à l'expression:  $N = 16.R_s^2 \left[ \frac{\alpha}{\alpha-1} \right]^2 \cdot \left[ \frac{1+k'}{k'} \right]^2$

Le temps de rétention s'écrit:  $(t_R)_B = \frac{16R_s^2 H}{u} \left[ \frac{\alpha}{\alpha-1} \right]^2 \cdot \left[ \frac{(1+k'_B)^3}{(k'_B)^2} \right]$

c'est le temps que prendra une analyse chromatographique.

## 5 Effet de la température sur le temps de rétention

La constante d'équilibre  $K$  varie avec la température selon l'équation suivante :

$$\ln K = \frac{-\Delta_r G^\circ}{RT}$$

où :  $\Delta G^\circ$  est la différence d'énergie libre de dissolution du soluté entre les 2 phases.  $K \gg 1$  et donc  $\Delta G^\circ < 0$ .

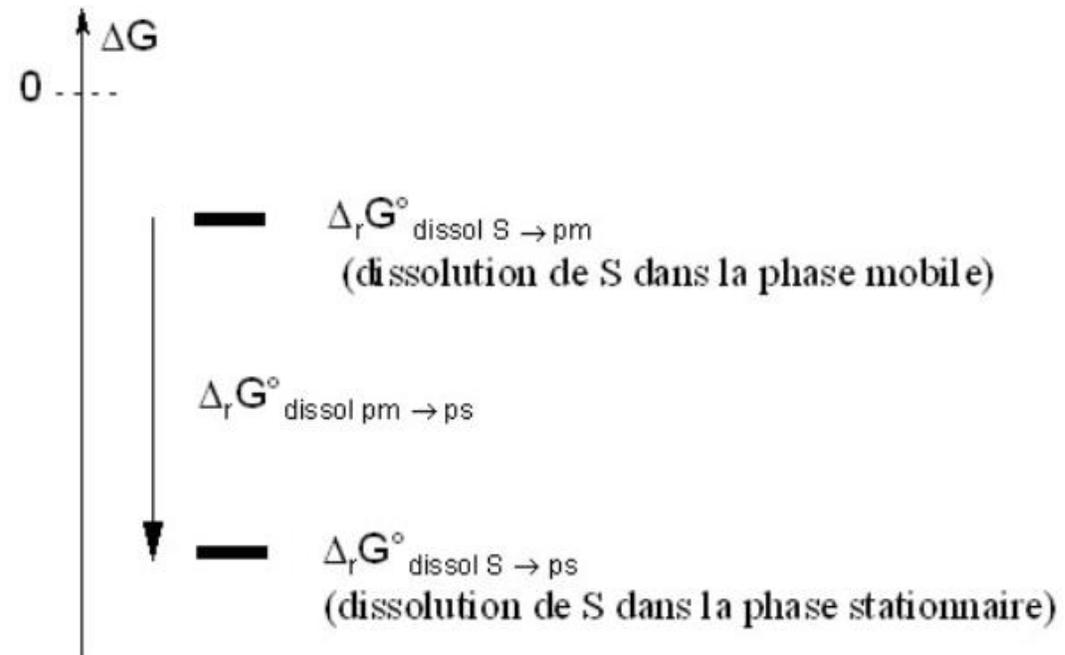
sachant que:

$$k' = \frac{t'_r}{t_m} = K \frac{V_S}{V_M} = \frac{K}{\beta} \quad t'_r = t_m \cdot \frac{K}{\beta}$$

$$\text{Soit: } t'_r = t_m \cdot \frac{K}{\beta}$$

En combinant les 2 expressions, on trouve la relation entre le temps de rétention réduit et la température :

$$\ln t'_r = \frac{-\Delta_r G^\circ}{RT} - \ln \beta + \ln t_m$$



Graphique de  $\Delta_r G^\circ$  (dissolution  $\phi_{\text{mob}} \rightarrow \phi_{\text{stat}}$ )

Plus  $\Delta_r G^0$  est faible (grand en valeur absolue), plus  $K$  est grand, plus le produit est retenu par la colonne, plus le  $t_r$  est grand.

Ainsi, pour avoir une bonne séparation, il faut que :

$$\Delta_r G^0 < 0 \quad \text{soit :} \quad \Delta_r G^0_{(dissol \varphi_{stat})} < \Delta_r G^0_{(dissol \varphi_{mob})}$$

$$\text{et en valeur absolue : } \Delta_r G^0_{(dissol \varphi_{stat})} > \Delta_r G^0_{(dissol \varphi_{mob})}$$

$$\Delta_r G^0_{(dissol \varphi_{mob} \rightarrow \varphi_{stat})} = \text{fonction de } T ; \quad \Delta_r G^0 = \Delta_r H^0 - T * \Delta_r S^0$$

En supposant que :  $\Delta_r H^0$  et  $\Delta_r S^0$  sont indépendants de la température, l'expression s'écrit :

$$\ln t'_r = -\frac{\Delta_r H^0}{RT} + \frac{\Delta_r S^0}{R} - \ln \beta + \ln t_m$$

$$\ln t'_r = \frac{A}{T} + B$$

## 5 Effet de la température sur le temps de rétention

Soient  $T_1$  et  $T_2$  où  $T_2 > T_1$  et les facteurs de rétention correspondants  $k'_1$  et  $k'_2$ , l'expression s'écrit alors comme suit:

$$\ln\left(\frac{t'_{r1}}{t'_{r2}}\right) = -\frac{\Delta_r H}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right) = -\frac{\Delta_r H}{RT_1 T_2} (T_2 - T_1)$$

Comme  $t'_{r1} > t'_{r2}$ , on voit que :  $\Delta_r H^0 < 0$

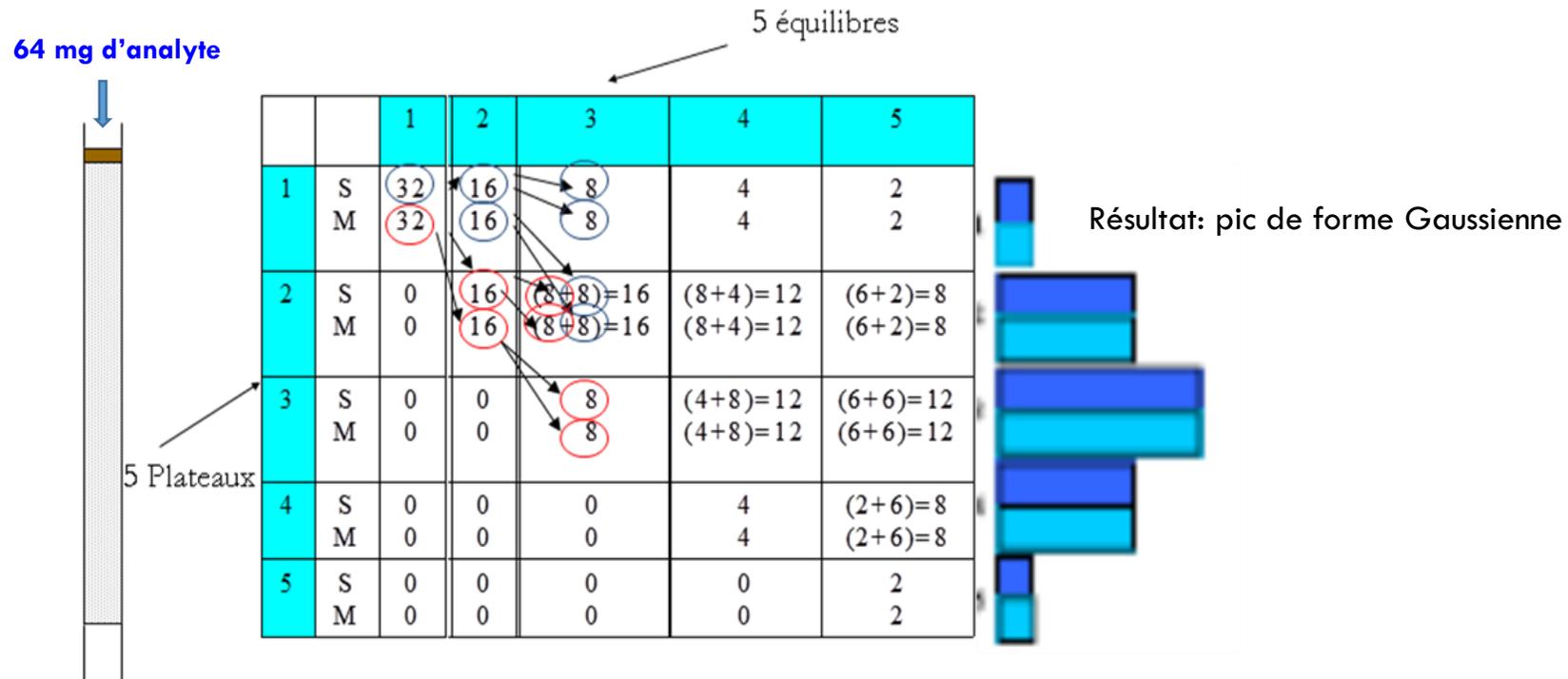
Le temps mort  $t_m$  peut être supposé indépendant de la température pour une colonne donnée et une pression donnée.

En fait, quand la température augmente, la viscosité de la phase mobile diminue et sa vitesse augmente légèrement. Expérimentalement, on observe une légère augmentation du temps mort avec la température.

## 6 Théorie de base de la chromatographie

### 6.1 Théorie des plateaux

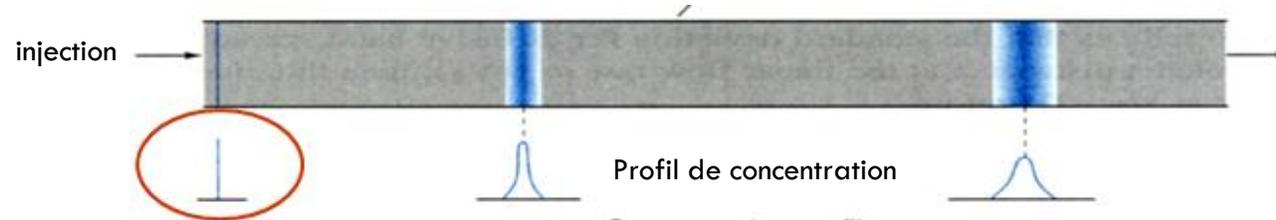
- On assimile la colonne chromatographique à une colonne à distiller de longueur  $L$ ,
- Colonne est constituée de  $N$  plateaux théoriques (de même hauteur),
- La taille d'un plateau  $H$  (HEPT)
- Chaque plateau contient  $1/N$ ème de la  $PM$  et de la  $PS$ ,
- Dans chaque plateau, il y aurait un équilibre parfait du soluté entre  $\phi_{h\text{ stat}}$  et  $\phi_{h\text{ mob}}$ ,



## 6 Théorie de base de la chromatographie

### Insuffisances de cette théorie :

- Néglige le passage continu de la phase mobile sur la phase stationnaire,
- Ce passage produit un élargissement ou un rétrécissement des pics.

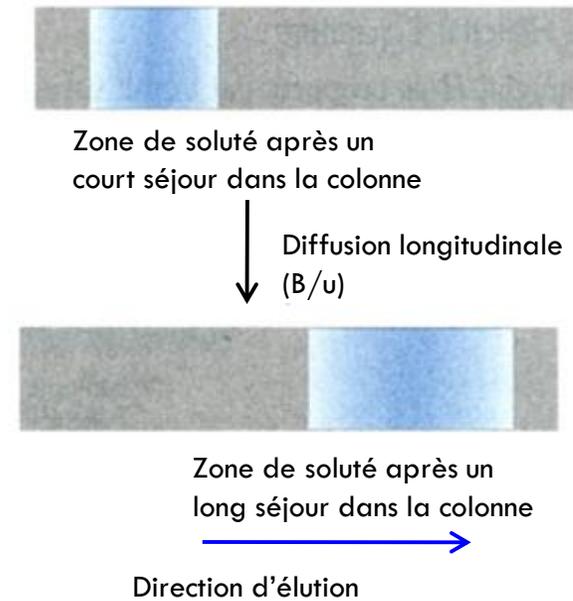


### 6.2 Théorie cinétique

#### Pourquoi les bandes s'élargissent?

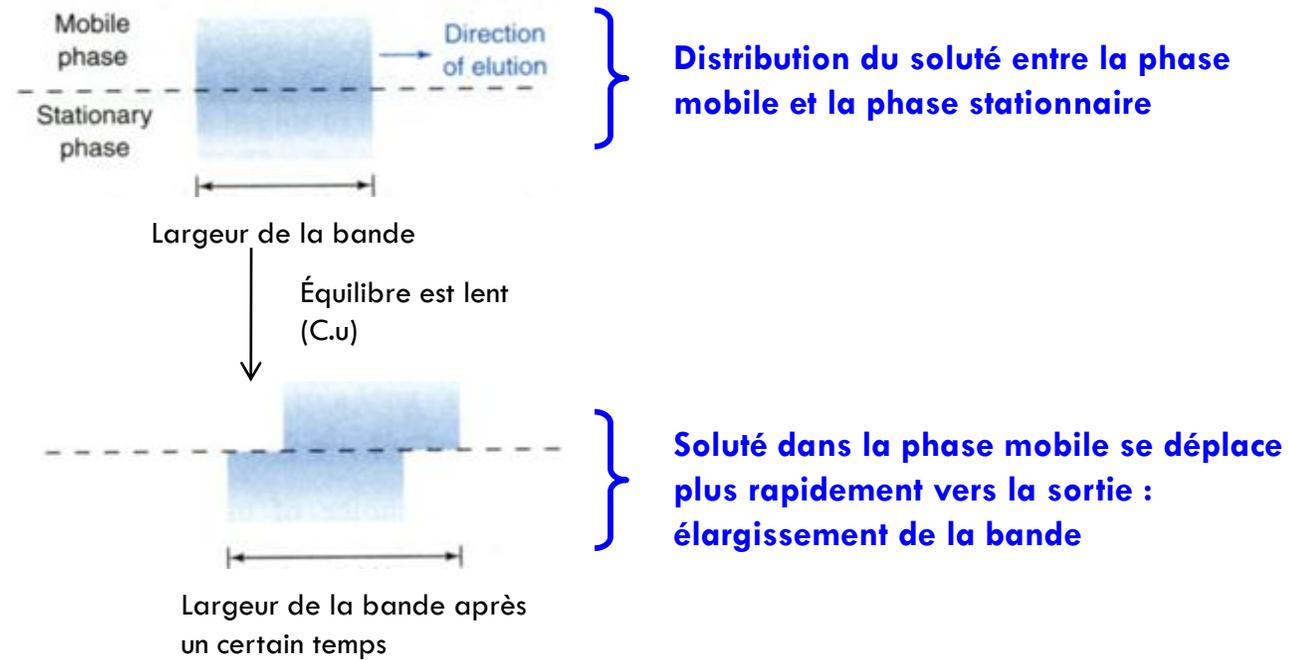
Il existe plusieurs causes à l'élargissement d'un pic:

1. **Injection de l'échantillon:** l'échantillon est injecté sur une faible largeur de la colonne (la quantité injectée contribue à l'élargissement du pic chromatographique).
2. **Diffusion longitudinale:** la bande s'élargie lentement à fur et à mesure que l'analyte diffuse de la zone de grande concentration vers la zone de faible concentration



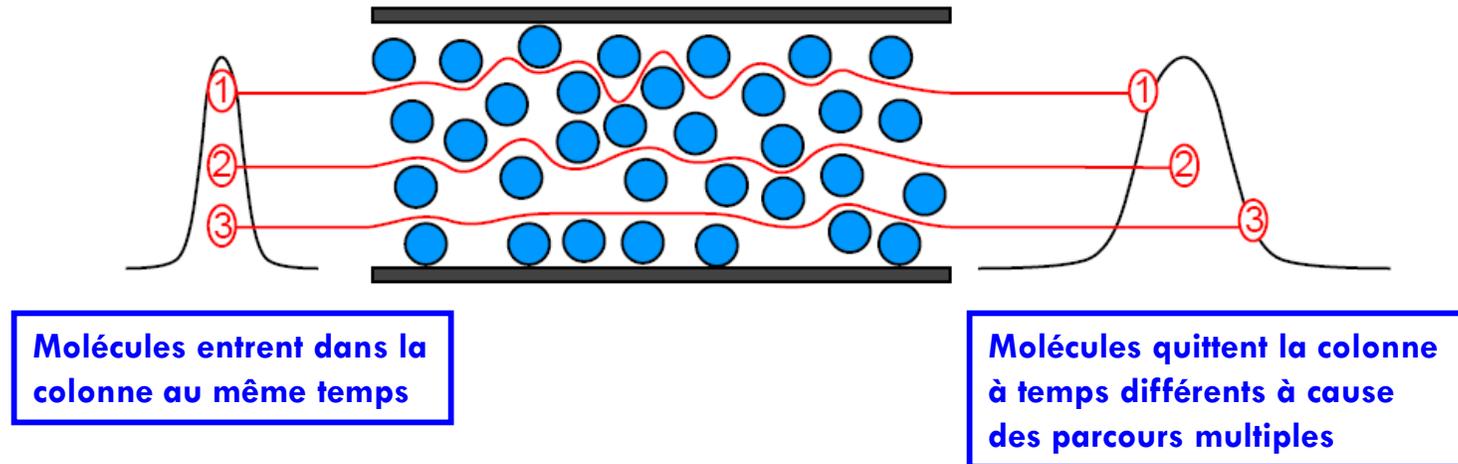
## 6 Théorie de base de la chromatographie

3. **Transfert de masse**: un temps fini est nécessaire à l'équilibre des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire à chaque plateau. Plus le soluté est retenu dans la phase stationnaire, la bande s'élargie.



## 6 Théorie de base de la chromatographie

4. **Parcours d'écoulement multiples (diffusion turbulente):** Au fur et à mesure que les molécules de soluté traversent la colonne, certaines arrivent à la fin plus tôt que d'autres en raison des chemins parcourus différents autour des particules de la phase stationnaire, ce qui entraîne des distances de déplacement différentes.



### Équation de Van Deemter :

La hauteur du plateau (H) est proportionnelle à la largeur de la bande.

Plus la hauteur du plateau est petite, plus la bande est étroite et l'efficacité est meilleure.

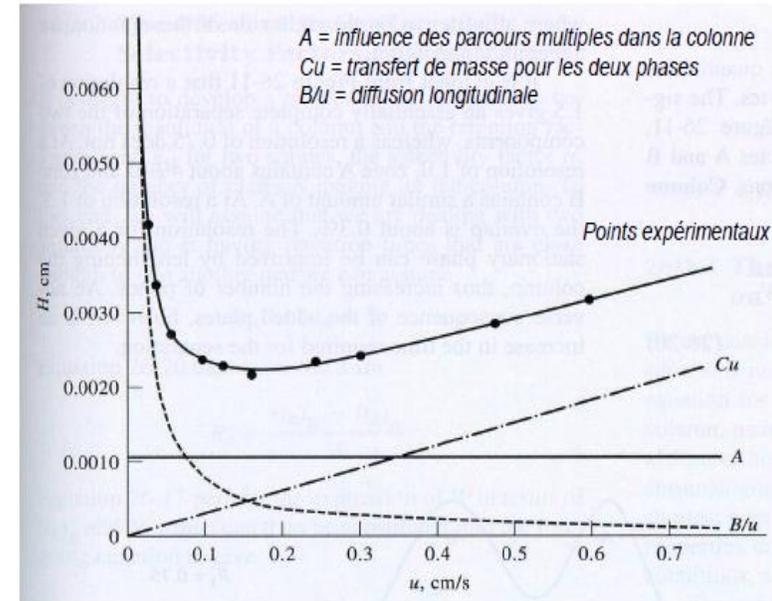
Hauteur du plateau

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

Parcours multiples

Transfert de masse

Diffusion longitudinale



avec:  $u$  = vitesse linéaire de la phase mobile  
 $A, B, C$  = constantes pour une colonne et une phase stationnaire donnée

Processus	Terme dans l'équation	Relation entre les propriétés de la colonne et de l'analyte
Diffusion turbulente	A	$A = 2\lambda d_p$
Diffusion longitudinale	$B/u$	$\frac{B}{u} = \frac{2\gamma D_M}{u}$
Transfert de masse dans la phase stationnaire	$C_S u$	$C_S u = \frac{f_S(k') d_f^2}{D_S} \times u$
Transfert de masse dans la phase mobile	$C_M u$	$C_M u = \frac{f_M(k') d_p^2}{D_M} \times u$

$u, D_S, D_M, d_f, f_p, k'$  sont définis dans le tableau précédent

$\lambda, \gamma$  = constantes dépendant de la qualité du remplissage

$C_S, C_M$  = coefficient de transfert massique respectivement dans la phase stationnaire et la phase mobile

$B$  = coefficient de diffusion longitudinale

$f(x)$  = fonction de  $x$

## 7 Optimisation en chromatographie

Ces équations sont très utiles; elles guident l'expérimentateur dans le choix des conditions optimales pour une **meilleure séparation possible** des composés en **un temps minimal**.

$$(t_R)_B = \frac{16R_S^2 H}{u} \left[ \frac{\alpha}{\alpha - 1} \right]^2 \cdot \left[ \frac{(1 + k'_B)^3}{(k'_B)^2} \right]$$
$$R_S = \underbrace{\frac{1}{4}}_{\text{Efficacité}} \cdot \underbrace{\sqrt{N} \cdot \left[ \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right]}_{\text{Sélectivité}} \cdot \underbrace{\left[ \frac{k'_B}{k'_B + 1} \right]}_{\text{Rétention}}$$

Elles contiennent 3 éléments importants:

**1- N et H/u** : reliés aux effets cinétiques conduisant à l'élargissement des pics. L'efficacité a une grande influence sur la résolution.

Les paramètres ayant une influence sur l'efficacité sont :

- La longueur de la colonne (doubler la longueur double N) ;
- La taille des particules ( $d_p$ ) ;
- Le volume interstitiel ;
- Le débit.

## 7 Optimisation en chromatographie

Ainsi, on peut modifier :

- le nombre de HEPT (N) en changeant la longueur de la colonne ;
- la hauteur des plateaux théoriques **H** en changeant le débit de la phase mobile ou sa viscosité (donc DM ou DS), l'épaisseur du film liquide de phase mobile, et le diamètre des particules de la colonne (Voir les termes impliqués dans l'équation de van Deemter).

$\alpha$ (facteur de sélectivité) : dépend des propriétés des 2 analytes et des phases mobile et stationnaire et de leur affinité pour la colonne et la phase mobile.

La sélectivité ( $\alpha$ ) a une grande influence sur la résolution. Les paramètres ayant une influence sur la sélectivité sont :

- La phase mobile ;
- La température ;
- La phase stationnaire.

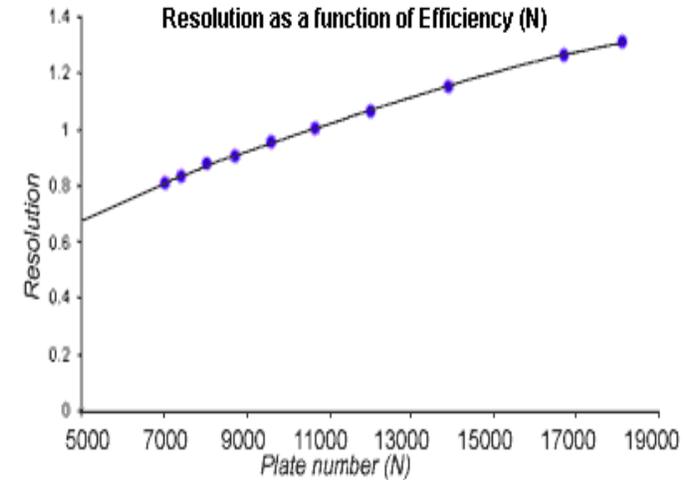


Fig 1 : résolution en fonction de l'efficacité

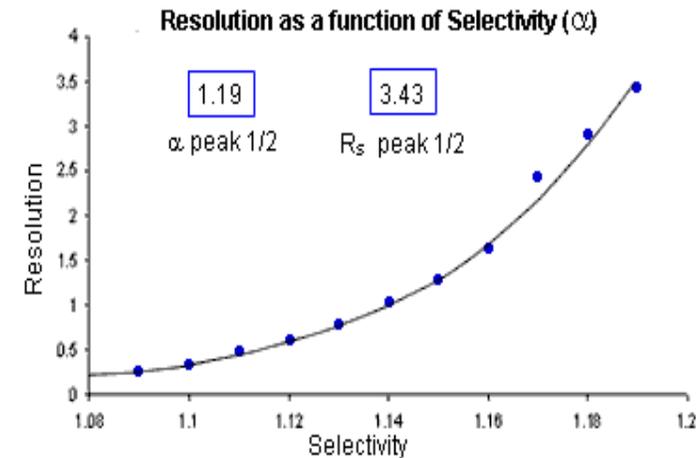


Fig 2 : résolution en fonction de la sélectivité

## 7 Optimisation en chromatographie

3-  $k'$  (coefficient de partage) : dépend des propriétés des 2 analytes et des phases mobile et stationnaire et de leur affinité pour la colonne et la phase mobile.

On peut aussi changer  $k'$  en changeant:

- la température,
- la composition de la phase mobile.

Le gain maximal en résolution quand  $1 < k' < 5$ .

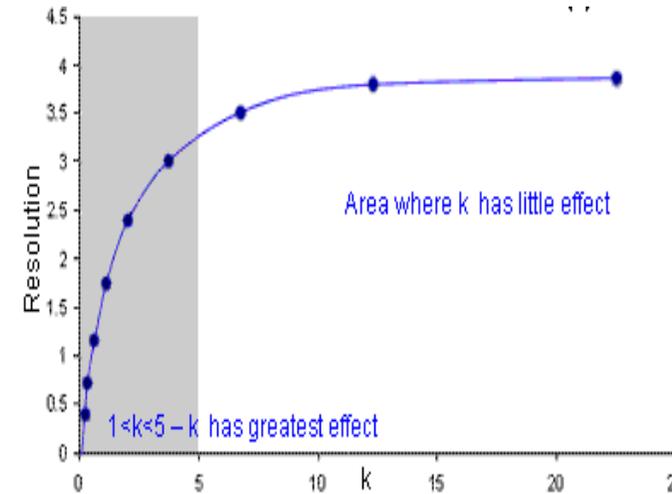


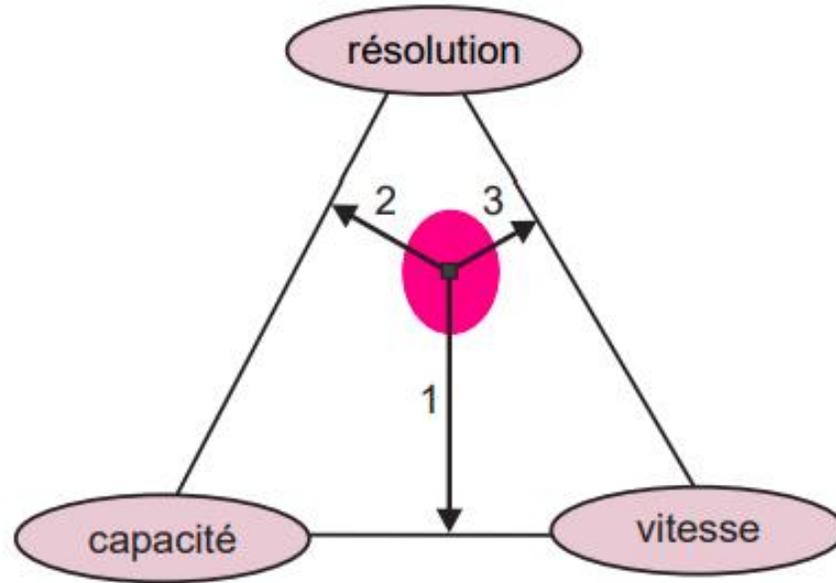
Fig 3 : résolution en fonction du coefficient de partage

### Optimisation de la performance de la colonne :

- augmenter l'efficacité ( $N$ ) sans trop augmenter ( $t_R$ ) et ( $L$ ).
- augmenter le facteur de rétention ( $k'$ ) des composés ( $1 < k' < 10$ ) sans trop augmenter ( $t_R$ ).

#### Le plus simple:

- En phase gazeuse : augmenter la température de la colonne ;
- En phase liquide: ajuster la composition du solvant;
- Augmenter la sélectivité ( $\alpha$ ) tout en gardant ( $1 < k' < 10$ ).



La zone ombrée indique le domaine qui correspond à la chromatographie analytique. Celle-ci tire profit des 5 paramètres :  $K$ ,  $N$ ,  $k$ ,  $\alpha$  et  $R$ .

# Chromatographie

## Analyse quantitative

# 1. Introduction

---

- L'analyse quantitative par chromatographie est très fiable ce qui a permis de l'utiliser dans des protocoles normalisés de dosages.
- Méthode comparatives (pas absolues) basée sur la reproductibilité des séparations.
- Il existe une relation linéaire entre la masse de l'échantillon injecté et l'aire (ou la hauteur) du pic.

**Important:** deux conditions sont nécessaires

- Disposer de l'étalon du composé que l'on veut doser pour déterminer la sensibilité du détecteur.
- Disposer d'un moyen pour déterminer les aires des pics (hauteurs).

## 2. Relation quantité injectée – aire du pic

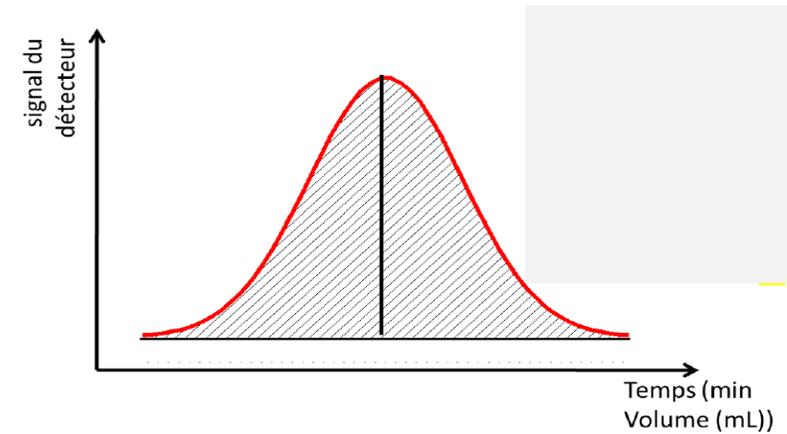
Le signal du détecteur est proportionnel à la quantité d'analyte en sortie de la colonne:

$$m_i = K_i A_i$$

$m_i$  : masse du composé  $i$  injectée dans la colonne

$K_i$  : coefficient de réponse absolu du composé  $i$

$A_i$  : aire du pic d'élution du composé  $i$



- Relation valable pour une gamme de concentration qui dépend du détecteur.
- Ne pas confondre  $K_i$  (coefficient de réponse) avec la coefficient de partage.
- Relation linéaire entre l'aire (ou la hauteur) du pic et la masse de l'échantillon injectée.

## 2. Relation quantité injectée – aire du pic

La mesure de l'aire d'un pic peut s'effectuer par :

- 1) intégration électronique
- 2) pesée du pic découpé
- 3) triangulation
- 4) par mesure de la hauteur des pics

$A = h \times \delta \times 1,066$     où:  $h$ : hauteur du pic et  $\delta$  : largeur à mi-hauteur

$$N = 5,54 \left( \frac{t_r}{\delta} \right)^2$$

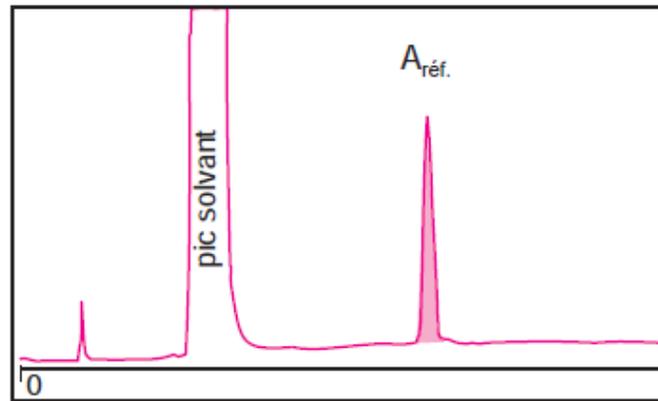
$$m_i = K_i \cdot A_i = K_i \cdot h_i \cdot \delta_i \cdot 1,066$$

$$m = K \cdot h \cdot \left( \frac{2,35 t_r}{\sqrt{N}} \right) \cdot 1,066$$

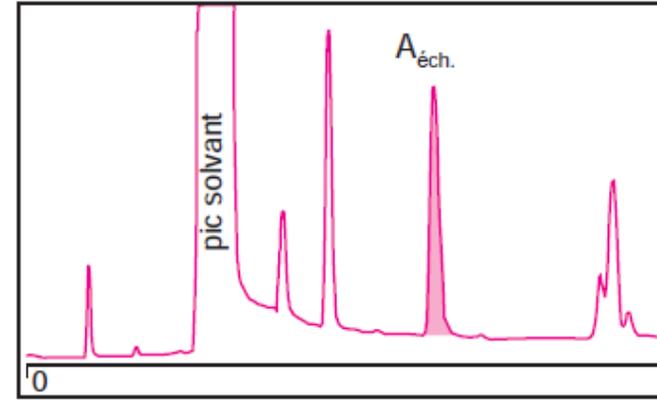
*Cette méthode n'est utilisable qu'avec  $t_r$  et  $N$  constants (débit parfaitement constant).*

## 2. Méthode de l'étalonnage externe

- Permet de déterminer la teneur (concentration ou pourcentage massique) d'un ou plusieurs constituants d'un mélange (même en présence de pics non résolus).
- Technique valable seulement avec une excellente qualité d'injection.



chromatogramme d'étalonnage ( $C_{ref.}$ )



chromatogramme de la solution à doser ( $C_{éch.}$ )

$$m_{ref} = C_{ref} \cdot V = K \cdot A_{ref}$$

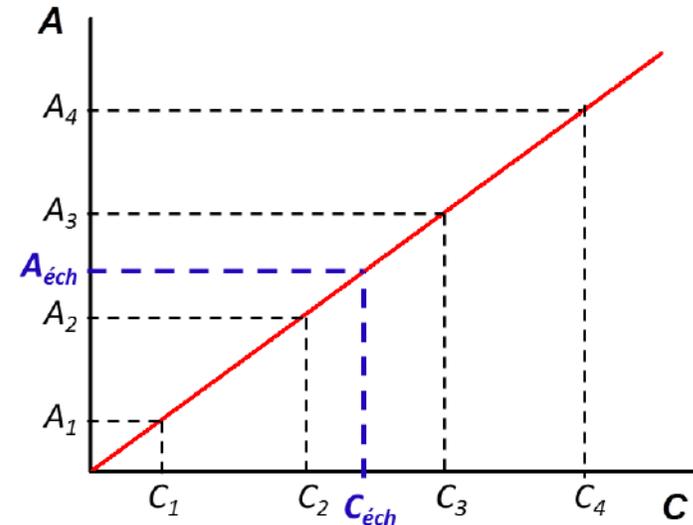
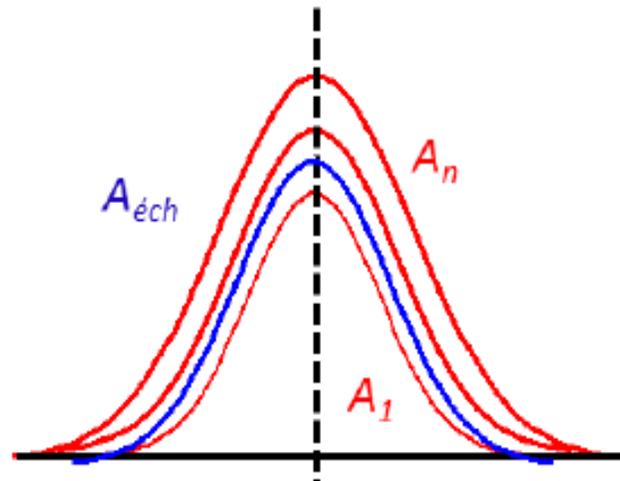
$$m_{éch} = C_{éch} \cdot V = K \cdot A_{éch}$$

$$C_{éch} = C_{ref} \frac{A_{éch}}{A_{ref}}$$

## 2. Méthode de l'étalonnage externe

### Courbe d'étalonnage: $A = f(C)$

- Étalonage possible avec un seul point de mesure (la droite d'étalonnage passe par l'origine).
- Étalonage multipoints est préférable pour améliorer la précision.



- Préparation d'une série de solutions étalons et mesure de l'aire (hauteur) des pics.
- Injection de l'échantillon de concentration inconnue.
- La concentration de l'échantillon doit être comprise dans la gamme des étalons.

### 3. Méthode de l'étalonnage interne

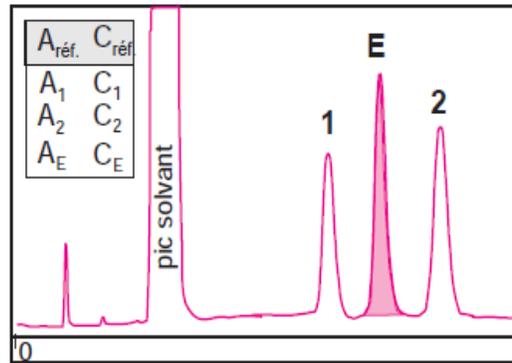
- Cette méthode repose sur l'utilisation du *coefficient de réponse relatif* de chaque composé à doser vis-à-vis d'une référence.
- Elle permet de s'affranchir de l'imprécision concernant les volumes injectés.

#### Etape 1 : Calcul des coefficients de réponse relatifs

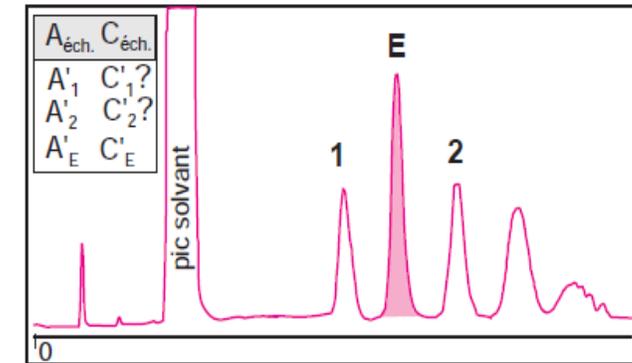
$$m_1 = K_1 \cdot A_1$$

$$m_2 = K_2 \cdot A_2$$

$$m_E = K_E \cdot A_E$$



chromatogramme d'étalonnage



chromatogramme de la solution à doser

$$\frac{m_1}{m_E} = \frac{K_1 \cdot A_1}{K_E \cdot A_E}$$

et

$$\frac{m_2}{m_E} = \frac{K_2 \cdot A_2}{K_E \cdot A_E}$$

$$K_{1/E} = \frac{K_1}{K_2} = \frac{m_1 \cdot A_E}{m_E \cdot A_1}$$

et

$$K_{2/E} = \frac{K_2}{K_E} = \frac{m_2 \cdot A_E}{m_E \cdot A_2}$$

$$K_{1/E} = \frac{C_1 \cdot A_E}{C_E \cdot A_1}$$

et

$$K_{2/E} = \frac{C_2 \cdot A_E}{C_E \cdot A_2}$$

### 3. Méthode de l'étalonnage interne

#### Etape 2 : Calcul des concentrations

La seconde étape consiste à analyser un volume de l'échantillon dans lequel on ajoute une quantité connue de l'étalon  $E$ . on aura alors :

$$\frac{m'_1}{m'_E} = K_{1/E} \frac{A'_1}{A'_E} \quad \text{et} \quad \frac{m'_2}{m'_E} = K_{2/E} \frac{A'_2}{A'_E}$$

À partir des  $K_{i/E}$  et de la concentration  $C_E$ , on calcule:

$$C'_1 = C'_E K_{1/E} \frac{A'_1}{A'_E} \quad \text{et} \quad C'_2 = C'_E K_{2/E} \frac{A'_2}{A'_E}$$

Et déduire sa teneur en %:

$$x_i \% = \frac{C'_i}{\text{Masse d'échantillon prélevée}} \times 100$$

### 3. Méthode de l'étalonnage interne

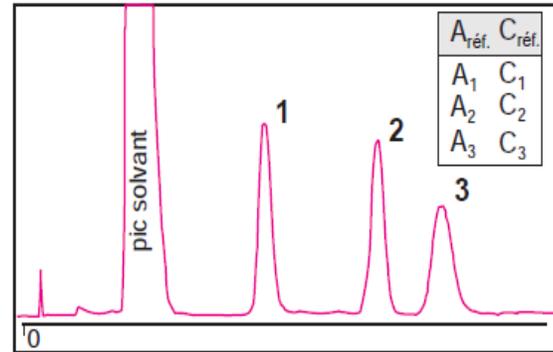
---

L'étalon interne doit avoir les caractéristiques suivantes:

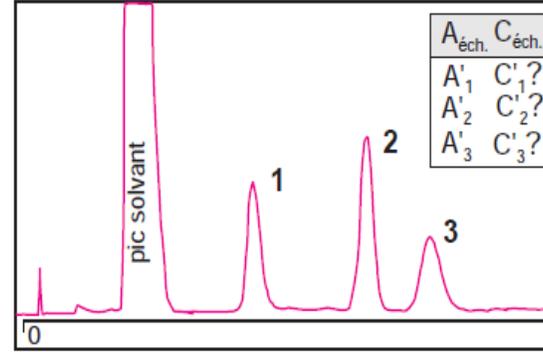
- il doit être pur et ne pas se trouver initialement dans l'échantillon ;
- son pic d'élution doit être bien résolu par rapport à tous ceux qui forment le chromatogramme;
- son temps de rétention doit être proche de celui (de ceux) du (des) soluté(s) à doser ;
- sa concentration doit être proche ou supérieure à celle des autres solutés pour être dans les conditions d'une réponse linéaire du détecteur ;
- il doit être inerte vis-à-vis des composés de l'échantillon.

## 4. Méthode par normalisation interne (100 % normalisée)

Cette méthode est réservée aux mélanges dont on a identifié tous les constituants afin de pouvoir faire le bilan complet de l'échantillon concerné.



chromatogramme d'étalonnage



chromatogramme de la solution à doser

### 1. Calcul des coefficients de réponse relatifs

$$K_{1/3} = \frac{K_1}{K_3} = \frac{m_1 \cdot A_3}{m_3 \cdot A_1} \quad \text{et} \quad K_{2/3} = \frac{K_2}{K_3} = \frac{m_2 \cdot A_3}{m_3 \cdot A_2}$$

$$K_{1/3} = \frac{C_1 \cdot A_3}{C_3 \cdot A_1} \quad \text{et} \quad K_{2/3} = \frac{C_2 \cdot A_3}{C_3 \cdot A_2}$$

#### 4. Méthode par normalisation interne (100 % normalisée)

##### Etape 2 : Calcul des concentrations

On aura directement la composition centésimale massique du mélange sous la forme :

$$x_i \% = \frac{K_{i/3} \cdot A'_i}{K_{1/3} \cdot A'_1 + K_{2/3} \cdot A'_2 + A'_3} \times 100 \quad (\text{avec } i = 1, 2, 3)$$

La condition de normalisation étant:  $x_1 + x_2 + x_3 = 100$ .

L'expression générale des facteurs de réponse:  $K_{I/J} = \frac{C_I \cdot A_J}{C_J \cdot A_I}$

La teneur du composé i dans l'échantillon est:  $x_i \% = \frac{K_{I/J} \cdot A'_i}{\sum_{I=1}^n K_{I/J} \cdot A'_I} \times 100$