

## Chapitre III : Analyse quantitative par chromatographie

Très fiable ce qui a permis son utilisation dans beaucoup de protocoles normalisés de dosage.

Méthode comparative basée sur la reproductibilité des séparations et la relation entre la masse injectée de l'analyte dans la colonne et l'aire du pic.

Informatisation des systèmes de collection des données permet l'automatisation des tâches de calcul.

Deux conditions :  
- disposer du composé que l'on veut doser à l'état de référence, pour déterminer la sensibilité du détecteur  
- disposer d'un moyen de déterminer les aires/hauteurs du pic d'élution

# 1 – Quantité injectée et aire du pic

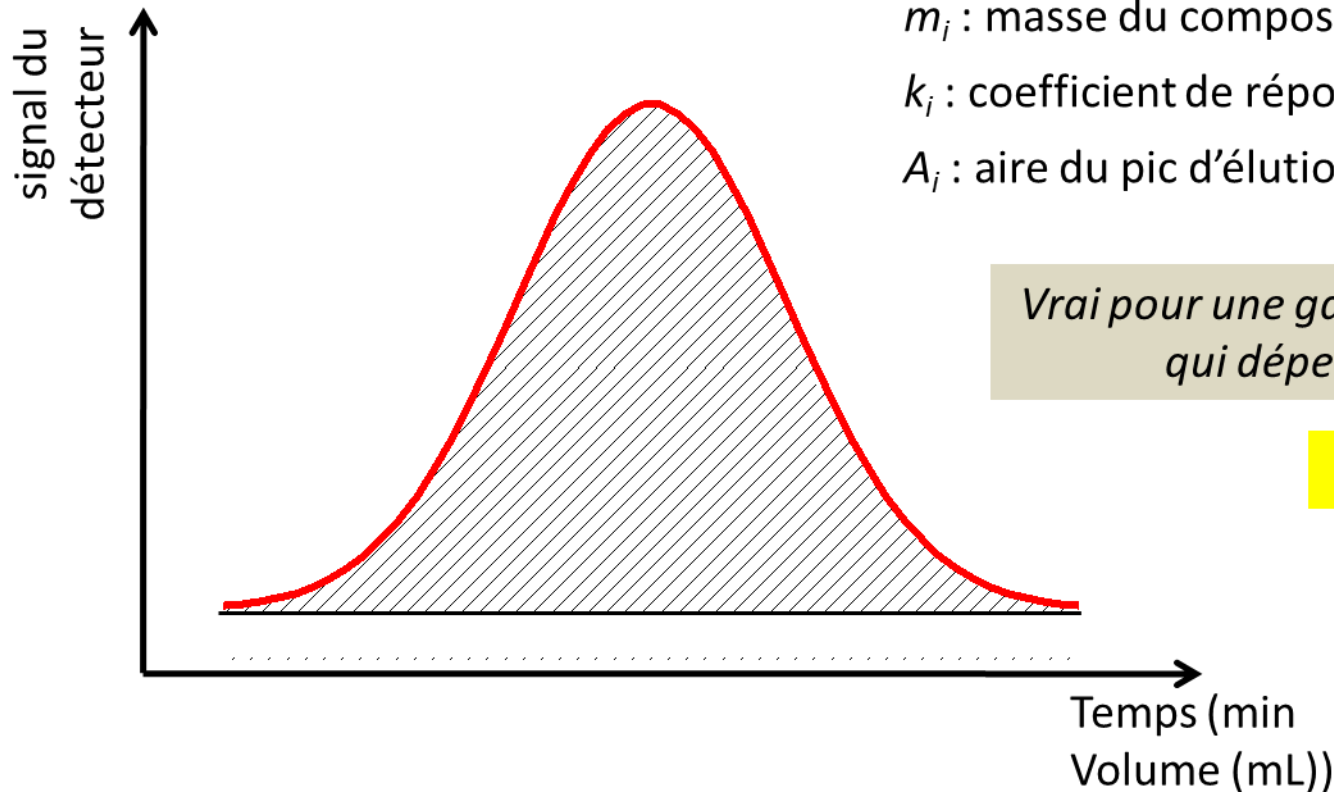
Le signal du détecteur est proportionnel à la concentration du soluté en sortie de colonne

$$m_i = k_i \cdot A_i$$

$m_i$  : masse du composé injecté

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

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



*Vrai pour une gamme de concentration qui dépend du détecteur*

$$k \neq K \neq k'$$

L'aire ou la hauteur du pic sont proportionnelles à la quantité injectée de soluté  
**Relation linéaire**

## 2 – Méthode de l'étalonnage externe

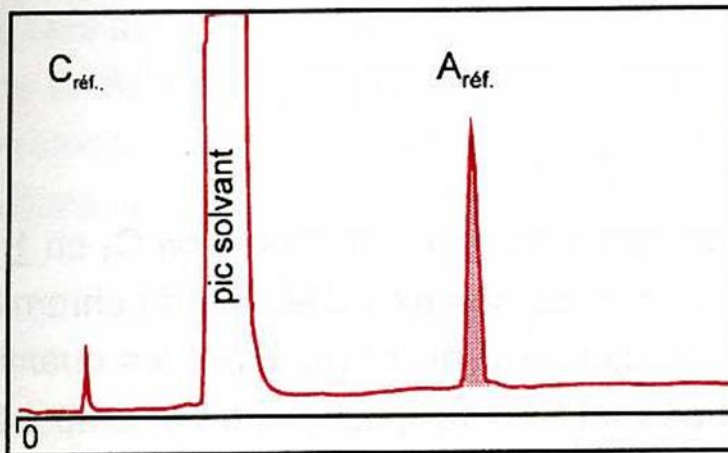
Permet de déterminer la teneur (concentration ou pourcentage massique) d'un ou plusieurs constituants d'un mélange, même en présence de pics non résolus.

Applicable quand le volume injecté est constant.

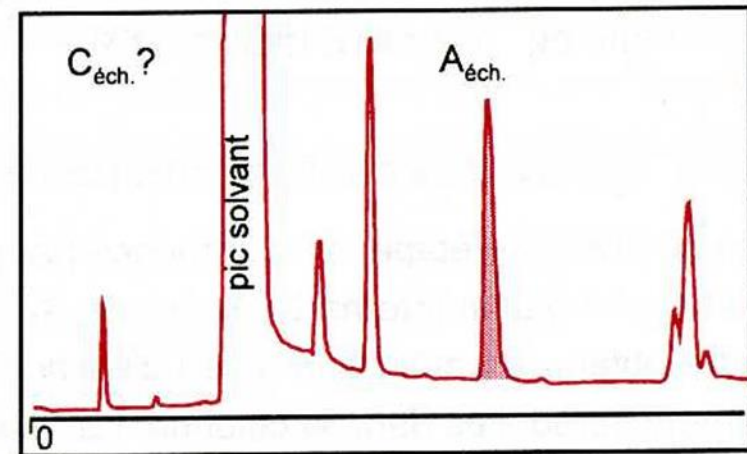
Comparaison de deux chromatogrammes obtenus dans les **mêmes conditions** d'analyse:

Chromatogramme d'étalonnage : injection d'un volume  $V$  d'une solution de référence ( $C_{\text{réf.}}$ ,  $A_{\text{réf.}}$ ).

Chromatogramme de l'échantillon : injection d'un volume  $V$  de la solution à doser ( $C_{\text{éch. ?}}$ ,  $A_{\text{éch.}}$ ). Le temps de rétention du composé à doser est **identique** à celui dans le chromatogramme d'étalonnage.



chromatogramme d'étalonnage ( $C_{\text{réf.}}$ )



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

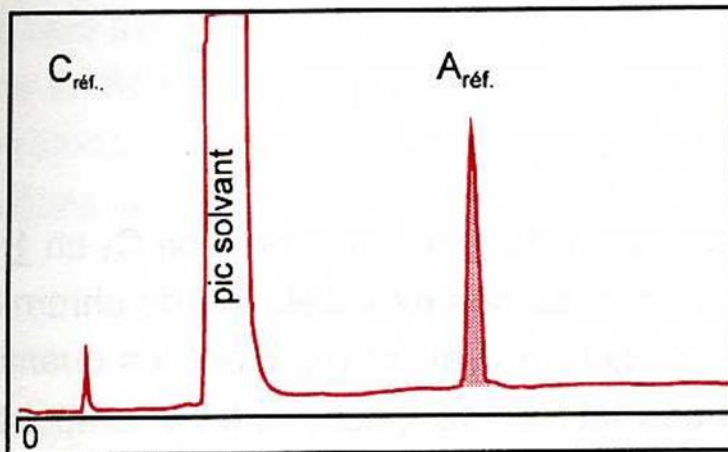
## 2 – Méthode de l'étalonnage externe

Permet de déterminer la teneur (concentration ou pourcentage massique) d'un ou plusieurs constituants d'un mélange, même en présence de pics non résolus.

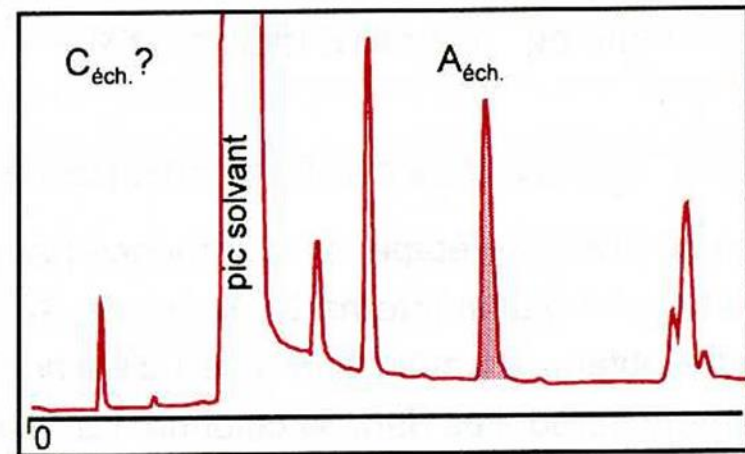
$$m_{réf} = C_{réf} \cdot V = k \cdot A_{réf} \qquad m_{éch} = C_{éch} \cdot V = k \cdot A_{éch}$$

V et k sont identiques,  $C_{éch}$  est l'inconnue

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



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



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

## 2 – Méthode de l'étalonnage externe

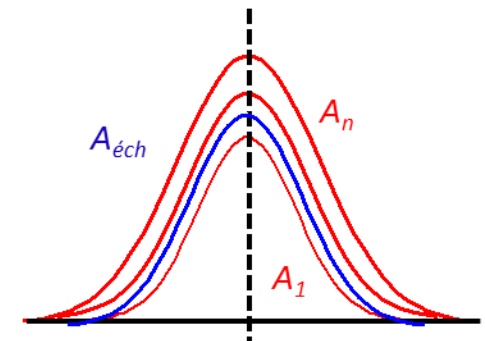
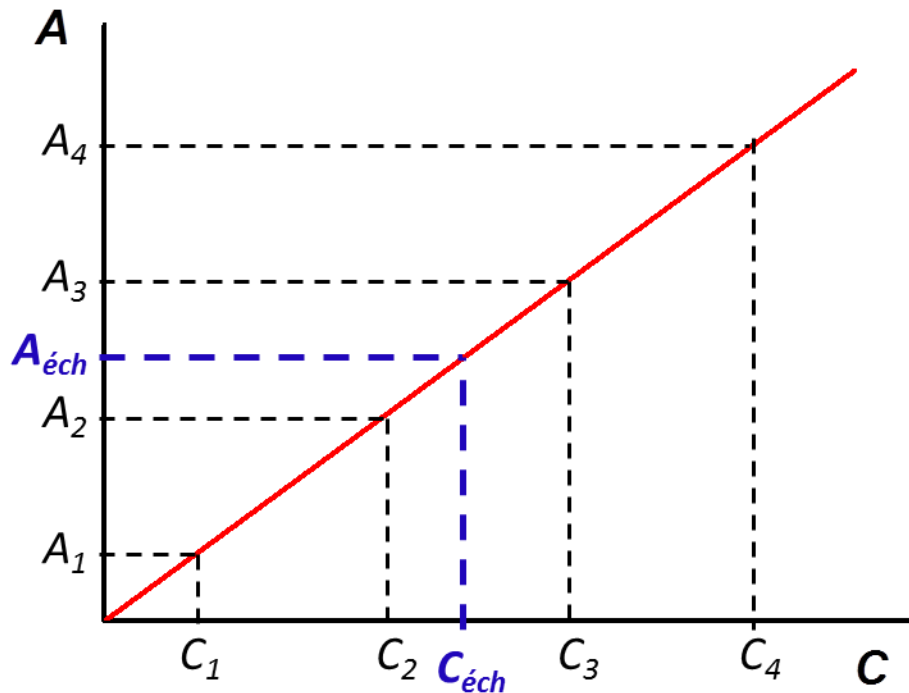
Précision du dosage est améliorée en calculant les aires moyennes obtenues à partir de plusieurs injections ou mieux, il est préférable de procéder à un étalonnage multi-points

*Courbe d'étalonnage* :  $A = f(C_{réf})$

a) On prépare des solutions contenant le soluté analysé à une concentration connue (solutions étalons):  $C_1, C_2, \dots, C_i, \dots, C_n$

On injecte chaque solution et on mesure l'aire du pic correspondant :  $A_1, A_2, \dots, A_i, \dots, A_n$

b) On injecte la solution inconnue d'échantillon:  $A_{éch}, C_{éch} ?$



$C_{éch}$  doit être comprise dans la gamme d'étalonnage

### **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'un marqueur introduit comme référence interne.

Permet de s'affranchir de l'imprécision des volumes injectés (notamment en CPG)  
Nécessite deux chromatogrammes, l'un pour calculer les coefficients de réponse, l'autre pour l'analyse de l'échantillon

### 3 – Méthode de l'étalonnage interne

#### 1. Calcul des coefficients de réponse relatif

On prépare des solutions de concentration  $C_1$  en 1, ...  $C_e$  en étalon interne

$A_1, \dots, A_e$  représente les aires obtenues à partir de prises d'essai  $m_1, \dots, m_e$  (quantité réellement introduites dans la colonne)

$$m_1 = K_1 \cdot A_1 \quad \dots \quad m_E = K_E \cdot A_E$$

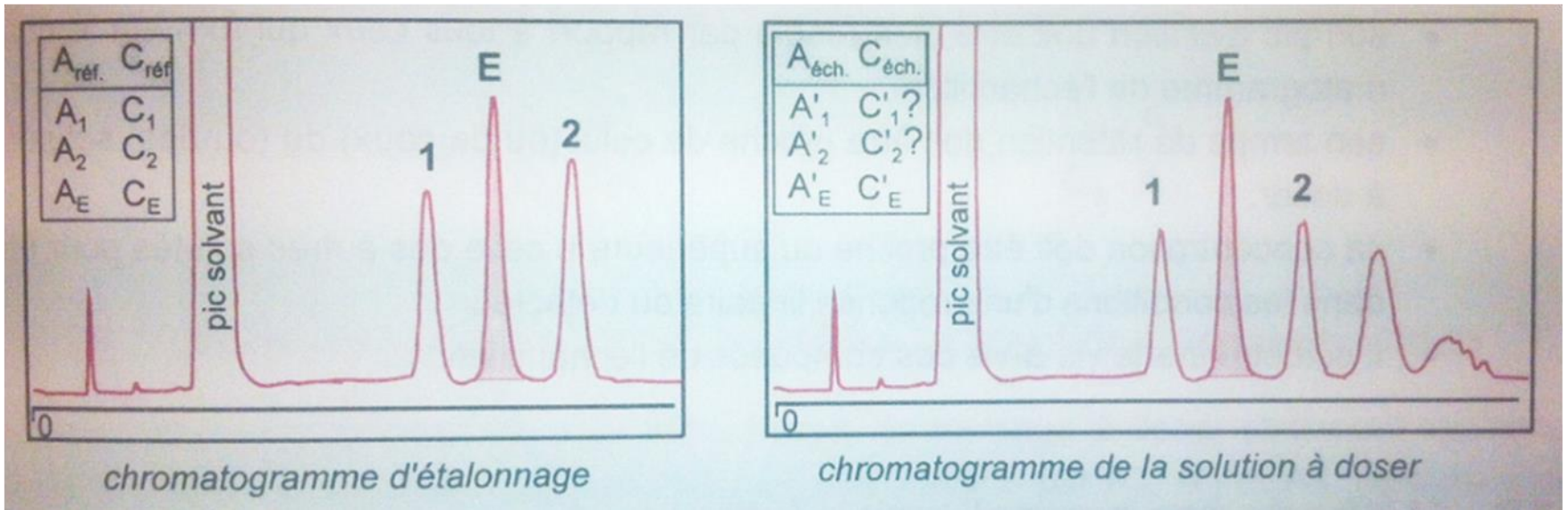
$$\frac{m_1}{m_E} = \frac{K_1}{K_E} \times \frac{A_1}{A_E}$$

$$K_{1/E} \frac{K_1}{K_E} = \text{Coefficient de rapport relatif de 1 vis-à-vis de l'étalon interne E}$$

### 3 – Méthode de l'étalonnage interne

Comme les masses réellement injectées sont proportionnelles aux concentrations massiques  $C_i$  ( $m_i = C_i \cdot V$ ) on obtient

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





### 3 – Méthode de l'étalonnage interne

#### 2. Calcul des concentrations

On analyse un volume quelconque d'une solution d'échantillon dans laquelle on a ajoutée une quantité connue d'étalon interne

$A'_1, \dots, A'_e$  représente les aires obtenues à partir de prises d'essai  $m'_1, \dots, m'_E$  (quantité réellement introduites dans la colonne)

$$\frac{m'_1}{m'_E} = \frac{K'_1}{K'_E} \times \frac{A'_1}{A'_E}$$

A partir des coefficients relatifs calculés précédemment ainsi que la concentration de l'étalon interne dans l'échantillon connue  $C'_E$

$$C'_1 = C'_E K_{1/E} \frac{A'_1}{A'_E} \qquad C'_i = C'_E K_{i/E} \frac{A'_i}{A'_E}$$

### 3 – Méthode de l'étalonnage interne

#### 2. Calcul des concentrations

On en déduit la teneur en échantillon exprimée en %

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

Etalon interne

- doit être pur et ne pas être présent dans l'échantillon initialement
- son pic d'élution doit être bien résolu
- son temps de rétention doit être proche de celui de l'échantillon
- Sa concentration doit être proche ou supérieure à celle de l'échantillon
- doit être inerte vis-à-vis de l'échantillon