

Analyse chimique

Méthodes et techniques instrumentales

10^e édition

Francis Rouessac

Professeur honoraire de l'IUT du Mans.

Annick Rouessac

Maîtresse de conférences de l'IUT du Mans.

Daniel Cruché

Professeur agrégé honoraire de l'IUT du Mans.

Arnaud Martel

Professeur à l'IUT du Mans.

DUNOD

Direction et conception graphiques de la couverture :
Nicolas Wiel et Elizabeth Riba (Graphiste)

Illustrations intérieures : *Francis Rouessac*

© Dunod, 1998, 2000, 2004, 2009, 2016, 2019, 2025
11, rue Paul Bert, 92240 Malakoff
www.dunod.com
© Masson, Paris, 1992 pour la 1^{re} édition
ISBN 978-2-10-088731-6



Table des matières

Avant-propos	XII
Introduction	1
Chapitre 1 Chromatographie, aspects généraux	3
1. La chromatographie analytique	3
2. Le chromatogramme	6
3. Pics gaussiens et pics réels	7
4. Modèle des plateaux	8
5. Coefficient (ou constante) de distribution de Nernst (K)	10
6. Efficacité d'une colonne	11
7. Grandeurs de rétention	14
8. Facteur de séparation (ou sélectivité)	16
9. Facteur de résolution	16
10. Influence de la vitesse de la phase mobile	17
11. Optimisation d'une analyse	21
12. Classification des techniques chromatographiques	22
13. Principe et relation de base	25
14. Logiciels de chromatographie	26
15. Méthode de l'étalonnage externe	26
16. Méthode de l'étalonnage interne	28
17. Méthode par normalisation interne	30
Chapitre 2 Chromatographie en phase gazeuse	38
1. Une installation de CPG	38
2. Gaz vecteur et régulateur de débit	40
3. Chambre d'injection	41
4. Enceinte thermostatée	46
5. Colonnes	46

6.	Phases stationnaires	49
7.	Principaux détecteurs	54
8.	Optimisation d'une séparation	60
9.	CPG « rapide » et microchromatographie	60
10.	Indices de rétention et constantes des phases stationnaires	62
Chapitre 3	Chromatographie liquide haute performance	74
1.	Conception d'un appareil de CLHP	74
2.	Pompes et gradients d'élution	76
3.	Injecteurs	79
4.	Colonnes	79
5.	Phases stationnaires	82
6.	Phases mobiles	89
7.	Colonnes particulières	92
8.	Principaux détecteurs	94
9.	Optimisation en CLHP	102
10.	Nouveaux développements de la CLHP	104
Chapitre 4	Chromatographie par échange d'ions	114
1.	Principe de base	114
2.	Phases stationnaires pour la CEI	117
3.	Phases mobiles	119
4.	Détecteur à conductivité	120
5.	Pic de l'eau et pic de système	121
6.	Le supprimeur d'ions de l'électrolyte	122
7.	Chromatographie par exclusion d'ions	125
8.	Analyseurs d'acides aminés	126
9.	Passage de la CEI à l'Ultra-CEI	127

Chapitre 5	Chromatographie planaire	133
1.	Mise en œuvre de la chromatographie planaire	133
2.	Particularités liées à la CCM	137
3.	Phases stationnaires	138
4.	Paramètres de séparation et de rétention	140
5.	CCM quantitative	141
Chapitre 6	Chromatographie en phase supercritique	148
1.	Rappel sur les fluides supercritiques	148
2.	Le dioxyde de carbone comme phase mobile	150
3.	Instrumentation	150
4.	Comparaison entre CPS, CLHP et CPG	152
5.	Séparation des énantiomères par CPS	153
6.	Autres applications de la CPS	155
Chapitre 7	Chromatographie d'exclusion stérique	160
1.	Principe de la CES	160
2.	Phases stationnaires et phases mobiles	162
3.	Instrumentation	164
4.	Domaines d'application	165
5.	Caractéristiques des polymères	166
6.	Fractionnement par couplage flux-force	171
Chapitre 8	Électrophorèse capillaire haute performance	177
1.	Le principe de l'électrophorèse	177
2.	Migration des analytes dans le capillaire	180
3.	Instrumentation	184
4.	Techniques électrophorétiques	187
5.	Performances	189
6.	Électrochromatographie	191

Chapitre 9	Spectroscopie d'absorption de l'ultraviolet et du visible	197
1.	Le domaine spectral de l'UV au très proche IR	197
2.	L'origine des absorptions	199
3.	Transitions électroniques des molécules organiques	201
4.	Groupe­ments chromophores	203
5.	Effets dus aux solvants	204
6.	Instrumentation dans l'UV/Visible	206
7.	Les différentes configurations des spectromètres UV/VIS	211
8.	Cellules et dispositifs de mesure	215
9.	Analyse quantitative : lois de l'absorption moléculaire	216
10.	Méthodes utilisées en analyse quantitative	220
11.	Méthodes de correction de ligne de base	226
12.	Distribution des erreurs relatives dues aux appareils	228
13.	Spectrométrie dérivée	229
14.	Colorimétrie visuelle par transmission ou réflectance	231
Chapitre 10	Spectroscopies d'absorption infrarouge et d'émission Raman	238
1.	Origine de l'absorption lumineuse dans l'infrarouge	239
2.	Présentation des absorptions dans l'infrarouge	239
3.	Bandes de vibration-rotation dans l'infrarouge	240
4.	Modèle mécanique des vibrations entre atomes	241
5.	Les composés réels	243
6.	Bandes caractéristiques des composés organiques	244
7.	Spectromètres et analyseurs infrarouges	247
8.	Sources et détecteurs dans le moyen IR	252
9.	Examen des échantillons	255
10.	Techniques couplées	260
11.	Comparaisons de spectres	263

12.	Analyse quantitative	264
13.	Analyse dans le proche infrarouge	266
14.	Principe de l'effet Raman	271
15.	Instrumentation	274
16.	Domaines d'applications	275
Chapitre 11	Spectroscopie de fluorescence et chimiluminescence	284
1.	Origine de la fluorescence	284
2.	Les composés fluorescents	288
3.	Relation entre fluorescence et concentration	289
4.	Diffusion Rayleigh et diffusion Raman	291
5.	Instrumentation	293
6.	Particularités et applications	298
7.	Chimiluminescence	300
Chapitre 12	Spectroscopie de fluorescence X	309
1.	Principe de base	309
2.	Le spectre de fluorescence X	311
3.	Sources d'excitation en fluorescence X	313
4.	Détection des rayons X	317
5.	Les diverses catégories d'instruments	319
6.	Préparation des échantillons	323
7.	Absorption des rayons X - densimétrie X	324
8.	Analyse quantitative par fluorescence X	324
9.	Applications de la fluorescence X	325
Chapitre 13	Spectroscopie d'absorption atomique	335
1.	Effet de la température sur un élément	335
2.	Application aux appareils actuels	338
3.	Dosages par SAA	339

4.	Instrumentation de base	340
5.	Perturbations physiques et chimiques	347
6.	Corrections des absorptions non spécifiques	350
7.	Sensibilité et limite de détection en SAA	353
Chapitre 14	Spectroscopie d'émission atomique	360
1.	Spectrométrie d'émission optique (OES)	360
2.	Principe de l'analyse par émission atomique	361
3.	Procédés pour dissocier l'échantillon en atomes ou ions	362
4.	Systèmes dispersifs et raies spectrales	366
5.	Appareils simultanés et appareils séquentiels	368
6.	Performances	372
7.	Applications de la spectrométrie d'émission atomique	374
8.	Photométrie de flamme	374
Chapitre 15	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire	381
1.	Généralités	381
2.	Interaction spin/champ magnétique pour un noyau	383
3.	Les noyaux qui peuvent être étudiés par RMN	384
4.	Théorie de Bloch pour $I = 1/2$	384
5.	Fréquence de Larmor	386
6.	Obtention du spectre par RMN impulsionnelle	388
7.	Les processus de relaxation des noyaux	392
8.	Le déplacement chimique	392
9.	Mesure des déplacements chimiques	393
10.	Noyaux blindés ou déblindés	394
11.	Facteurs affectant les déplacements chimiques	395
12.	Structure hyperfine – Couplages spin-spin	397
13.	Découplage de spin et séquences particulières	403

14.	RMN ^{13}C	404
15.	RMN bi-dimensionnelle (RMN-2D)	404
16.	RMN du fluor et du phosphore	409
17.	Applications de la RMN	410
Chapitre 16	Spectrométrie de masse	425
1.	Principes de base	426
2.	Introduction de l'échantillon	430
3.	Principaux procédés d'ionisation sous vide	433
4.	Procédés d'ionisation à pression atmosphérique	438
5.	Les analyseurs	441
6.	Détecteurs à ions	456
7.	Identification au moyen d'une spectrothèque	458
8.	Analyse de la composition élémentaire des ions	459
9.	Fragmentation des molécules organiques	462
10.	Analyse des protéines	466
11.	Couplage ICP-SM	467
Chapitre 17	Analyses isotopiques et méthodes de marquage	476
1.	Principe des méthodes par dilution isotopique	476
2.	Dosage par ajout d'un radio-isotope	477
3.	Dosage par ajout d'un isotope stable	479
4.	Mesure des rapports isotopiques d'un élément	480
5.	Dosages par marquage enzymatique	482
6.	Analyse par activation neutronique (NAA)	488
7.	Rappel sur les isotopes radioactifs	492
8.	Période τ , constante de radioactivité λ et activité A	492
9.	Molécules organiques marquées radioactives	493
10.	Détection et comptage de l'activité radioactive	494
11.	Précautions particulières	495

Chapitre 18	Analyseurs spécifiques	502
1.	Analyses particulières	502
2.	Analyse élémentaire organique	503
3.	Analyseurs d'azote total	506
4.	Analyseurs de soufre total	507
5.	Analyseurs de carbone total	509
6.	Analyseurs de mercure	509
7.	Spectrométrie de mobilité d'ions (<i>IMS</i>)	510
8.	Méthode volumétrique de Karl Fischer	512
Chapitre 19	Méthodes potentiométriques et ionométriques	522
1.	Cellules de mesure	522
2.	L'électrode pH	524
3.	Les électrodes ioniques sélectives (<i>EIS</i>)	526
4.	Méthodes de quantification	529
5.	Quelques applications	532
Chapitre 20	Méthodes voltampérométriques	538
1.	La méthode voltampérométrique	538
2.	L'électrode à goutte de mercure	540
3.	Polarographie à courant continu	541
4.	Le courant de diffusion	542
5.	Polarographie à impulsions	543
6.	Polarographie à courant alternatif	544
7.	Voltampérométrie à redissolution	546
8.	Dosages coulométriques	547
9.	Teneur en eau par la méthode coulométrique	548
10.	Détection voltampérométrique en CLHP et ECHP	550
11.	Capteurs ampérométriques	550

Chapitre 21	Traitement des échantillons	561
1.	La nécessité d'un traitement préalable	561
2.	Extraction en phase solide (SPE)	562
3.	Cartouches d'immuno-extraction	564
4.	Procédés de micro-extraction	565
5.	Extraction gazeuse sur colonne ou sur disque	566
6.	Espace de tête (<i>HEADSPACE</i>)	568
7.	Extraction par solvant à l'état supercritique	570
8.	Digesteurs à micro-ondes	571
9.	Analyseurs en ligne	571
	Table des constantes physico-chimiques	574
	Bibliographie	575
	Index	576

Avant-propos

Ce manuel est destiné à donner un ensemble de connaissances de base sur les méthodes les plus souvent rencontrées en analyse chimique, qualitative, quantitative et structurale, dans des secteurs aussi variés que constituent les industries chimiques, pharmaceutiques, agroalimentaires, ainsi que ceux de l'environnement et des réglementations diverses.

Les méthodes passées en revue dans cet ouvrage sont classées en *méthodes séparatives*, *méthodes spectrales* et *autres méthodes*. Chacune d'elles fait l'objet d'une étude qui s'appuie sur les idées de base pour se prolonger par les principales techniques instrumentales correspondantes. L'ensemble est illustré de schémas de principe, dessins et photographies, dont beaucoup s'inspirent d'instruments réels et de documents obtenus auprès des constructeurs. Afin de maintenir une taille raisonnable à l'ensemble de cet ouvrage, les méthodes plus rarement utilisées ou celles en évolution régressive, n'ont pas été traitées.

Rédigé clairement, le texte s'adresse à un large éventail d'étudiants des IUT (Départements chimie, mesures physiques, biologie appliquée . . .), des classes de techniciens supérieurs (BTS), de Licence et Master qui veulent compléter ou retrouver des connaissances de base, étudiées de manière fragmentaire. Ce livre devrait également être utile aux participants de cycles de formation continue, aux formations du CNAM et aux agents de maîtrise de l'industrie, confrontés aux problèmes d'analyse de composés chimiques ou qui ont l'intention de préparer des concours. Les besoins en analyse chimique dans des secteurs professionnels qui en étaient restés à l'écart, alliée au choix grandissant des techniques et instruments disponibles, justifient également l'information et la mise à niveau de nombreuses personnes.

Les connaissances requises pour aborder cet ouvrage correspondent à celles des étudiants en première année des premiers cycles universitaires. Les auteurs se sont donc limités au rappel des principes fondamentaux et ont tenu compte de l'évolution des connaissances des étudiants dont l'approche des phénomènes physiques et le bagage mathématique ont évolué. Le texte comporte un minimum de rappels théoriques sur les phénomènes concernés, afin de ne pas écarter une partie des lecteurs pour lesquels ce livre est destiné. Les intéressés pourront, si nécessaire, aborder ultérieurement la lecture d'ouvrages spécialisés, en ayant acquis avec ce livre une vision d'ensemble assez complète des méthodes actuelles et de leurs aspects pratiques.

Présenter plus d'une vingtaine de méthodes, avec des exercices (et leurs corrigés) sur environ 500 pages peut sembler un défi. C'est la raison pour laquelle, les auteurs ont préféré se limiter à la présentation des outils plutôt que de décrire tout ce que leur usage permet de faire. Seules les méthodes ont un caractère universel. Les applications ont donc été simplement choisies dans un but illustratif. Nous vous signalons qu'un chapitre supplémentaire traitant des paramètres statistiques de base est disponible sur le site des éditions Dunod (www.dunod.com).

Ce livre a pour origine le cours et les travaux dirigés proposés aux étudiants de l'IUT du Mans. Cette nouvelle édition a été actualisée et complétée, par rapport aux précédentes. Les 3^e, 5^e et 9^e éditions de cet ouvrage ont été traduites en langue anglaise. Elles ont pour titre *Chemical Analysis, Modern Instrumentation Methods and Techniques*, John Wiley & Sons, Ltd. (Chichester, 2002, 2007 et 2022). La 5^e édition a été traduite en langue espagnole. Elle a pour titre *Análisis Químico. Metodos y Técnicas Instrumentales Modernas*, McGraw-Hill Interamericana de Espana, S.A.U (2003). Les 6^e et 9^e éditions ont été traduites en coréen (Freedom Academy Pub Co).

Nous remercions Daniel Cruché, professeur agrégé retraité, et Arnaud Martel, professeur à l'IUT du Mans, qui ont collaboré à la relecture de certains chapitres et aidé à la rédaction de rubriques qui figurent dans cette nouvelle édition. Nous remercions également toutes les sociétés françaises et étrangères contactées, qui ont répondu favorablement à notre demande pour nous apporter des informations pratiques. Leur aide a été précieuse, car l'instrumentation analytique est un secteur qui s'imprègne sans retard des progrès technologiques dans des domaines très variés.

Enfin nos remerciements vont aussi à l'équipe éditoriale des Éditions Dunod avec qui il a été agréable de travailler et en premier lieu à Laetitia Jammet qui a lancé et mis en œuvre cette nouvelle édition.

Les auteurs expriment enfin leur vive reconnaissance au regretté professeur Guy Ourisson, ancien Président de l'Académie des Sciences, qui avait suivi l'évolution de cet ouvrage au travers de ses éditions successives depuis 1992 et nous avait fait le grand honneur d'en préfacier les premières éditions. Enfin nous exprimons notre profonde gratitude au regretté professeur Férey, Membre de l'Académie des Sciences, médaille d'or du CNRS, pour son aimable préface de la 7^e édition en 2009 dans laquelle il annonçait déjà la venue de la 8^e édition !

Le Mans, février 2025

F. Rouessac & A. Rouessac

Liste non exhaustive des sociétés qui ont aimablement accepté de fournir des renseignements et documents, dont certains sont reproduits dans ce livre :

AB-Sciex, Agilent Technologies, American Gas & Chemical Co., American Stress Technologies, Amptek Inc, Analytical Jena, ATI, Bio-Rad, Bosch, Bruker, Camag, Chrompack, Desaga, Dionex, Edinburgh Instruments, EG & G-Ortec, ETP Scientific, Eurolabo, Foxboro, Grasby-Electronics, Hamamatsu, Hamilton, Hellma-Analytics, Hitachi, HORIBA-Jobin-Yvon, Imaging Sensing Technology, Inficon, Jeol, Jenway, Kratos Analytical, Leeman Labs., Leybolds, Malvern, Merck, Metorex, Metrohm, Mettler-Toledo, Microsensor Technology, Ocean Optics, Oriel, Ortec, Oxford Instruments, Panalytical, Perkin-Elmer, PEsSciex, Pharmacia-Biotech, Philips, Photovac, Pike Technologies, Rheodyne, Rigaku, RTI, Safas SA, Scientec, Servomex, Shimadzu, Siemens, Specac, Starna Scientific Ltd., Supelco, Tekmar, Teledyne, Thermo Fisher Scientific, Thermo Jarrell Ash, Torion Technologies, Tosohaas, VG Instruments, Vidac, Waters, Wilmad, Wyatt Technology.

Introduction

La *chimie analytique* est une science proche de la chimie physique. Elle se rapporte à l'étude du comportement chimique et physique des composés purs ou en solution soumis à diverses conditions.

Elle est souvent perçue sous son aspect appliqué, ayant pour but l'identification, la caractérisation et la quantification des substances chimiques ainsi que le développement des méthodes nécessaires à cette analyse. Cet aspect réducteur de la chimie analytique n'est autre que l'*analyse chimique* qui est le sujet de cet ouvrage.

Son étude implique d'aborder des domaines de connaissances variés. Elle fait appel pour arriver au but recherché à beaucoup de notions dont certaines sont très éloignées de la chimie, au sens habituel de ce terme. C'est une science multidisciplinaire, de transfert, dont les retombées se font dans toutes les sciences expérimentales.

En analyse chimique, il est d'usage de distinguer deux catégories de méthodes. Le choix peut se faire entre des méthodes chimiques proprement dites, entraînant une spécificité réactive de l'*analyte* (le composé qui fait l'objet du dosage) avec des molécules réactives et des techniques physiques utilisant les propriétés physico-chimiques des analytes.

Ces secondes méthodes, dorénavant au premier plan, ont supplanté les méthodes traditionnelles, dites par voie humide, très limitées dans leurs performances, à l'origine du terme de *chimie analytique*. L'essentiel de l'ouvrage est donc consacré aux techniques modernes qui se sont fortement développées ces dernières décennies en relation avec l'essor de la miniaturisation des capteurs, de la numérisation des données et de la puissance informatique pour permettre l'usage d'outils mathématiques très performants avec un matériel de moins en moins encombrant. On peut prendre comme exemple la comparaison entre les imposants spectromètres Raman à enregistrement photographique des années 1960 et les spectromètres Raman de poche qui ont désormais leur emploi comme outils de contrôle dans de nombreux domaines.

Ainsi est née l'analyse instrumentale avec son formidable arsenal de procédés à l'origine d'appareils que l'on trouve souvent installés ailleurs que dans des laboratoires d'analyses traditionnels.

L'évolution des technologies a permis la réalisation d'instruments très performants, apportant des possibilités nouvelles, notamment avec l'introduction des méthodes couplées, des contrôles non-destructifs et du concept de *spéciation* (distinction des différentes structures dans lesquelles un élément peut être présent dans l'échantillon) — qui se contentent de petits échantillons ne nécessitant pas, ou très peu, de préparation préalable à la mesure. Parmi les tendances actuelles de l'analyse on observe aussi une augmentation des instruments miniaturisés, portables ainsi que des analyseurs spécifiques ou automatiques.

En général le principe de base consiste en la mesure d'une grandeur physique, suivi de l'établissement d'une relation simple entre cette grandeur — réponse de l'appareil — et la composition de l'échantillon en l'analyte à quantifier. La recherche de cette relation consiste le plus souvent en une linéarisation mathématique entre réponse de l'appareil et concentration de l'analyte. Cette linéarisation peut être simple et directe : réponse proportionnelle à la concentration ou plus complexe.

Quel que soit l'outil utilisé pour établir la relation entre le signal et la concentration, on aura à déterminer les limites de quantification, en deçà de laquelle tout essai de quantification est utopique et limite supérieure au-delà de laquelle l'usage de la relation est vain.

Pour mener à bien ces études l'analyste doit être non seulement formé aux différentes techniques, mais connaître les concepts de base de la chimie, sachant qu'il arrive souvent qu'un composé puisse être dosé par des méthodes différentes. Choisir une bonne méthode et si possible la meilleure, exige la connaissance de beaucoup de paramètres. Ainsi lorsqu'un nouvel objectif d'analyse a été défini, le problème doit être abordé méthodiquement. On doit d'abord faire le *choix de la méthode* : méthode spectroscopique, électrochimique, séparative... Puis vient le *choix de la technique* suivi du *choix du procédé* relatif au prélèvement et au traitement préalable à faire subir à l'échantillon. Enfin il faut établir un *protocole*, la « recette du dosage », généralement un processus faisant l'objet de normes définies (AFNOR), ce qui conduit au mode opératoire retenu. Cette normalisation porte sur la standardisation des étapes, de la préparation de l'échantillon à la conduite des mesures. Les résultats, enfin, doivent être établis suivant les normes en vigueur, et les données brutes de l'analyse conservées sous forme d'un fichier informatique qui ne peut être modifié. Toute cette approche fait l'objet de textes officiels connus sous le nom des Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL).

Pour conseiller la meilleure méthode afin de résoudre le problème d'analyse, il existe une science, appelée *chimométrie*. Elle a pour but de venir en aide à l'analyste, en fonction des impératifs exigés et selon plusieurs orientations : plan d'échantillonnage minimum, méthodologie appropriée, traitement des données et interprétation des résultats. En s'appuyant sur l'outil informatique, elle cherche à apporter une réponse correcte par exploitation des résultats au moyen des méthodes statistiques afin de réduire le nombre d'essais pour les analyses longues ou coûteuses.

Ainsi, les utilisateurs peuvent acquérir des appareils qui répondent aux normes de précision et de qualité nécessaires pour accéder à la certification ou encore faire reconnaître officiellement la qualité des résultats d'un laboratoire. Ces procédures d'accréditation sont désormais imposées par les nombreux organismes de contrôle des pays.

La chimie analytique est donc indispensable dans de nombreux secteurs autres que ceux, traditionnels, de la chimie ou de la parachimie. Elle est présente dans des secteurs aussi variés que le médical, l'agroalimentaire, la biochimie, l'environnement (pollutions), la sécurité (explosifs, drogues, matières chimiques), l'art. De plus en plus présente au sein des activités humaines, tout un chacun peut en bénéficier.

Chromatographie, aspects généraux

Introduction

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants de mélanges variés, utilisée en analyse à des fins d'identification et de quantification. Le principe de base repose sur les équilibres de concentration qui apparaissent lorsqu'un composé est mis en présence de deux phases non miscibles. L'une, dite stationnaire, est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support plan et l'autre, dite mobile, se déplace au contact de la première. Par un bon choix des deux phases, les composés présents dans un mélange sont généralement entraînés à des vitesses différentes, ce qui provoque leur séparation. Ce procédé hydrodynamique en perpétuelle amélioration depuis sa découverte est devenu une méthode analytique instrumentale qu'aucun laboratoire analysant des composés moléculaires ne peut ignorer, tant les applications sont nombreuses.

Objectifs

Rappeler le principe de la chromatographie

Distinguer séparation et analyse par chromatographie

Expliquer le protocole d'une analyse chromatographique

Exploiter un chromatogramme et en modéliser les signaux

Exposer les différentes grandeurs de rétention

Compléter par l'aspect hydrodynamique d'une séparation

Définir les paramètres qui influent sur l'efficacité d'une séparation

Classer les différentes techniques de chromatographie

Décrire les étapes d'un dosage par chromatographie

1 La chromatographie analytique

La chromatographie est un procédé physico-chimique de séparation, au même titre que la distillation, la cristallisation ou l'extraction fractionnée, des constituants d'un mélange homogène liquide ou gazeux. Les applications de ce procédé sont donc potentiellement

très nombreuses, d'autant plus que beaucoup de mélanges hétérogènes ou sous forme solide peuvent être mis en solution par emploi d'un solvant (celui-ci apparaissant comme un composé supplémentaire).

L'expérience de base en chromatographie peut être décrite comme suit (fig. 1.1) :

1. On immobilise dans une *colonne* un solide finement divisé appelé *phase stationnaire*.
2. On place en tête de colonne une petite quantité de l'*échantillon* à séparer.
3. On force cet échantillon à traverser la colonne de son entrée vers sa sortie au moyen de la *phase mobile* afin d'entraîner ses divers constituants. Si les composés présents migrent à des vitesses différentes, ils pourront être recueillis séparément en sortie de colonne, chacun en solution dans la phase mobile.

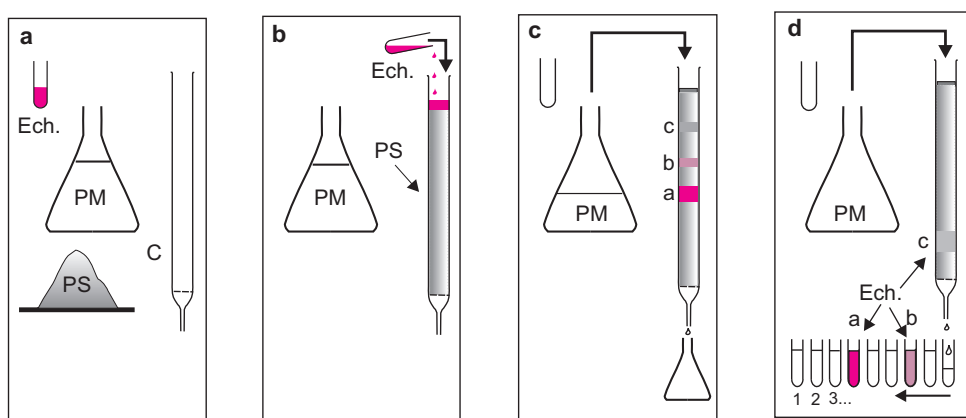


Figure 1.1 – L'expérience de base en chromatographie.

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

En dehors de cette exploitation de la chromatographie qui perdure depuis son origine, ce procédé est devenu en soi une méthode d'analyse lorsqu'on eut l'idée de mesurer les temps de migration des composés dans la colonne pour les identifier. Pour cela il devenait indispensable de maîtriser certains paramètres (débits, température...) et il fallait placer en sortie de colonne un détecteur pour repérer les changements de composition de la phase mobile. Cette application de la chromatographie, dont le but n'est plus de récupérer les composés séparés mais de mesurer leurs temps de passage dans la colonne s'est développée lentement.

L'identification d'un composé par chromatographie correspond à une méthode comparative.

Pour identifier un composé, dont on ne sait s'il s'agit de A ou de B, par la méthode chromatographique, on compare son *temps de migration* à ceux des deux composés de

référence A et B, ceci, sans changer d'appareillage et en se plaçant dans les mêmes conditions expérimentales.

Dans une telle expérience de chromatographie analytique, on n'a pas effectué des séparations (il s'agit de produits purs) mais simplement repéré des temps de migration. Cependant il apparaît trois points faibles à cette méthode : le procédé est assez long de mise en œuvre, l'identification n'est pas absolue, et le contact physique entre l'échantillon et la phase stationnaire peut modifier ses propriétés à demeure, en particulier les temps de rétention.

Ce procédé particulier de fractionnement est né, sous sa forme moderne, au début du siècle dernier, des travaux du botaniste Michaël Tswett à qui on attribue également l'invention des termes de *chromatographie* et de *chromatogramme*.

La technique s'est considérablement améliorée depuis ses débuts. On dispose actuellement de chromatographes pilotés par des logiciels qui rassemblent autour d'une colonne performante et miniaturisée — pour pouvoir séparer des micro-quantités d'échantillon — tout un ensemble d'accessoires destinés à assurer la répétabilité des expériences successives par la maîtrise parfaite des différents paramètres de séparation. Pour des analyses successives d'un même échantillon, réalisées dans des conditions identiques à plusieurs heures d'intervalle, les temps de rétention sont reproductibles à la seconde près (fig. 1.2).

Chaque séparation effectuée donne lieu à un enregistrement particulier appelé *chromatogramme*, qui correspond au tracé des variations de composition de la phase éluée au cours du temps. Pour obtenir ce document particulier, il faut placer à l'extrémité aval de la colonne un *capteur*, appelé détecteur, dont il existe un grand nombre de variantes.

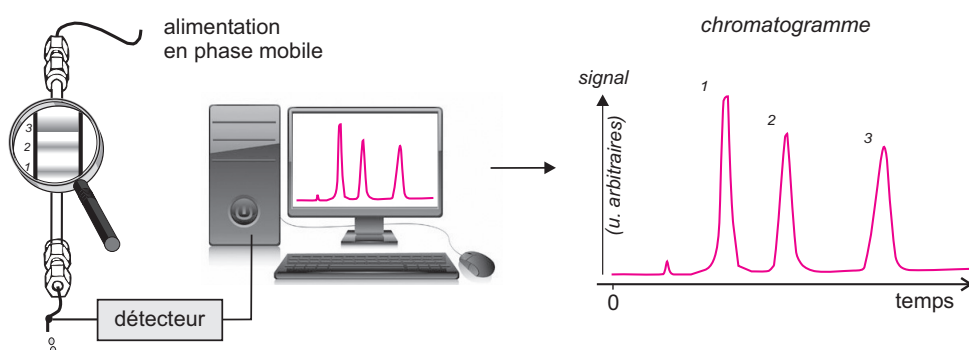


Figure 1.2 – Principe de l'analyse par chromatographie.

Le chromatogramme, passage obligé de toute analyse chromatographique, est obtenu à partir des variations en fonction du temps d'un signal électrique envoyé par le détecteur. Il est soit présenté en temps réel soit en différé à partir des valeurs instantanées numérisées et stockées. Les logiciels de chromatographie recalculent ces valeurs pour être mises au format désiré. Chromatogramme illustrant la séparation d'un mélange de trois constituants principaux. Noter l'ordre d'apparition des pics en correspondance avec la position de chaque constituant dans la colonne.

L'identification d'un composé moléculaire, à partir du chromatogramme, est quelquefois bien risquée. Une manière plus sûre consiste à associer deux techniques complémentaires. On réunit, par exemple, un chromatographe et un second appareil « en ligne », tel un spectromètre de masse ou un spectrophotomètre infrarouge. Ces méthodes couplées, du *second ordre* (ou *bidimensionnelles*) permettent de récupérer deux types d'informations indépendantes (temps de migration et « spectre »). On peut alors déterminer avec certitude la composition de mélanges complexes ou la concentration de certains composés à partir de quantités de l'ordre du nanogramme (analyses de confirmation).

2 Le chromatogramme

Le *chromatogramme* est une courbe qui traduit la variation au cours du temps d'un paramètre relié à la concentration ou à la quantité du soluté en sortie de colonne (fig. 1.3). Le temps (ou très rarement le *volume d'élution*) est porté en abscisse, l'origine des temps coïncidant avec l'introduction de l'échantillon dans le système d'injection. La réponse du détecteur est portée en ordonnée. La *ligne de base* correspond à la réponse du détecteur en dehors de tout passage de soluté. La séparation est complète entre deux composés quand le chromatogramme correspondant présente deux *pics chromatographiques* revenant chacun à la ligne de base.

Un constituant est caractérisé par son *temps de rétention* t_R , qui représente le temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui qui correspond sur le chromatogramme au maximum du pic qui lui est lié. Dans le cas idéal t_R est indépendant de la quantité injectée. Plus le temps de rétention est élevé, plus le pic est large.

Un constituant non retenu sort de la colonne au temps t_M , appelé *temps mort*¹ (désigné également par t_0). La différence entre le temps de rétention et le temps mort est désignée par le temps de rétention réduit du composé t'_R .

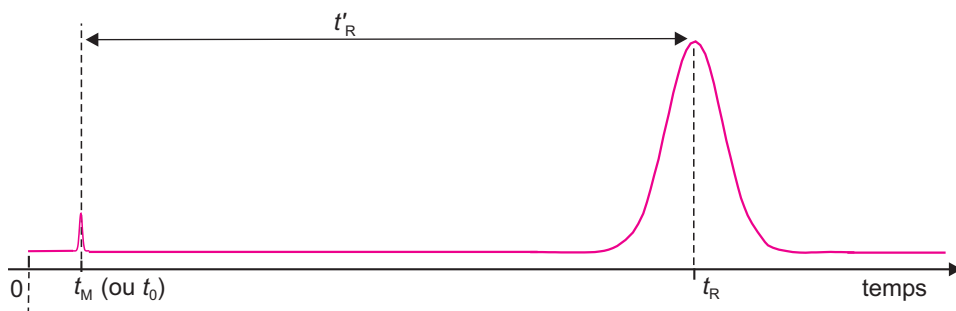


Figure 1.3 – Courbe d'élution en chromatographie.

Exemple de tracé de la fonction 1.1.

1. Les symboles utilisés suivent les recommandations de l'IUPAC – *Pure & Appl. Chem*, 65(4), 819, (1993).

En analyse quantitative on se contente le plus souvent de bien séparer du mélange le ou les constituants à doser. Si le signal envoyé par le capteur varie linéairement avec la concentration d'un composé, il en sera de même de l'aire du pic correspondant sur le chromatogramme.

3 Pics gaussiens et pics réels

Un pic d'élution idéal, sur un chromatogramme, a le même aspect que la représentation graphique de la loi Normale de distribution des erreurs aléatoires (courbe de Gauss 1.2). En conservant les notations classiques, μ correspond ici au temps de rétention et σ à l'écart type du pic d'élution (dont le carré symbolise la variance). y représente le signal, en fonction du temps x , du détecteur situé en sortie de colonne (fig. 1.4).

C'est pourquoi, afin de modéliser le signal d'un pic d'élution parfait d'un constituant, on utilise la fonction « densité de probabilité » (1.2).

L'expression 1.1 est la relation mathématique décrivant une fonction gaussienne quelle que soit la variable x . Dans cette expression, σ représente l'unité de largeur pour décrire le pic et μ correspond à l'abscisse de la position de l'axe de la courbe gaussienne (dans ce cas, le temps de rétention t_R). Si on fait correspondre l'axe de symétrie du pic avec la nouvelle origine des temps (μ ou $t_R = 0$) on obtient l'expression (1.2).

$$y = \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} \cdot \exp \left[-\frac{(x - \mu)^2}{2 \sigma^2} \right] \quad (1.1)$$

$$y = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \cdot \exp \left[-\frac{x^2}{2} \right] \quad (1.2)$$

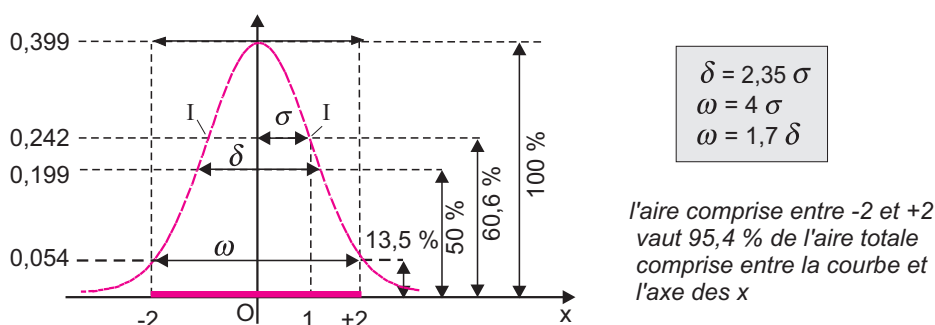


Figure 1.4 – Caractéristiques d'un pic chromatographique idéal.

Signification des trois paramètres classiques et résumé des caractéristiques d'une courbe de Gauss.

Cette fonction caractérise une courbe paire (maximum pour $x = 0$, $y = 0,399$) qui possède deux points d'inflexion pour $x = \pm 1$ (fig. 1.4), dont l'ordonnée est de 0,242 (soit 60,6 % de la valeur du maximum) et dont la largeur aux points d'inflexion est égale à 2σ , ($\sigma = 1$).

En chromatographie, δ désigne la largeur à mi-hauteur du pic ($\delta = 2,35 \sigma$) et σ^2 la variance du pic. La largeur « à la base » du pic, notée ω correspond à la base du triangle construit sur les tangentes aux points d'inflexion I de la courbe gaussienne. Elle est en fait mesurée à 13,5 % de la hauteur du pic. Pour des raisons d'homothétie, $\omega = 4 \sigma$.

Les pics chromatographiques réels sont parfois loin de l'aspect gaussien, pour plusieurs raisons. Il faut en premier lieu considérer que la demi-largeur du pic au point d'inflexion n'est pas seulement due à l'élution dans la colonne mais également à l'injection et à la détection, ce qu'on résume en posant l'expression suivante (1.3) :

$$\sigma_{tot}^2 = \sigma_{inj}^2 + \sigma_{col}^2 + \sigma_{det}^2 \quad (1.3)$$

où σ_{tot}^2 , σ_{inj}^2 , σ_{col}^2 , σ_{det}^2 sont respectivement la variance totale (celle observée expérimentalement), la variance due à l'*injection* (durée de l'injection, durée de la pénétration de l'échantillon dans la colonne), la variance due à la *colonne* (élution) et la variance due à la *détection* (volume mort entre sortie de colonne et détecteur, durée de réponse du détecteur...).

4 Modèle des plateaux

Depuis plus d'un demi-siècle, différentes théories visant à modéliser la chromatographie ont été et continuent à être proposées. Les plus connues sont les approches statistiques (théorie stochastique), le modèle des plateaux, et l'approche par la dynamique moléculaire.

Pour expliquer le mécanisme de migration et de séparation des composés dans la colonne, le modèle le plus ancien, ou *modèle des plateaux* de Craig, est une approche statique, jugée obsolète, mais qui permet de décrire de manière simple les séparations.

Bien que la chromatographie soit un phénomène continu, on considère dans le modèle statique de Craig que chaque soluté se déplace progressivement en une suite d'étapes distinctes. Le processus élémentaire est représenté par un cycle d'adsorption/désorption. L'enchaînement de ces étapes reproduit la migration des fluides dans la colonne, de même qu'un film de dessins animés donne l'illusion du mouvement par une suite d'images fixes. Chaque étape correspond à un nouvel état d'équilibre de *toute* la colonne.

Ces équilibres successifs sont à la base de la notion de *plateau théorique* selon laquelle la colonne de longueur L est découpée en N petits disques fictifs de même hauteur

H , numérotés de 1 à n . Pour chacun d'eux, la concentration du soluté dans la phase mobile est en équilibre avec la concentration dans la phase stationnaire de ce soluté. À chaque nouvel équilibre le soluté a progressé d'un petit disque supplémentaire dans la colonne, appelé *plateau théorique*.

La hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT ou H) est donnée par la relation (1.4) :

$$H = \frac{L}{N} \quad (1.4)$$

Cette approche fait appel aux règles de développement des polynômes pour calculer, au niveau de chaque plateau, les masses réparties entre les deux phases en présence.

Cette théorie a pour défaut de ne pas tenir compte de la dispersion due à la diffusion des composés dans la colonne.

Le terme de *plateau théorique* vient d'une approche ancienne décrivant la chromatographie en prenant pour modèle la distillation par Martin et Synge (prix Nobel de chimie en 1952). Ce terme ancré pour des raisons historiques n'a pas la signification physique de son homonyme servant à mesurer les performances d'une colonne à distiller. Il aurait peut-être été préférable de le baptiser par exemple du nom de Tswett !

Le temps total t_R de migration du soluté dans la colonne peut être séparé en deux termes : le temps t_M pendant lequel il est dissous dans la phase mobile et où il progresse à la même vitesse que celle-ci, et le temps t_S pendant lequel il est fixé à la phase stationnaire et où il est donc immobile. Entre deux transferts successifs d'une phase à l'autre, on admet que les concentrations ont le temps de se rééquilibrer.

La chromatographie fait intervenir au moins trois équilibres : soluté/phase mobile, soluté/phase stationnaire et phase mobile/phase stationnaire. Dans une théorie récente de la chromatographie, on ne parle plus de molécules immobilisées par la phase stationnaire mais simplement ralenties lorsqu'elles passent à proximité.

Divers phénomènes physiques peuvent faire apparaître une asymétrie du pic chromatographique. En particulier, il se produit une irrégularité de concentration dans la zone de dépôt de la substance en tête de colonne. De plus, la vitesse de la phase mobile est nulle au niveau de la paroi et maximum au centre de la colonne. L'asymétrie observée d'un pic est traduite par deux paramètres appelés, l'un le *facteur d'asymétrie* (F_a) mesuré à 10 % de la hauteur du pic et l'autre, le *facteur de traînée* (F_t) mesuré à 5 % de sa hauteur (pour la signification de a et b , voir fig. 1.5) :

$$F_a = \frac{b}{a} \quad (1.5)$$

$$F_t = \frac{a+b}{2a} \quad (1.6)$$

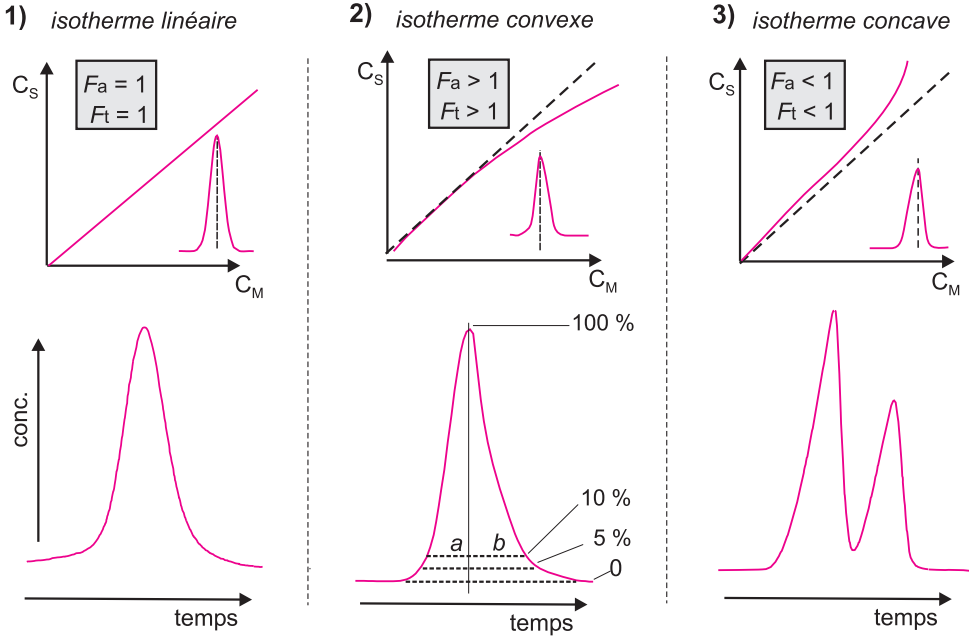


Figure 1.5 – Isothermes de distribution.

1) Situation correspondant à l'invariance de l'isotherme de concentration ; 2) situation pour laquelle la phase stationnaire est saturée — la montée du pic est plus rapide que sa descente ; 3) situation inverse : la phase stationnaire retient trop le constituant, le temps de rétention augmente, la montée du pic est moins rapide que sa descente. Pour chaque colonne, les fabricants indiquent quelle est sa capacité limite (en ng/composé) avant déformation du pic. Illustrations de ces trois situations à partir d'extraits de chromatogrammes réels.

5 Coefficient (ou constante) de distribution de Nernst (K)

K' est le paramètre physico-chimique de base en chromatographie qui quantifie le rapport de concentration de chaque composé entre les deux phases en présence.

$$K = \frac{C_S}{C_M} = \frac{\text{concentration du soluté dans la phase stationnaire}}{\text{concentration du soluté dans la phase mobile}} \quad (1.7)$$

Les valeurs de cette constante sont très variables. Plus elles sont élevées, plus le soluté est retenu. Elles dépendent, du moins pour la chromatographie liquide, de l'intensité de trois types d'interactions : phase stationnaire/soluté, phase mobile/soluté et phase mobile/phase stationnaire.

Comme toute constante d'équilibre, elle est fonction de la température. Elle est liée aux variations d'enthalpie libre (G), d'enthalpie (H) et d'entropie standard (S) de la réaction d'échange par les relations suivantes :

$$\Delta G_T^0 = -RT \ln K_T = \Delta H_T^0 - T \Delta S_T^0 \quad (1.8)$$

La détermination expérimentale de K_T à deux températures différentes permet de calculer ces variations, dans l'hypothèse où les variations d'enthalpie et d'entropie standard restent pratiquement les mêmes entre ces deux températures. On peut écrire :

$$\ln K_{T_1} = -\frac{\Delta H_T^0}{RT_1} + \frac{\Delta S_T^0}{R} \approx -\frac{a}{T_1} + b \quad (1.9)$$

Connaissant K_T à deux températures la relation 1.9 permet de calculer les termes a et b .

$$a = \frac{\Delta H_T^0}{R} \quad (1.10) \quad \text{et} \quad b = \frac{\Delta S_T^0}{R} \quad (1.11)$$

Généralement la variation d'enthalpie standard est négative. Il en est de même pour la variation d'entropie standard qui correspond à un gain d'ordre lorsque le soluté se fixe sur la phase stationnaire.

6 Efficacité d'une colonne

6.1 Efficacité théorique (nombre de plateaux théoriques)

À mesure que le soluté migre dans la colonne, il occupe une zone allant s'élargissant (fig. 1.6). Cette dispersion linéaire σ_ℓ , repérée par la variance σ_ℓ^2 croît avec la distance parcourue. Lorsque cette distance vaut L , longueur de la colonne, on pose :

$$\sigma_L^2 = H \cdot L \quad (1.12)$$

En rappel du modèle de la théorie des plateaux de distillation, cette approche conduit à la valeur de la *hauteur équivalente à un plateau théorique* H et au nombre N de plateaux théoriques ($N = L/H$).

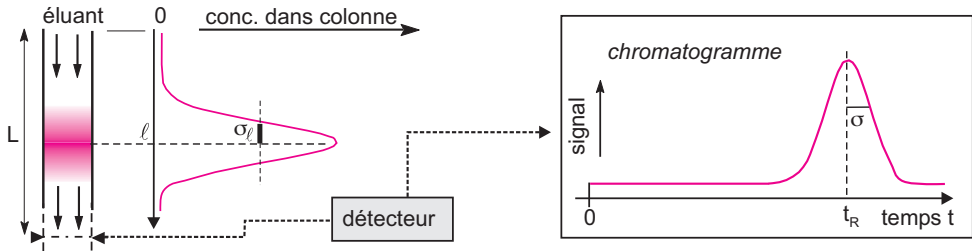


Figure 1.6 – Dispersion d'un soluté dans une colonne.

La courbe de gauche correspond à une image *isochrone* de la concentration du composé élué à l'instant considéré, et le chromatogramme de droite, à la variation de la concentration en sortie de colonne en fonction du temps. t_R et σ sont dans le même rapport que L et σ_L . L'efficacité N peut donc être calculée à partir du chromatogramme en mesurant σ directement. Sur le graphe ci-dessus on trouverait environ 100 plateaux théoriques.

Donc, pour tout chromatogramme, à partir du pic d'élution d'un composé, dont on pourra mesurer la variance au cours du temps σ^2 , ($\sigma = \sigma_L/v$ où v désigne la vitesse moyenne d'élution d'un soluté) on pourra calculer pour ce composé l'efficacité théorique N (1.13) en fonction du temps de rétention t_R et en déduire la valeur de H en sachant que $H = L/N$.

$$N = \frac{L^2}{\sigma_L^2} = \frac{L^2}{\sigma^2 v^2} = \frac{t_R^2}{\sigma^2} \quad (1.13)$$

Ces deux paramètres sont accessibles de manière indirecte à partir du pic d'élution du composé. On mesure t_R et σ dont le rapport a même valeur que celui de L et de σ_L (1.13).

Sur le chromatogramme, σ représente la demi-largeur du pic à 60,6 % de sa hauteur et t_R le temps de rétention du composé. t_R et σ doivent être mesurés dans la même unité (temps, distances ou volumes écoulés, si le débit est constant). Si on exprime σ en unités de volume (en faisant intervenir le débit), 4σ correspond au « volume du pic » équivalent au volume d'éluant contenant 95 % du composé initialement injecté. Par suite des propriétés de la courbe de Gauss ($\omega = 4\sigma$), il en résulte la formule 1.14. Les pics étant assez souvent déformés à la base, cette dernière est rarement employée : on utilise de préférence la formule équivalente (1.15).

N est un paramètre relatif, puisqu'il dépend à la fois du soluté et des conditions opératoires suivies. On choisit généralement un constituant qui apparaît en fin d'analyse chromatographique pour avoir une valeur repère, à défaut de savoir si la colonne permet de réussir une séparation donnée.

$$N = 16 \frac{t_R^2}{\omega^2} \quad (1.14) \qquad N = 5,54 \frac{t_R^2}{\delta^2} \quad (1.15)$$

Pour les pics asymétriques (ce qui est souvent le cas), on rencontre parfois la relation empirique 1.16 pour calculer l'efficacité de la colonne :

$$N = 41,7 \frac{\left(\frac{t_R}{\omega_{0,1}} \right)^2}{\left(\frac{a}{b} + 1,25 \right)} \quad (1.16)$$

$\omega_{0,1}$ désigne la largeur du pic mesurée à 10 % de la hauteur (fig. 1.5).

6.2 Efficacité réelle (nombre de plateaux théoriques effectifs)

Afin de comparer les performances de colonnes de conceptions différentes, vis-à-vis d'un même composé — c'était notamment le cas en CPG lorsqu'on voulait comparer les performances d'une colonne capillaire et d'une colonne remplie — on remplace le temps total t_R qui figure dans les expressions 1.13 à 1.15 par le *temps de rétention réduit*

t'_R (voir fig. 1.7) qui ne tient pas compte du temps mort t_M passé par le composé dans la phase mobile. Les trois précédentes expressions deviennent :

$$N_{eff} = \frac{t_R'^2}{\sigma^2} \quad (1.17) \quad N_{eff} = 16 \frac{t_R'^2}{\omega^2} \quad (1.18) \quad N_{eff} = 5,54 \frac{t_R'^2}{\delta^2} \quad (1.19)$$

Actuellement ces trois dernières relations ne sont plus de grande utilité.

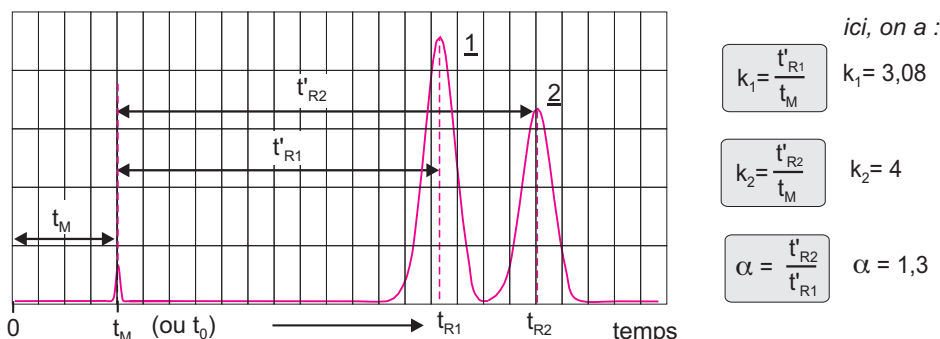


Figure 1.7 – Facteurs de rétention et de séparation (ou facteur de sélectivité) entre deux composés adjacents.

Chaque composé a un facteur de rétention qui lui est propre. α à lui seul, ne permet pas de savoir si la séparation est réellement possible. Sur cette figure, le facteur de séparation est d'environ 1,3.

6.3 Hauteur de plateau

La hauteur équivalente à un plateau théorique H a déjà été définie (formule 1.4). Ce paramètre est calculé pour des composés de référence car il permet de comparer des colonnes de longueurs différentes, bien qu'il ne s'agisse en aucune façon d'une constante. Sa valeur dépend du composé choisi et des conditions de l'expérience.

En chromatographie gazeuse, on a longtemps utilisé une valeur corrigée appelée *hauteur de plateau effectif* H_{eff} faisant intervenir l'efficacité réelle à la place de l'efficacité théorique.

Le calcul de H_{eff} à partir de l'efficacité réelle utilise l'expression 1.20 :

$$H_{eff} = \frac{L}{N_{eff}} \quad (1.20)$$

Hauteur de plateau réduite. En chromatographie en phase liquide pour des colonnes dont le remplissage est formé de particules sphériques, on rencontre assez souvent un autre paramètre, la hauteur de plateau réduite h qui tient compte du diamètre moyen $\bar{d}_p$ des particules. On élimine ainsi l'effet de la taille des particules afin de comparer des colonnes dont le diamètre moyen $\bar{d}_p$ est différent. Des colonnes de même hauteur de plateau réduite h conduisent à des performances voisines.

$$h = \frac{H}{\bar{d}_p} = \frac{L}{N \cdot \bar{d}_p} \quad (1.21)$$

7 Grandeurs de rétention

7.1 Temps de rétention

La définition du temps de rétention a été précédemment donnée dans le § 2.

7.2 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 $\mathcal{D}$ est stationnaire, on a :

$$V_R = t_R \cdot \mathcal{D} \quad (1.22)$$

Volume d'un pic, V_{pic}

Il correspond au volume de phase mobile dans lequel 95 % du soluté se trouvent dilués en sortie de colonne. Il est égal, par définition, à :

$$V_{pic} = \omega \cdot \mathcal{D} \quad (1.23)$$

7.3 Volume de la phase mobile dans la colonne (volume mort V_M)

Le volume de la phase mobile dans la colonne (encore appelé volume mort) V_M correspond au volume interstitiel accessible. Il peut être calculé à partir du 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 $\mathcal{D}$:

$$V_M = t_M \cdot \mathcal{D} \quad (1.24)$$

7.4 Volume de la phase stationnaire

Ce volume désigné par V_S n'est pas directement accessible à partir du chromatogramme. Dans les cas simples on le calcule en retranchant du volume total interne de la colonne vide le volume de la phase mobile. Une colonne, quelle qu'en soit sa conception, peut toujours être caractérisée par son *rapport de phase* β défini de la façon suivante :

$$\beta = \frac{V_M}{V_S} \quad (1.25)$$

7.5 Facteur de rétention k (ou de capacité)

Quand un composé de masse totale m_T est introduit dans la colonne, il se répartit en deux quantités : m_M dans la phase mobile et m_S dans la phase stationnaire. Si on ne change

pas les conditions opératoires, ces deux quantités demeurent constantes au cours de sa migration dans la colonne. Leur rapport, appelé *facteur de rétention*, est indépendant de la masse totale m_T :

$$k = \frac{m_S}{m_M} = \frac{C_S \cdot V_S}{C_M \cdot V_M} = K \frac{V_S}{V_M} = \frac{K}{\beta} \quad (1.26)$$

Le facteur de rétention k , encore appelé *facteur de capacité*, est un paramètre très important de la chromatographie. Ce n'est pas une constante, bien qu'il ne varie pas avec le débit ou la longueur de la colonne, car il dépend des conditions opératoires. k est dépendant par K (coefficient de distribution de Nernst) de l'intensité des interactions soluté – phase stationnaire et par β de la conception de la colonne.

Pour cette raison il est quelquefois désigné par k' au lieu de k .

Ce paramètre rend compte de la faculté plus ou moins grande de la colonne à retenir chaque composé (*capacité*). Dans la mise au point des séparations on fait en sorte que k ne dépasse pas 10, afin de ne pas trop allonger le temps d'élution des composés, — une bonne valeur de k se situant aux alentours de 5.

L'expression **facteur de capacité** présente une possibilité de confusion avec la **capacité** d'une colonne qui est la masse maximale de soluté que peut retenir la colonne sans être saturée. Ce facteur est donné par les constructeurs dans la description d'une colonne.

Approche expérimentale du facteur de rétention k . En s'appuyant sur le modèle de Craig, on imagine que chaque molécule d'un composé passe alternativement de la phase mobile (où elle progresse à la vitesse de celle-ci), à la phase stationnaire (où elle est alors immobile). Sa vitesse moyenne de progression est donc d'autant plus lente que le cumul des temps passés dans la phase stationnaire est plus grand.

Si on extrapole maintenant au cas de n molécules semblables de ce composé (l'échantillon de masse m_T), on admettra qu'à chaque instant, le rapport du nombre des n_S molécules fixées sur la phase stationnaire (masse m_S) et des n_M molécules présentes dans la phase mobile (masse m_M), est le même que celui des temps passés dans chaque phase pour une molécule isolée. Les trois rapports suivants ont donc même valeur :

$$\frac{n_S}{n_M} = \frac{m_S}{m_M} = \frac{t_S}{t_M} = k$$

Prenons le cas d'une molécule qui passe les 3/4 de son temps dans la phase stationnaire. Sa vitesse moyenne sera quatre fois plus lente que si elle restait en permanence dans la phase mobile. Par conséquent si 4 μg de composé ont été introduits dans la colonne, il y aura en moyenne et en permanence 1 μg dans la phase mobile et 3 μg dans la phase stationnaire.