

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CPG)

Généralités

- Technique de séparation applicable aux composés gazeux ou susceptibles d'être volatilisés par élévation de T°
- Limitée aux composés thermostables et suffisamment volatils ($MM < 300$)
- **Principales applications :**
 - analyse pétrochimique
 - industrie des arômes, des parfums
 - environnement
 - indus pharmaceutique → place ↓ au profit de la chromato liq
- **PM** = gaz = gaz vecteur
- **PS** (ds colonne) :
 - Sous forme de grains → colonnes remplies
 - ou de film déposé sur la paroi interne de la colonne capillaire ou semi capillaire
- **Echantillon :**
 - soit liq déposé sur support = chromato gaz/liq
méca = partage
 - soit solide = chromato gaz/solide
méca = adsorption
- **la rétention est fct° :**
 - de la nature de la **PS** (polarité)
 - de la **T°** de la colonne
 - PM = rôle passif (transport)

1 Appareillage

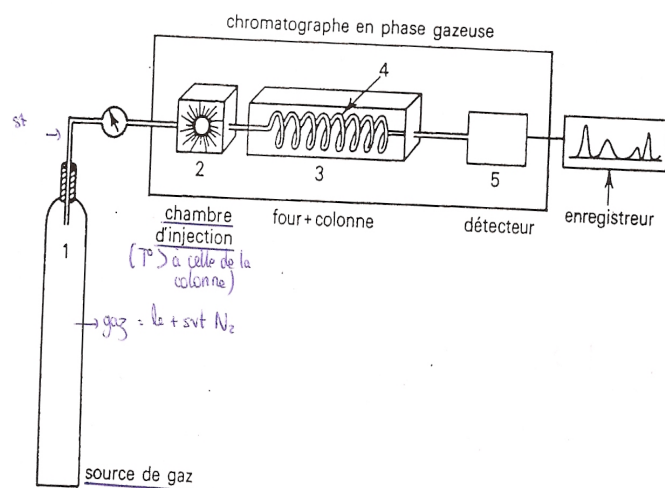
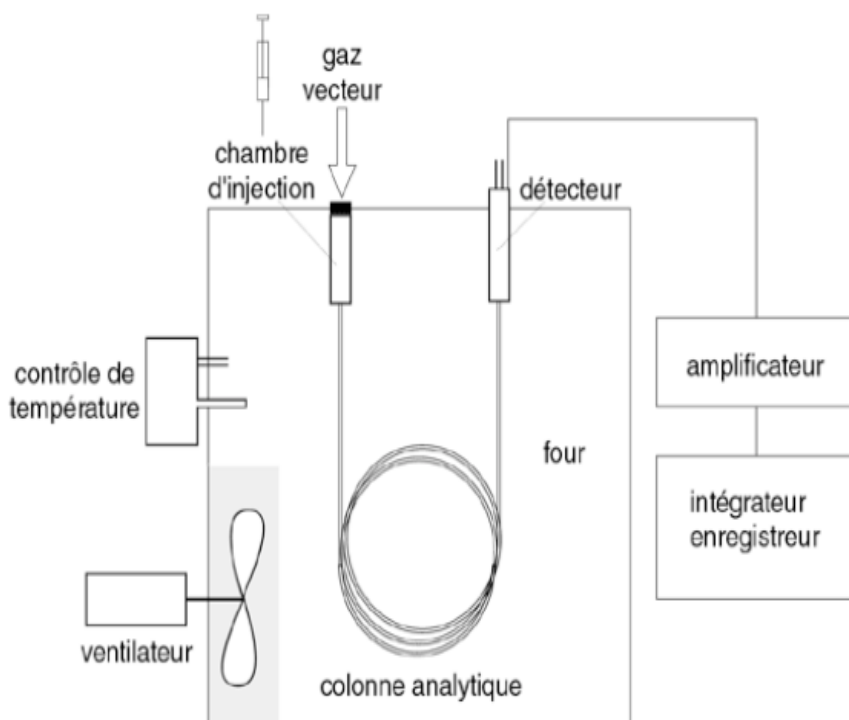


Fig.24 : Schéma d'un chromatographe en phase gazeuse

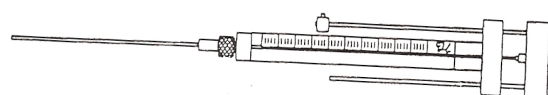


Fig.25 : Seringue utilisée en CPG (1 à 5 μL)

1.1 Source de gaz

- **Nature** : N_2 , He_2 , H_2 ++, Ar ou mélange argon/méthane.
- **Propriétés** : Pur, inerte avec le détecteur et l'éch, peu visqueux, bonne conductibilité thermique
- **Sous P°** (sécurité !), détendu sous 1 à 4 bar (via détendeurs)
- Paramètres essentiels pour la reproductibilité → la **régulation du débit**
 - **Régulation électronique** de façon à être à débit constant
 - 1 à 25 ml/min en fct° du détecteur et Ø de la colonne
 - Possibilité de faire une programmation du D° de gaz (pour améliorer le temps d'analyse)
- **Mesure du débit avec débimètre** (ex : à bulle de savon)
 - tubulure latérale en verre reliée à la sortie de la colonne
 - calcule le tps que met une bulle de savon pour parcourir x mm

1.2 Chambre d'injection

- L'injecteur doit vaporiser l'éch puis l'entraîner ds la tête de la colonne
- Chauffé à **30°C <colonne**
- **Si échantillon gazeux** :
 - seringue spéciale
 - injecteur à boucle
- **Si échantillon liq ou solide en solution** :
 - μ seringues (fig 25)
 - Injection de **1 à 5 μ l**
- **Types d'injection** ($\neq$ en fct du type de colonne) :
 - ❖ **Colonnes remplies** :
 - **injection par vaporisation directe** (fig 26) :
 - microseringue → septum → tt l'éch est vaporisé puis transféré ds la colonne par le gaz vecteur
 - utilisé pour colonnes remplies et semi capillaire.
 - injection par la technique de **l'espace de tête « headspace »**
 - pour **composés très volatils** : traces /matrice cplx, peu volatile
 - → dosage solvant résiduel ds Pa
 - éch ds flacon type antibio + bouchon transperçable, puis chauffage (60 à 80°) pdt tps donné (30' à 1H)
 - prélèvement, injection vap en eq avec éch
 - les composés volatils sont ds vap à une conc ↔ à celle ds le liq
 - technique quantitative : dosage /gamme d'étalonnage ds les même cdt°
 - ✓ sélective
 - ✓ ut pour doser arôme ds vin
 - méthode PE : **dosage des solvants résiduels /PA**
 - ❖ **Colonnes capillaires** :
 - **injection avec/sans division ou split/splitless** (fig 27)
 - seringues ,septum
 - split → gaz vecteur ds chambre de vap ; vanne de fuite : 1 à 10% pénètre ds colonne
 - splitless → pour solution **très diluées** ; vanne de fuite fermée (la solution injectée est volatilisée à chaud puis recondensée en tête de colonne à basse T°. Après élimination du solvant, les substances sont volatilisées par augmentation progressive de la T°).

- Injection à aiguille (injecteur de Ross) (permet l'élimination du solvant) : après dépôt à froid à l'extrémité d'une aiguille de verre et évaporation du solvant, la solution est introduite directement au sommet de la colonne. (système intéressant en CPG-SM)
- Injecteur « on column » (injection directe en tête de colonne capillaire refroidie)

1.3 Four

- Enceinte où est située la colonne
- Régulation T° au $1/10^{\text{ème}}$ de degré près → **Stabilité thermique !**
- **Ventilation** forcée en permanence → T° homogène
- Mode de travail : **isotherme** ou en **programmation de T°** (!! retour à la T° initiale doit être rapide)

1.4 Colonnes

→ Généralement enroulées en spires - il en existe de 3 types :

- **Colonnes remplies** :
 - de moins en moins ut (les + anciennes)
 - 3 à 5 m x 1 à 4 mm de $\varnothing$ interne
 - tube en **acier** inoxydable ou **verre** pyrex, contenant des grains
 - tube laisse trace métallique qui catalyse la réaction à chaud
 - grains : support imprégnés de 3 à 25% de ϕ s liq (partag G ou + rarement support seul)
- **Colonnes capillaires +++** (dite de Golay) :
 - 15 à 100 m (très longues) x 0.1 à 0.35 mm $\varnothing$ interne
 - **silice fondue** revêtue de polyimide à l'ext
 - PS = déposé sur la paroi interne de la paroi sous forme de :
 - **film liquide**+++ (partage G-L) → colonne WCOT
 - **solide** = part. poreuses imprégnées de PS (adsorption G-S) → colonne SCOT
 - NB : actuellement ,greffage chimique sur paroi de silice au lieu de dépôt de film
- **Colonnes semi capillaires = Mégabores =macrobores =ultrabores (bores =trous)**
 - 5 à 50 m x 530 μ m $\varnothing$ interne
 - aspect de colonne capillaire

Caractéristiques et avantage des colonnes capillaires ou semi capillaires :

	C. remplies	C. capillaires
Perméabilité	2.10^{-7} cm^2	100.10^{-7} cm^2
Volume ϕ m/ ϕ s	10 - 100	100 – 1000
h	0.5 à 1 mm	0.1 à 0.5 mm

NB : la perméabilité est proportionnelle au $\varnothing$ des particules dp^2 pour colonne remplies
au rayon r^2 pour colonne capillaires

◇ Perméabilité de $10^{-7} \leftrightarrow 10$ trous de $1 \mu\text{m}^2$

C. capillaire a une perméabilité $\sim 50 \times$ > à celle d'une C. remplie
→ perte de charge faible ,colonnes longues possibles ;N élevé

◇ vol C. capillaire > C. remplie → + de gaz vecteur (ϕ s)

→ analyse + rapide

mais faible capacité (on ne peut chargé trop la colonne → ut solutions très diluées

◇ h : hauteur équivalente d'un plateau théorique

$h = \text{Longueur colonne} / N$

+ colonne effi + h petit

→ bcp + faible avec C. capillaire car effi élevé → pic + étroit → meilleur résolution

NB : l'efficacité d'une colonne (nb de plateaux théoriques) augmente quand :

- Diamètre interne diminue
- Longueur augmente
(sinon changer de PS)

1.5 Phase stationnaire (PS)

→ Sont au cœur de la séparation chromatographique

➤ Liquide +++

- Imprégnées sur un support solide de silice / colonnes remplies (grande stabilité thermique ; inerte)
- Déposés sous forme de film / colonnes capillaires
- Caractérisée par :
 - Structure chimique
 - Polarité
 - Aptitude à dissoudre les molécules
 - T° max d'utilisation
- Nature :
 - 4 groupes :
 - Polyesters de glycols → PS polaire
 - Polyethers de glycol (Carbowax) → PS polaire
 - Silicones = polysiloxane → PS variable en fct du greffage
 - Carbures saturés → PS apolaire
 - Les polysiloxanes sont les + utilisés (huiles, gommes silicones)
 - avec substituants divers pour conférer des polarités $\neq$ tes (greffage)
 - Polarité variable en fct° de la ramification (n)

Si on diminue l'épaisseur du film :

- on augmente le rapport de phase : $\beta = V_g/V_l$
- on diminue la rétention du soluté
- on diminue le facteur de capacité
- on diminue la T° d'élution

→ csqce : il faut augmenter le nb de plateaux théoriques

Les films épais : séparent les composés à basse T°éb

Les films minces : séparent les composés à haut PM et T°éb élevée

➤ **Solide :**

→ Petites particules de granulométrie homogène :

- **Les tamis moléculaires** (cristaux d'aluminosilicates) → retient les molécules en fct de leur taille
- **Polymères poreux PORAPAK** (d' benzénique) → séparation des composés polaires à T°eb élevés (ex : alcool, amines...)

NB : Une diminution de **l'épaisseur de la PS** entraîne :

- une diminution de la rétention des solutés
- une diminution de k (intéressant si cp à T° d'élution élevée)
- une diminution de la T° d'élution

→ Il faut alors augmenter N pour avoir une Rs donnée.

1.6 Détecteurs

➤ Dans un bloc chauffé à **T° >30°C four**

➤ Le + courant = détecteur à **ionisation de flamme**

➤ Caractérisé par :

- Sélectivité (possibilité de détecter spécifiquement 1 ou pls composés)
- Sensibilité (limite de détection)
- Gamme de linéarité (proportionnalité réponse/concentration)
- Stabilité

a) Catharomètre (conductibilité thermique)

➤ **Conductibilité du gaz vecteur** est une cste qui ↓ en présence de m* étrangères

➤ 2 blocs métalliques thermostatés :

- 1 bloc de ref parcouru par un gaz vecteur en permanence
- 1 bloc de mesure parcouru par ce qui sort de la colonne

➤ Cavité avec filament thermosensible qui a une résistance R chauffée électriquement

➤ Electrodes = branches du pont de Wheastone

➤ Ds bloc de mesure :

- Qd pas de soluté → équilibre T° ds pont de Wheastone
- Qd présence de soluté → ↓ conductivité thermique, T° modifiée, résistance modifiée
 - le pont est déséq → on enregistre deseq de T°

➤ Avantage = détecteur universel, simple, non destructif

➤ **Inconvénient** = **peu sensible** (de l'ordre du µg), **non spécifique**

→ ut srtt pour l'analyse de gaz

b) Ionisation de flamme (ou FID) +++

➤ Courant gazeux sortant de la colonne arrive ds flamme (**H2** + air ou O2) à 2100°C placée entre 2 électrodes

➤ M* organiques brûlées ds flamme → **courant faible d'ion proportionnel au nbre de m* brûlées**

➤ Ces ions sont collectés entre 2 électrodes portées à une ddp de 10 à 300 volt

- L'une sert de polarisation (masse)
- L'autre sert d'anode et recueille le courant

➤ Ce courant est transformé et amplifié par électromètre en une **T° mesurée**

➤ Réponse : fct° des réglages α/H2 (∃ un optimum)
Variable pour chaque fct° organique

➤ **Avantages :**

- Détecteur quasi universel → répond à ttes les m* organiques (sauf formol et ac formique)
- très sensible (du μg au ng) → **détecteur par excellence en CPG**

➤ **Inconvénients :**

- Destruction de l'échantillon
- Non spécifique (tous les cp organiques)

c) Thermoionique (ou NPD)

- Même principe que la FID, mais présence d'un sel de métal alcalin de Rb ou Ce placé près de la flamme multiplie la réponse des composés azotés et phosphatés 200 à 500 x
→ céramique dopée avec sel ds l'axe de la flamme
- Détecte trace de **composés N ou P** qd composés matrice cplx
- Détecteur très sensible et sélectif pour **N** et **P**
- Utilisation :
 - Pour **pesticides organophosphorés** et m* azotées ds milieux bio
 - Médicaments azotés (**barbituriques, hydantoïnes, ATD...**)
- Sensibilité et sélectivité recherchée ds matrice cplx

d) Photométrie de flamme (FDP)

- composé **P ou S** ds flamme $\alpha\text{-H}_2$ réductrice (pour éviter la formation d'oxydes)
→ excitation et émission de lumière
- analyse l'nrj lumineuse à l'aide de filtres (P : 526 nm, S : 394 nm)
- très sensible et sélectif pour S et P
- analyse **des pesticides P et S** (sensibilité : ng-pg et sélectivité recherchée ds matrice complexe)

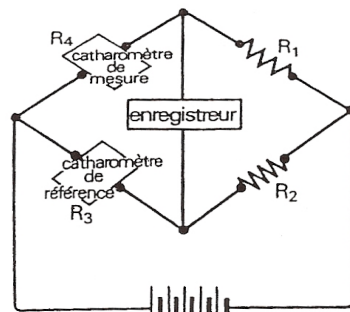
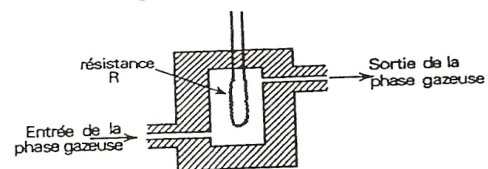


Fig.28 : Détecteur catharométrique en CPG

⇒ suit analyse d'gaz, peu utilisé

19



Qd $\emptyset$ soluté : équilibre, $\emptyset$ tension
Qd soluté élué : déséquilibre.

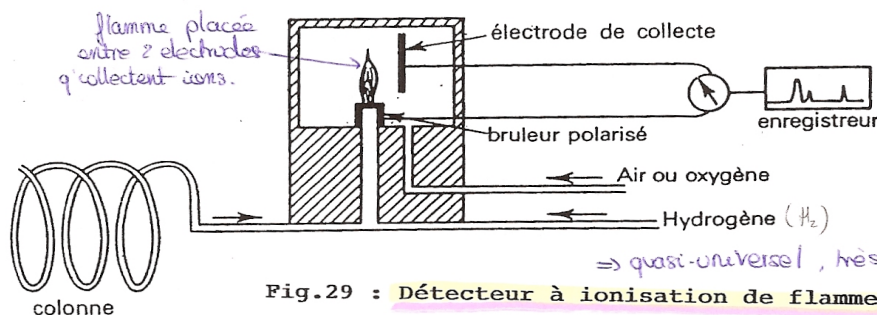


Fig.29 : Détecteur à ionisation de flamme en CPG

⇒ quasi-universel, très sensible

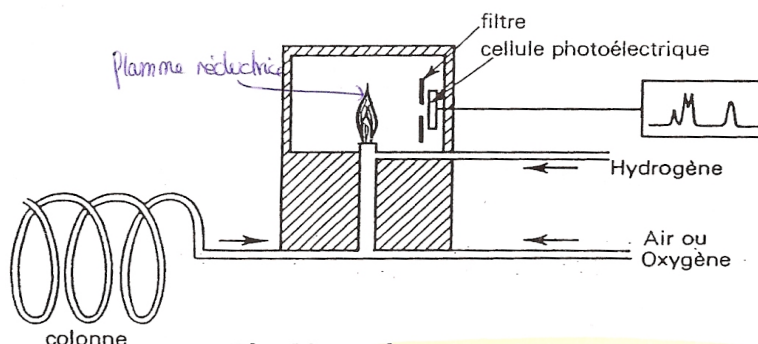
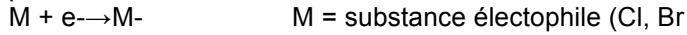
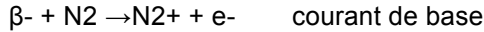


Fig.30 : Détecteur à photométrie de flamme en CPG

e) Capture d'e- (ECD)

- capacité de certaines molécules à capter les électrons émis par une source radioactive et de former des ions négatifs susceptibles de se combiner aux ions + du gaz vecteur → diminution du courant de base.

- source radioactive émettrice de rayonnement β - de faible nrj (Ni ou H) ionise le gaz vecteur selon relation :



→ enregistre signaux négatifs

le courant de base (collecté par électrodes) ↓ en présence d'une substance électrophile

gde pureté des solvants

pas de solvants chlorés ,pas de bouchon PVP...

réglementation particulière (localisation ,maintenance ,inspection)

•très sélectif et très sensible pour substances électrophiles

→ détecteur donnant info structurale

→ Intéressant pour le dosage des médicaments susceptibles de donner des dérivés fluoroacétylés

f) Spectrométrie de masse

- Identification des composés à partir du spectre de masse (SM) ,du spectre de fragmentation ,svt comparaison avec bibliothèque de spectre
- Technique d'ionisation = impact électronique
- Les colonnes capillaires en silice fondue permettent ce couplage
- Ce couplage CPG/SM est maintenant très répandu pour identifier solvant résiduel ds PA

g) IR

(IR moyen)

Permet identifier m^*

•peu sensible

•peu répandu

h) Emission atomique

i) Chimiluminescence

j) Détection de radioactivité

2 Mécanisme de rétention et optimisation en CPG

2.1 Règles de rétention

- Rétention des solutés en fct° de l'affinité vis-à-vis de la PS
- Eq PS/PM suivant 2 mécanismes :
 - adsorption G/S
 - partage G/L
- Eq caractérisé par cte de distribution :
 - **$K_d = C_s / C_m$**
 - dpd de la nature du soluté et de la PS

NB : PM = rôle passif en CPG

➤ **Règle de rétention :**

- PS apolaire :
 - force de dispersion (interaction)
 - ≠ ce ds ces forces reflétées ds les points d'ébullition
 - solutés **apolaires sont les + retenus et sortent ds l'ordre du point d'ébullition**
 - ✓ hexane (69°C) heptane (18°C) octane (126°C)
 - avec même point d'ébullition les solutés polaires sont les – retenus
 - ✓ propanol(1) heptane (2) T°eb=98°C
- PS polaire :
 - interaction dipôle-dipôle en + des forces de dispersion
 - **solutés polaires sont les + retenus (point d'eb svT – importants pour det rétention)**
 - avec même point d'eb les solutés peu polaire sont les – retenus
 - heptane (1) propanol (2) point d'eb 98°C

2.2 Optimisation de la séparation (Tr et largeur des pics)

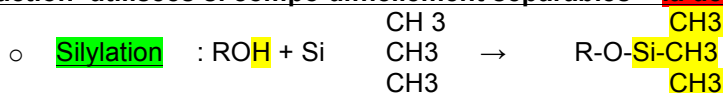
➤ **Optimiser la Sélectivité (α)**

- dépend de la **polarité de la PS**
 - on choisit une ϕ s qui donne des interactions =qui se ressemble ,s'assemble
- **T°** de séparation :
 - après avoir choisi la PS ,on fait varier la T° du four
 - qd T° ↑ α ↑ rétention ↓
 - Une ↑ de 20°C fait diminuer le Tr de moitié !

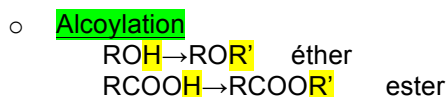
➤ **α ne dépend pas de :**

- la granulométrie de la PS
- l'épaisseur du film de liq qui recouvre PS
- du débit du gaz vecteur

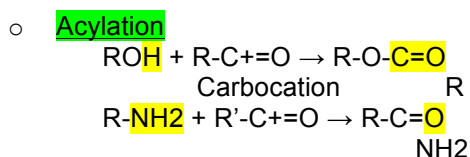
➤ **Réaction utilisées si compo difficilement séparables = la dérivation :**



- On fixe qpmT triméthyl silylé **TMS** sur composé à **H mobile** (alcool ,phénol)
- Entraine une baisse de la polarité et augmente la volatilité (et la stabilité)
- Mais risque de réaction incomplète -> mélange inexploitable en quantitatif



-Ut ds dosage des **AG** ds alim (point eb élevé (LH)



- **Utilisation de la « dérivation » si :**
 - Compo à T°eb trop élevée
 - Compo thermolabiles, ou instables à T° élevée
 - MM trop faible
 - Compo à forte polarité (pic larges)
 - Compo non détectables de façon sensible ou spécifique

NB : dérivation améliore la sensibilité et la spécificité si couplage CPG

2.3 Optimisation de la détection

- Réponse du détecteur :
 - Stabilité
 - Temps de réponse bref pour ne pas perturber la séparation des pics
 - Reproductibilité – fiabilité
 - Domaine de linéarité
 - Limite de détection – bruit de fond
- Nature de l'échantillon : choix du détecteur en fonction
- Couplage CPG-SM

2.4 Optimisation de la quantification

- Normalisation interne
- Méthode des ajouts dosés
- Etalonnage interne

3 Applications

- **Avantage :**
 - Capacité à séparer des constituants d'un mélange complexe
 - Rapidité d'exécution
 - Précision dans le dosage de petits échantillons
 - Possibilités d'automatisation
- **Limite :**
 - composé de **PM>300** → non volatilisables, substances ioniques thermolabiles
 - Injection directe pour les **solutés volatils** ou volatilisables
 - Injection après dérivation (transformation chimique) qd
 - T° d'eb trop élevée
 - trop polaire
 - thermolabile
 - détection peu sensible et peu sélective.
- **Utilisation de la CPG + couplage :**
 - Contrôle analytique pharmaceutique en industrie :
 - Contrôle des matières premières / impuretés, solvants résiduels
 - Contrôle en cours de fabrication de l'intégrité de la molécule
 - Contrôle du pdt fini / teneur
 - Etude de stabilité dans le temps / pdts de dégradation
 - Dosage en milieux biologiques (!! extraction et purification) :
 - Etudes de biodisponibilité

- Etudes métaboliques (identification /SM)
- Suivi thérapeutique au cours d'un ttt
- Dosage biochimiques (AA, stéroïdes → 17 céstéroïdes et oestrogènes)
- Dosage en toxicologie :
 - Recherche de toxique en intoxication aiguë (méthanol, EG...)
 - Dosage des drogues : amphétamines, opiacés, cannabinoïdes
 - Contrôle anti-dopage
 - Dépistage de toxicomanie
- Agroalimentaire :
 - Recherche et dosage des pesticides
 - Recherche et dosage et des nitrosamines (nitrites)
- Industrie chimique ,cosmétologie :
 - analyse des essences ,parfums ,arômes ,hydrocarbures