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)

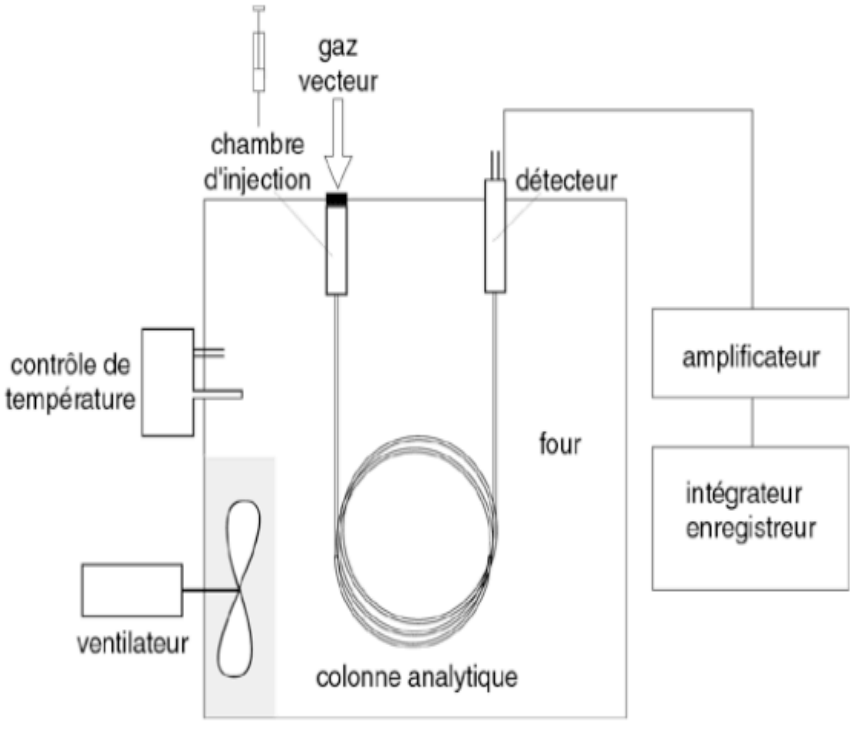
- **Principales applications** :
  - analyse pétrochimique
  - industrie des arômes, des parfums
  - environnement
  - indus pharmaceutique →place ↓ au profit de la chromato liq

- **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



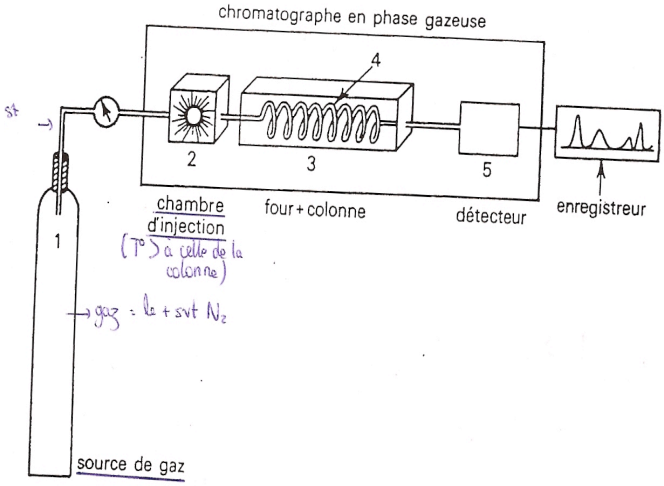


Fig.24 : Schéma d'un chromatographe en phase gazeuse

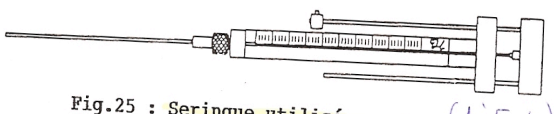


Fig.25 : Seringue utilisée en CPG (1 à 5 µL)

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'ech, 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'ech puis l'entraîner ds la tête de la colonne
- Chauffé à 30°C <colonne

- **Si echantillon gazeux :**
  - seringue spéciale
  - injecteur à boucle

- **Si echantillon liq ou solide en solution** :
  - µseringues (fig 25)
  - Injection de 1 à 5 µl

- **Types d'injection (**≠ en fct du type de colonne) :

  - **Colonnes remplies :**
    - *injection par vaporisation directe* (fig 26) :
      - microseringue → septum → tt l'ech 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 cplxe ,peu volatile
      - →dosage solvant résiduel ds Pa
      - ech ds flacon type antibio + bouchon transperçable, puis chauffage (60 à 80°) pdt tps donné (30' à 1H)
      - prélèvement, injection vap en eq avec ech
      - 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 : 1à10% pénètre ds colonne
      - splitless →pour solution très diluées ;vanne de fuite fermée (la solution injectée est volatalisée 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 1/10ème 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 Ø 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 φs 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 Ø 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 µm Ø interne
  - aspect de colonne capillaire

Caractéristiques et avantage des colonnes capillaires ou semi capillaires :

	C. remplies	C.capillaires
Perméabilité	2.10^-7 cm²	100.10^-7 cm²
Volume φm/φs	10 - 100	100 – 1000
h	0.5 à 1 mm	0.1 à 0.5 mm

NB : la perméabilité est proportionnelle au Ø des particules dp² pour colonne remplies
au rayon r² pour colonne capillaires

◊ *Perméabilité de 10^-7↔ 10 trous de 1 µm²*
C. capillaire a une perméabilité ~50 x > à celle d'une C. remplie
→perte de charge faible ,colonnes longues possibles ;N élevé

◊ *vol C. capillaire >C. remplie →+ de gaz vecteur (φs)*
→analyse + rapide
mais faible capacité (on ne peut chargé trop la colonne→ut solutions très diluées

◊ *h : hauteur équivalente d'un plateau théorique*
h=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 ≠tes (greffage)
      - Polarité variable en fct° de la ramification (n)

Si on diminue l'épaisseur du film :
- on augmente le rapport de phase : β=Vg/Vl
- 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

P301 du moniteur

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

NB : Une diminution de l'épaisseur de la PS entraine :
-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 → equilibre T° ds pont de Wheastone
  - Qd présence de soluté→↓ conductivité thermique ,T° modifiée ,résistance modifiée
    - le pont est déseq →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) Thermoïonique (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 cplxe
- Détecteur très sensible et sélectif pour N et P
- Utilisation :
  - Pour pesticides organophosphorés et m* azotées ds milieux bio
  - Médicaments azotés (barbituriques, hydantoines, ATD…)

- Sensibilité et sélectivité recherchée ds matrice cplxe

d) Photométrie de flamme (FDP)

-composé P ou S ds flamme α-H2 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)

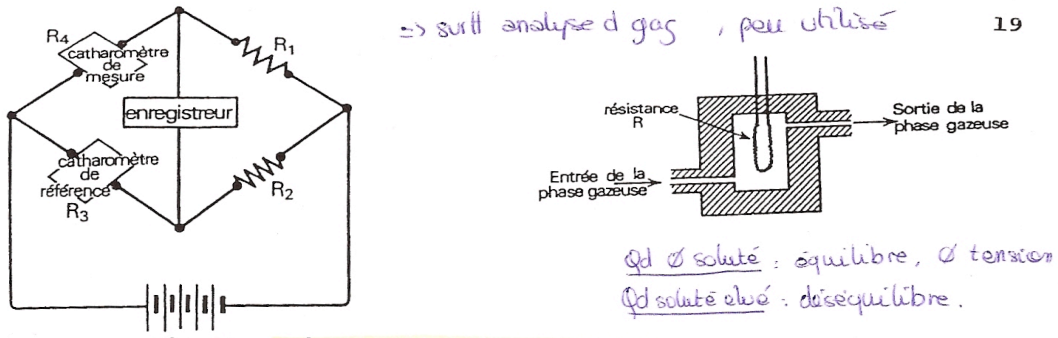


Fig.28 : Détecteur catharométrique en CPG

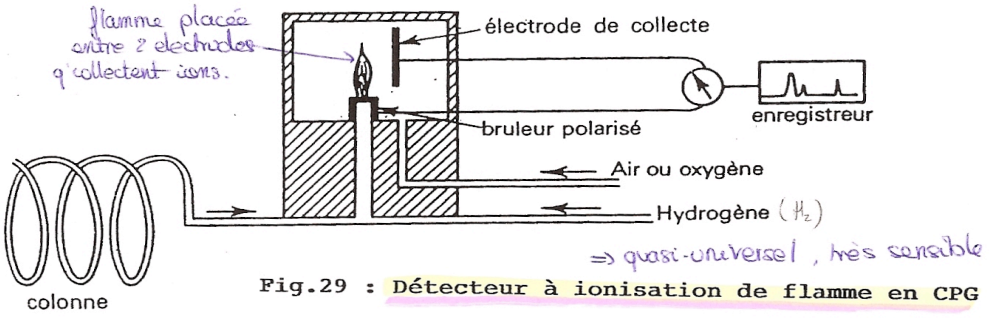


Fig.29 : Détecteur à ionisation de flamme en CPG

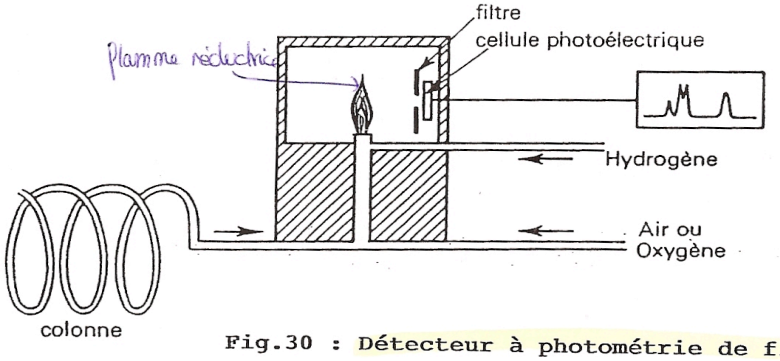


Fig.30 : Détecteur à photométrie de flamme en CPG

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 :

β- + N2 →N2+ + e- courant de base
M + e-→M- M = substance électophile (Cl, Br

→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 :*
  - **Kd=Cs/Cm**
  - 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 φs 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 :**
  - Silylation : ROH + Si(CH3)3Cl → R-O-Si(CH3)3

-On fixe qpmt triméthyl sylilé 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

  - Alcoylation
    ROH→ROR' éther
    RCOOH→RCOOR' ester

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

  - Acylation
    ROH + R-C+=O → R-O-C=O (Carbocation R)
    R-NH2 + R'-C+=O → R-C=O (NH2)

- **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 cétostéroïdes 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