

Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse (**CPG**) est une méthode **physique** qui permet de séparer les constituants d'un **mélange gazeux** par suite d'équilibres entre une **phase mobile gazeuse** et une **phase stationnaire**, qui peut être **liquide** (**partage**) ou **solide** (**adsorption**).

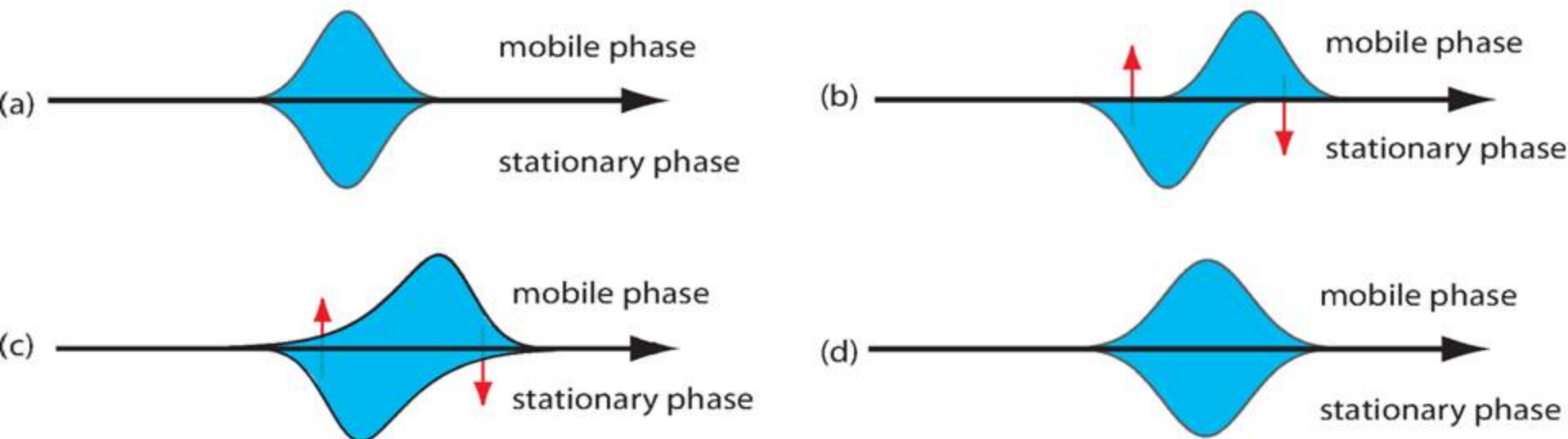
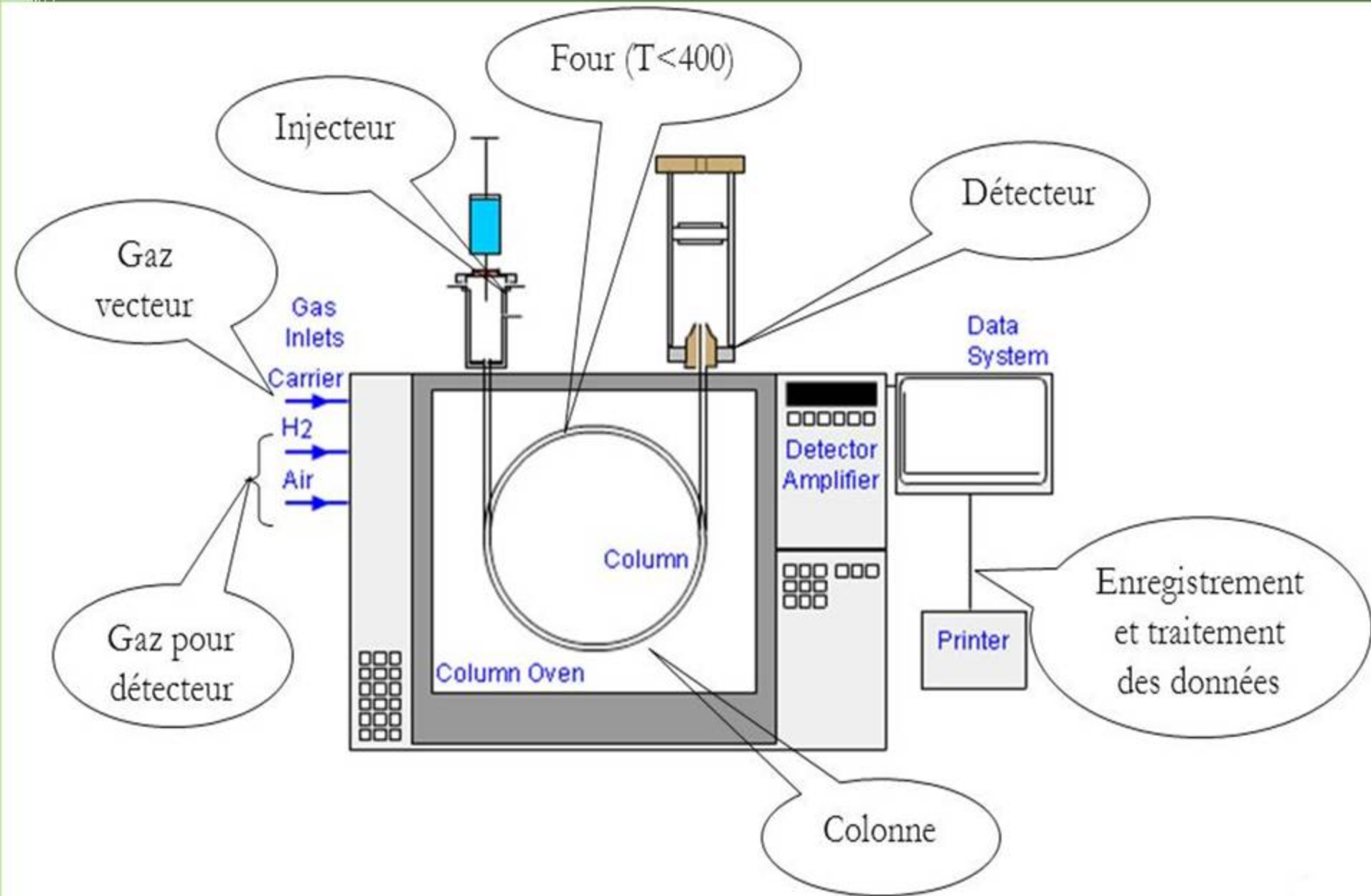


Figure 1. Effet du transfert de masse sur l'élargissement de bande : (a) **Profils gaussiens d'équilibre idéal** pour le soluté dans la phase mobile et dans la phase stationnaire. (b, c) Si nous laissons la bande du soluté se déplacer sur une petite distance vers le bas de la colonne, il n'existe plus d'équilibre entre les deux phases. Les flèches rouges montrent le mouvement du soluté – ce que nous appelons le transfert de masse du soluté – de la phase stationnaire à la phase mobile, et de la phase mobile à la phase stationnaire. (d) Une fois l'équilibre rétabli, la bande du soluté est désormais plus large.

Ce phénomène est dynamique, les molécules passant continuellement d'une phase à l'autre; ce qui crée un état d'**équilibre** entre la phase mobile et la phase stationnaire pour un constituant en particulier. À ce moment le rapport des concentrations est égal au rapport des répartitions dans les deux phases ou coefficient de partage **K**.

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad \text{où } \begin{array}{l} C_s = \text{concentration dans la phase stationnaire} \\ C_m = \text{concentration dans la phase mobile} \end{array}$$



1. Gaz vecteur

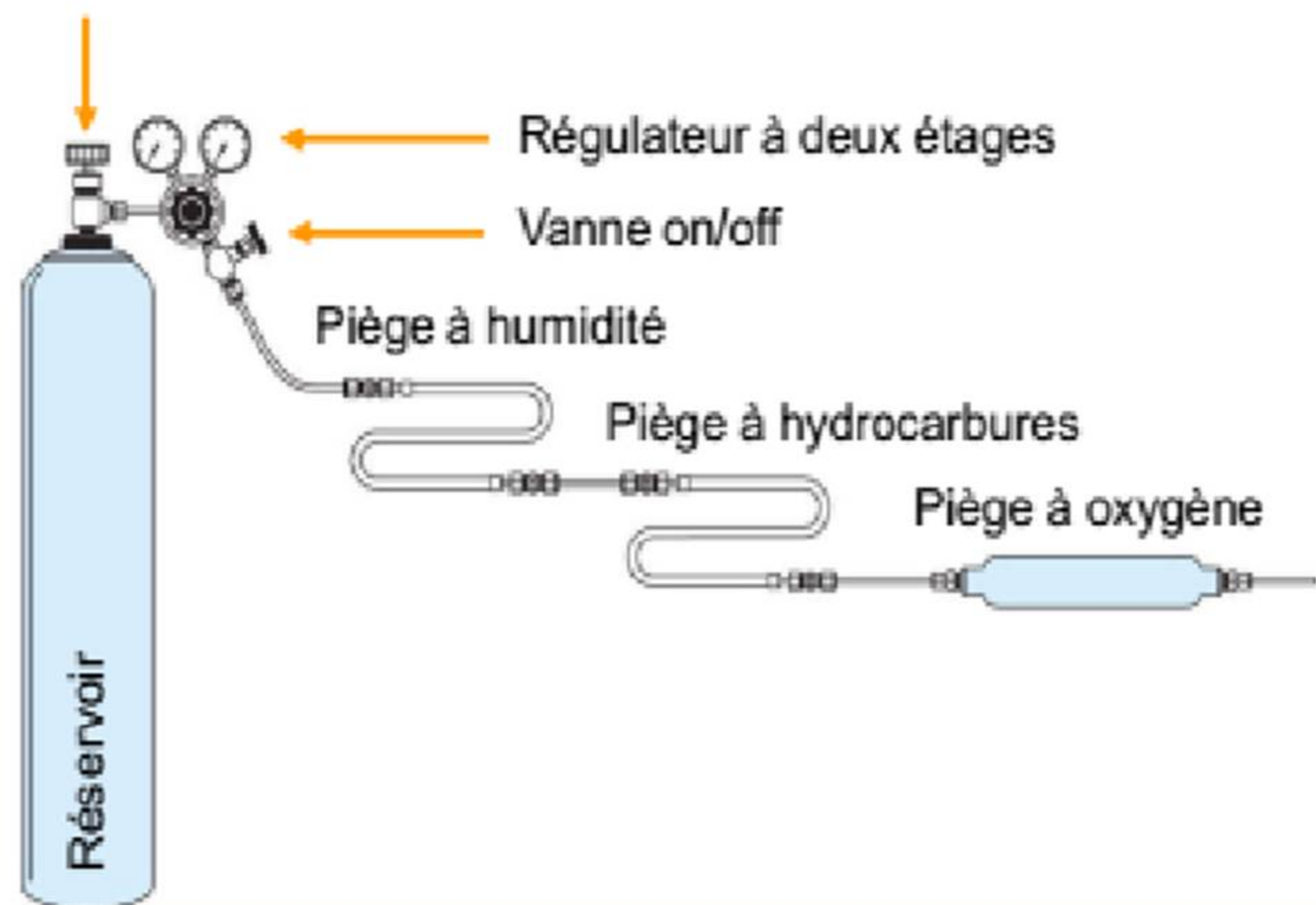
Le gaz est contenu dans des bouteilles munies de **manomètres**.

Il circule dans la colonne à **débit constant**, il doit répondre à certaines qualités :

- Faible viscosité ;
- Grande pureté (**filtres séchant et réducteur**)
(**> 99,9995 %**) ;
- Inertie vis à vis de l'échantillon et de la phase stationnaire ;
- Compatibilité avec le détecteur.

Les principaux gaz utilisés :

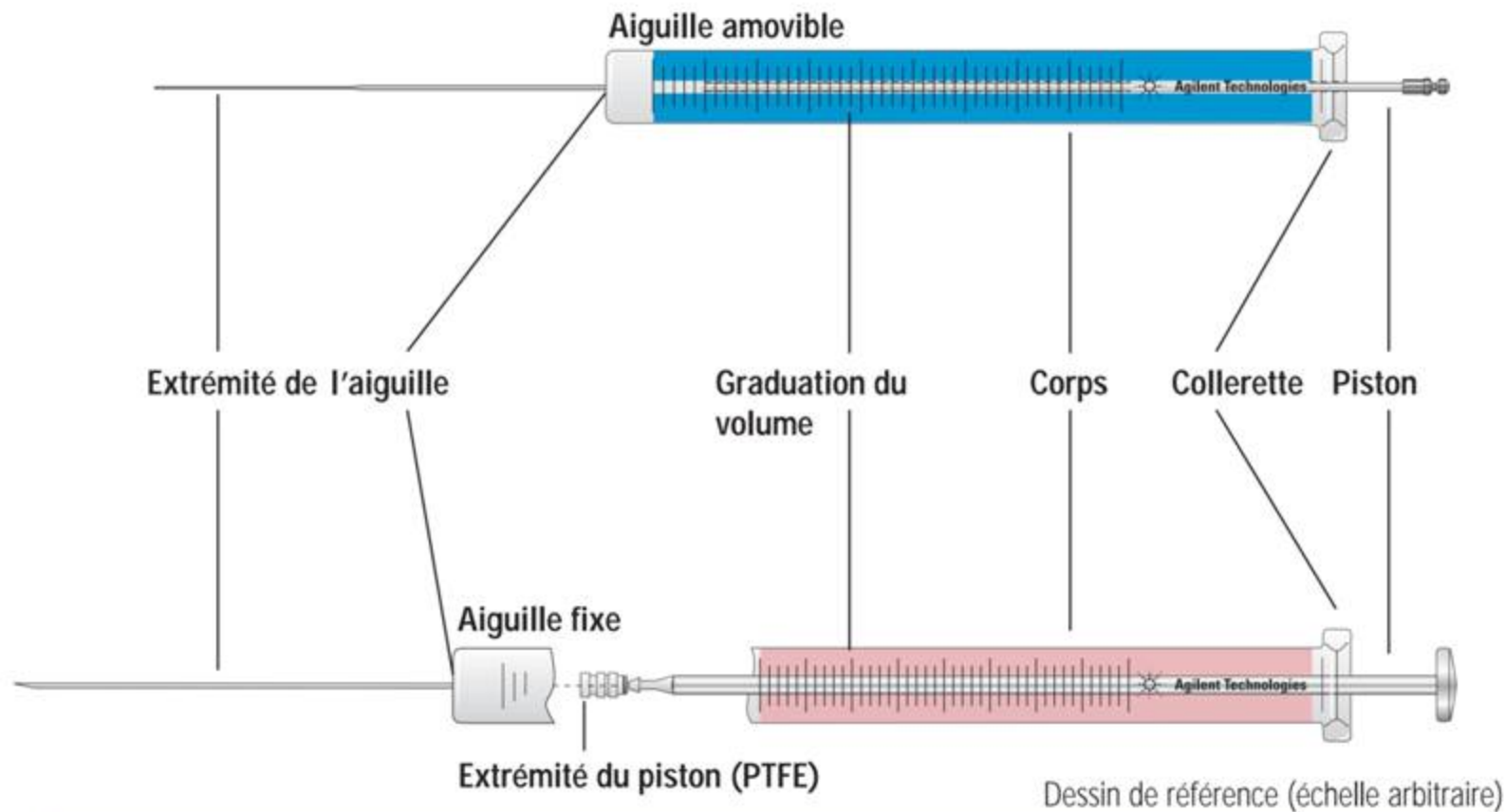
- l'azote (N_2) ;
 - l'argon (Ar) ;
 - l'hélium et (He) ;
 - l'hydrogène (H_2).
-
- H_2 ou He pour les catharomètres ;
 - N_2 , H_2 ou He pour les FID ;
 - N_2 ou Ar/CH_4 pour les ECD.



2. Seringues

Seringues pour
échantillonneurs
automatiques

Caractéristiques de la seringue



Seringue manuelle

Pour injecter manuellement ou automatiquement, il y a **deux points clés** pour choisir la **seringue adaptée** :

- Qualifier le type d'échantillon ;
- Déterminer le plus petit volume à pipeter ou injecter.

Seringues manuelles à code couleur

La couleur exprime le volume.

Couleur
du corps

Volume

Dr Laib



0.5 µL



1.0 µL



2.0 µL



5.0 µL



10 µL/1.0 mL



25 µL/2.5 mL



50 µL/5.0 mL



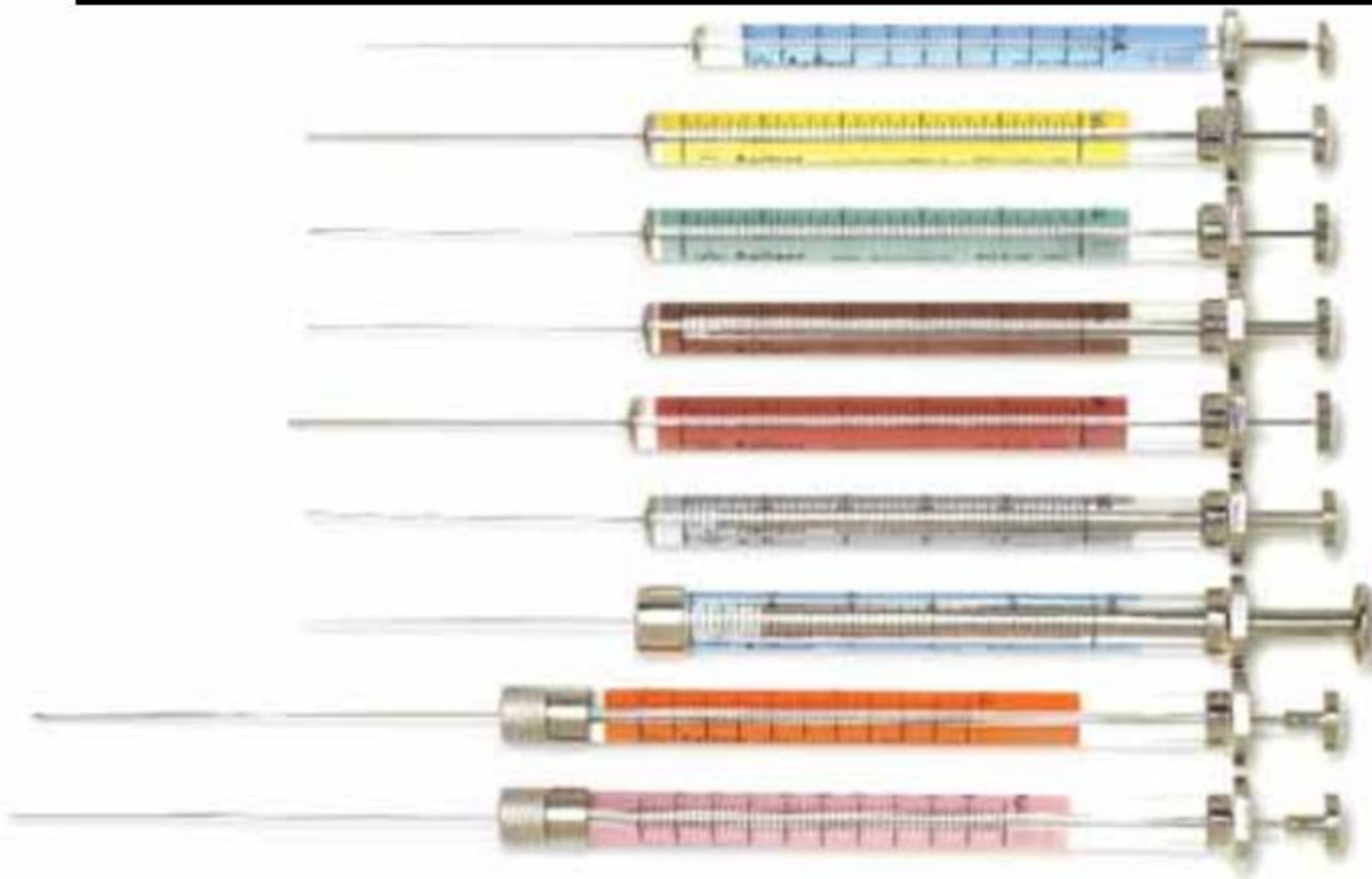
100 µL/10.0 mL



250 µL/25.0 mL



500 µL/50.0 mL



3. Injecteurs

- L'injection dans toute colonne de chromatographie doit répondre aux **2 impératifs** :
- Représenter une **quantité suffisamment petite** pour ne pas surcharger la colonne, mais **suffisamment grande** pour fournir une réponse au **détecteur** ;
- Représenter une **durée brève** pour ne pas **élargir les pics**. L'injection doit se faire dans la plus petite fraction possible de la longueur de colonne ;

Pour les molécules plus volatiles, il reste le choix de l'injection par division (**split**) où seule une fraction de l'échantillon est analysée ; il faut alors savoir qu'il existe un **risque** de **ségrégation** entre les molécules lors de l'utilisation d'un diviseur.

- Ce phénomène est évité en utilisant un injecteur « **On-column** ». Son principe est basé sur le **dépôt liquide** de l'échantillon dans la colonne. Dans ce cas, toute la partie d'injection est refroidie en permanence par une circulation d'eau ou d'air.
- Le **développement** de système de température de vaporisation programmée est appliqué principalement aux injecteurs **split/splitless**. Les avantages et les inconvénients de ces différents systèmes sont résumés dans le tableau suivant :

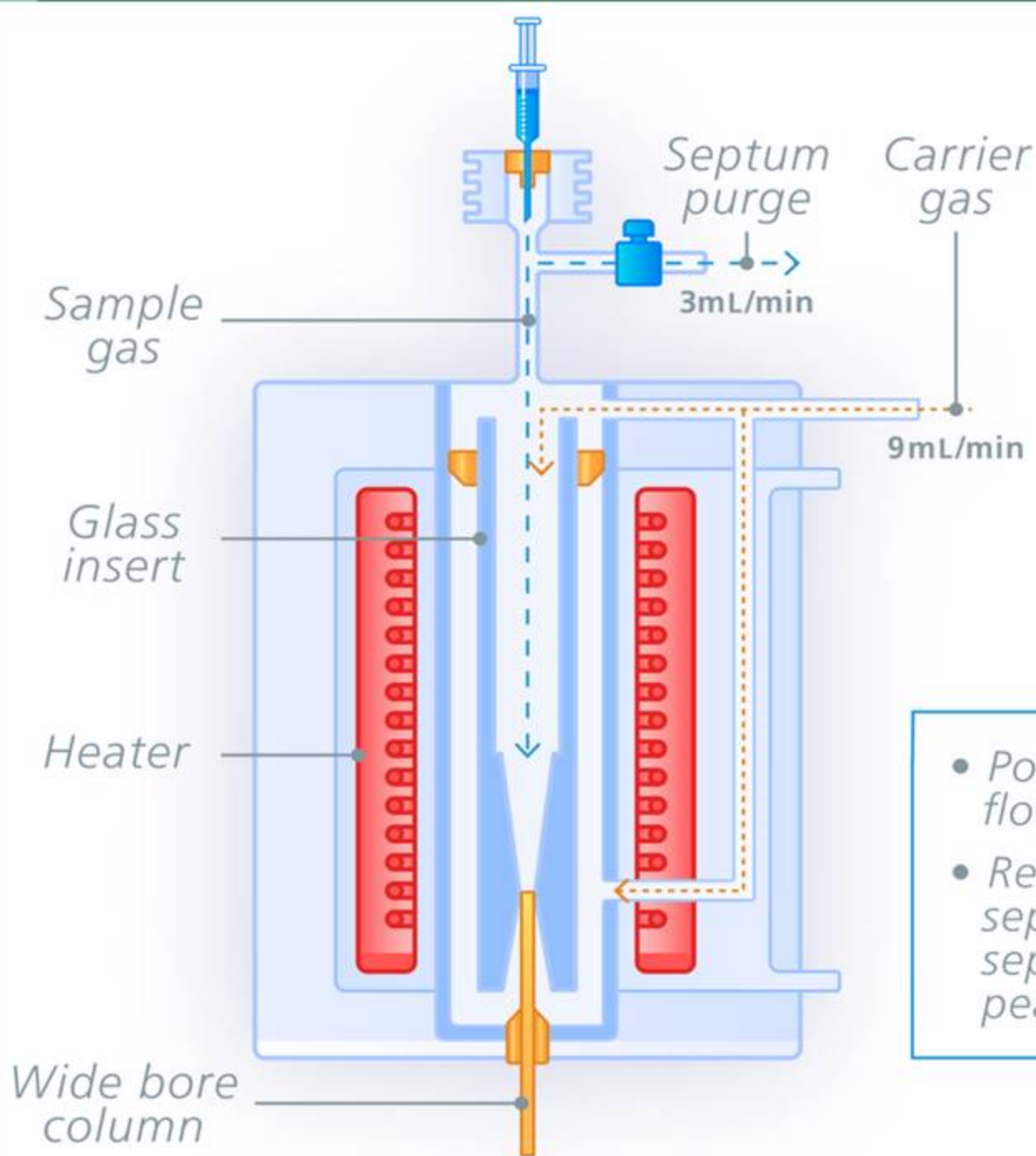
Tableau. Comparaison des différents systèmes d'injection.*Dr Laib*

Mode d'injection	Avantages	Inconvénients
Injection directe	Simple Faible quantité d'échantillon Analyse de traces	Pollution de la colonne avec risque de surcharge
Injecteur split	Adapté pour tous les types d'échantillons Bande d'injection étroite	Reproductibilité liée à la nature de l'échantillon
Injecteur splitless	Adapté pour l'analyse quantitative de traces Peu de discrimination	Choix limité de solvants et de température
Injecteur on-column	Adapté pour l'analyse quantitative Pas de discrimination	Pollution de la colonne

a. Injecteur par Vaporisation Directe

Pour les colonnes remplies et les colonnes capillaires 530 μm , qui nécessitent un débit de gaz de plus de 10 ml/minute, la méthode à « vaporisation directe » est simple. Tous les modèles dérivent d'un même montage de base correspondant à un tube métallique doublé d'un chemisage de verre (**Insert**), balayé par le gaz et chauffé à la température moyenne d'ébullition des composés à chromatographier.

L'une des extrémités de l'injecteur est **obturée** par une **pastille d'élastomère siliconé (Septum)** pour permettre le passage de l'aiguille de la **micro-seringue**, l'autre extrémité est raccordée à la **colonne**. La totalité de l'**échantillon** est introduit dans la **colonne** en **quelques secondes**.

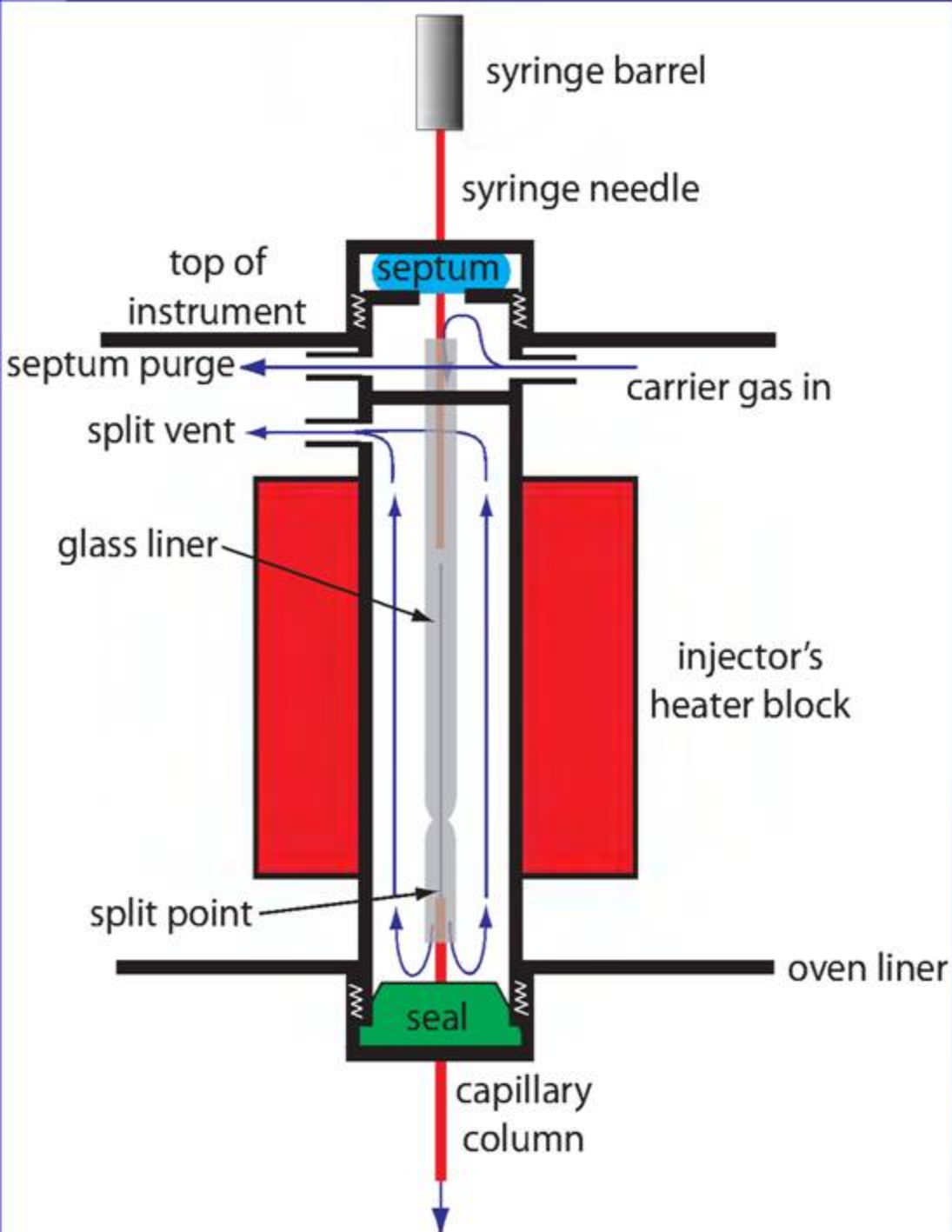


- Possible to set suitable flow rate for separation
- Reduce ghost peak from septum and improve separation with solvent peak

b . Injecteur « split/splitless »

Pour les **colonnes capillaires** à **faible débit**, les **plus petits volumes** introduits avec la **micro-seringue** peuvent **saturer** la **colonne**. Des injecteurs pouvant fonctionner suivant **deux modes** sont utilisés, **avec division (split)** ou **sans division (splitless)**

La **température** de l'**injecteur** doit être **supérieure** d'**environ 20 °C** à la **température** du **produit le moins volatile**. Le **volume injecté** est faible (**quelques microlitres**).



Dr Laib
 L'aiguille perce un **septum en caoutchouc** et pénètre dans un **revêtement en verre** situé à l'intérieur d'un **bloc chauffant**.

Dans une **injection fractionnée**, l'évent divisé est **ouvert**, l'évent divisé est **fermé** pour une **injection sans Division**.

b.1. Injection Split

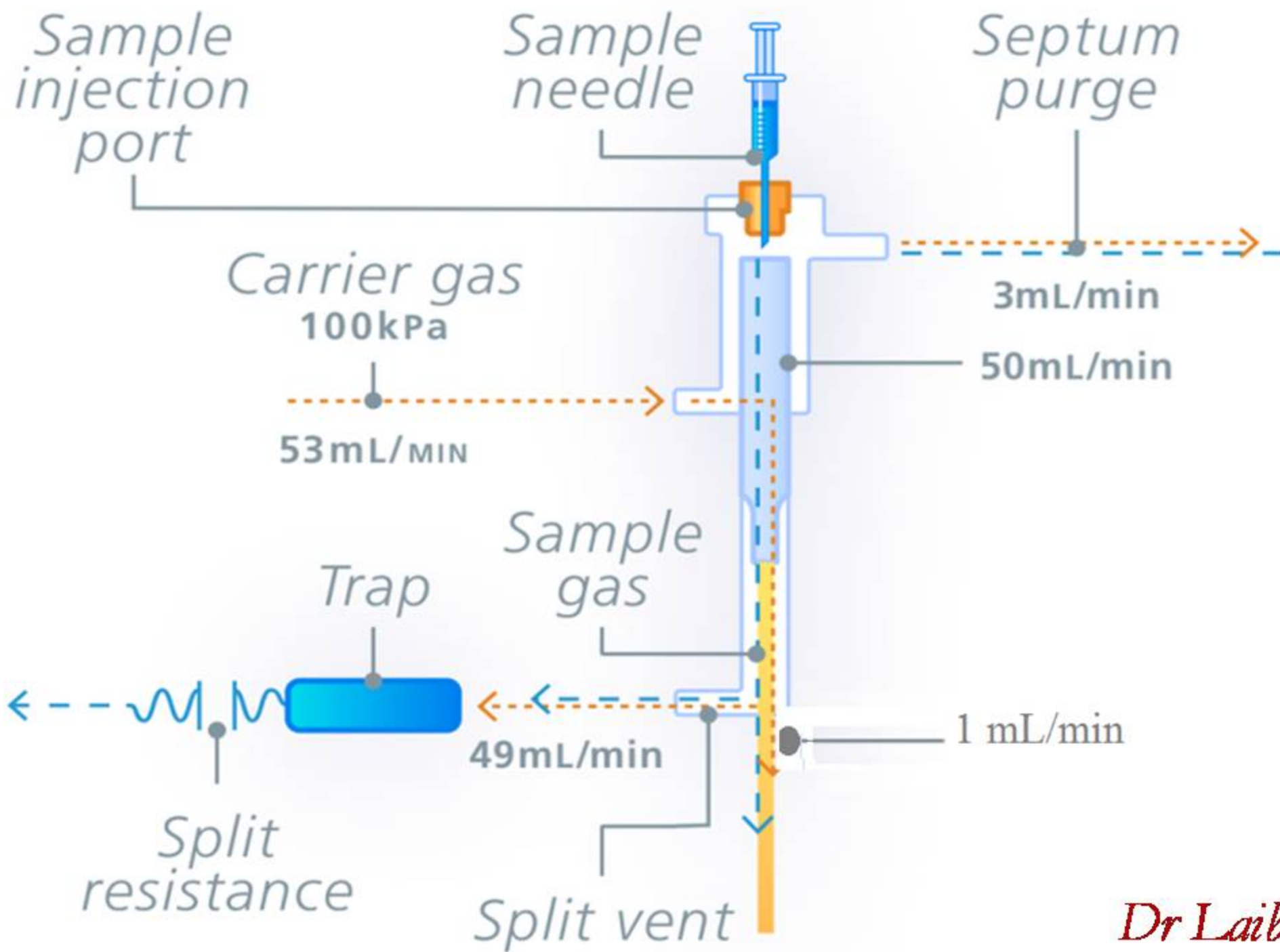
Lors d'une injection fractionnée, nous injectons l'échantillon à travers un septum en caoutchouc à l'aide d'une micro-seringue. Au lieu d'injecter l'échantillon directement dans la colonne, il est injecté dans un revêtement en verre où il se mélange au gaz vecteur.

Le gaz arrive avec un grand débit dans la chambre de vaporisation.

Au **point de division**, une **vanne de fuite** sépare le **courant gazeux** (du gaz porteur et de l'échantillon) en **2 parties** dont la **plus petite fraction** est la **seule** à entrer dans la **colonne capillaire**, le reste sortant par l'**évent divisé**.

Un **dispositif** règle le **débit de fuite** (généralement entre **50 et 100 ml/minute**) ; en contrôlant le débit du gaz porteur entrant dans l'injecteur et les débits à travers la **purge du septum** et l'**évent divisé**. Le **facteur de division (split)** varie entre **0.1 % et 10 %**.

Par exemple, si le **débit du gaz vecteur** est de **50 ml/min** et que les **débits de purge du septum** et de **ventilation séparée** sont respectivement de **2 ml/min** et de **47 ml/min**, le **débit à travers la colonne** est alors de **1 ml/min** = **(50 - 2 - 47)**. Le **rapport de l'échantillon entrant dans la colonne** est de **1/50**, soit **2 %**.



b.2. Injection splitless

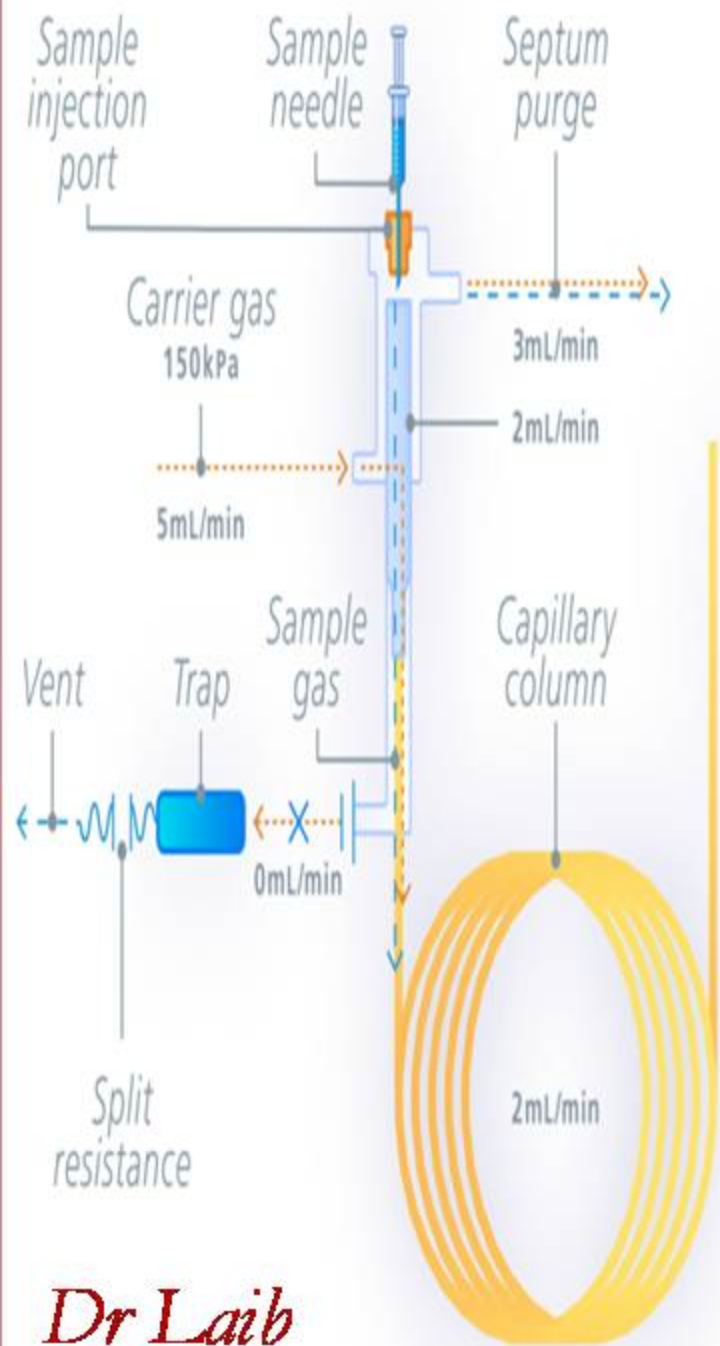
Dans une **injection sans division** qui est utile pour l'analyse des **traces**, nous fermons l'évent divisé et permettons à pratiquement tout le gaz porteur passant à travers le revêtement en verre d'entrer dans la **colonne**, ce qui permet à pratiquement tout l'échantillon d'entrer dans la **colonne**. Etant donné que le débit à travers l'injecteur est faible, un élargissement significatif de la bande de la pré-colonne constitue un problème.

Maintenir la température de la colonne à environ 20-25 °C en dessous du point d'ébullition du solvant permet au solvant de se condenser à l'entrée de la colonne capillaire, formant ainsi une barrière qui emprisonne les solutés. Après avoir laissé les solutés se concentrer, la température de la colonne est augmentée et la séparation commence.

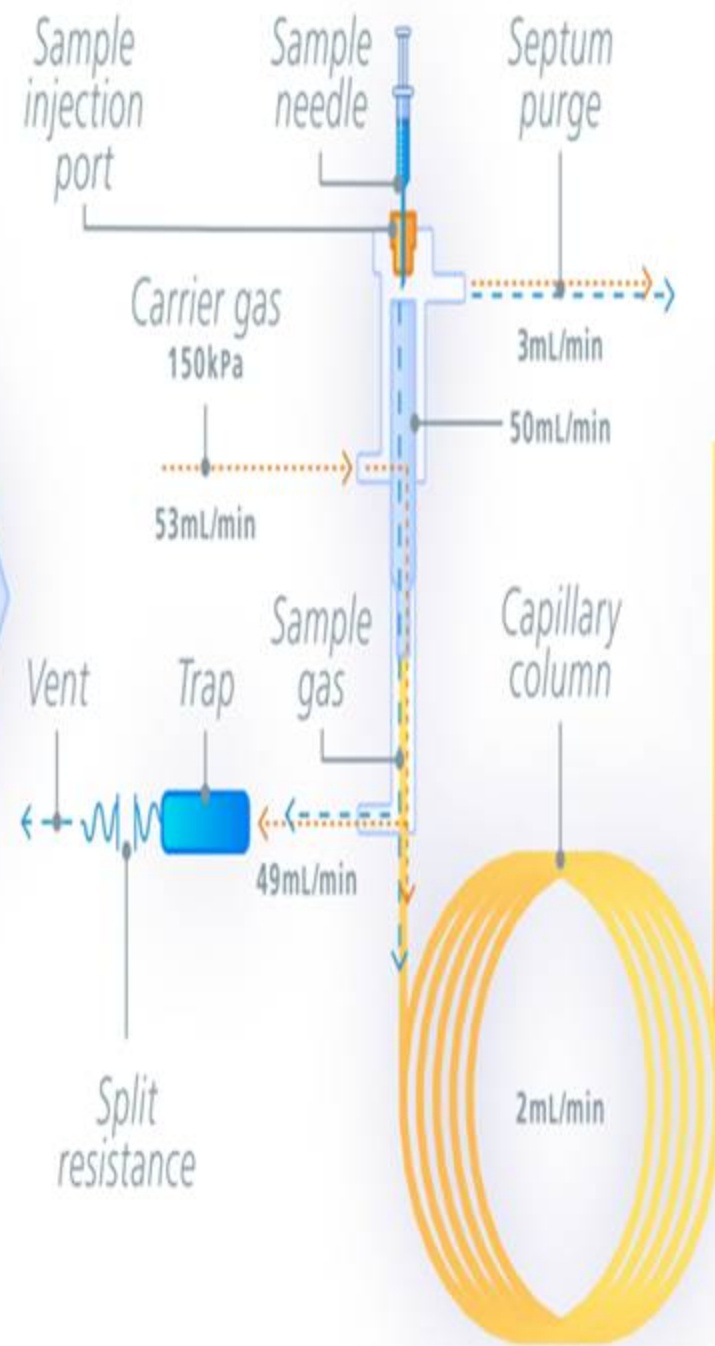


Le mode splitless sur colonne capillaire est réservé
aux échantillons en **solution très diluée**.

Les **colonnes capillaires remplies** ou « **Wide bore** »
peuvent être connectées à ce type d'injecteur.

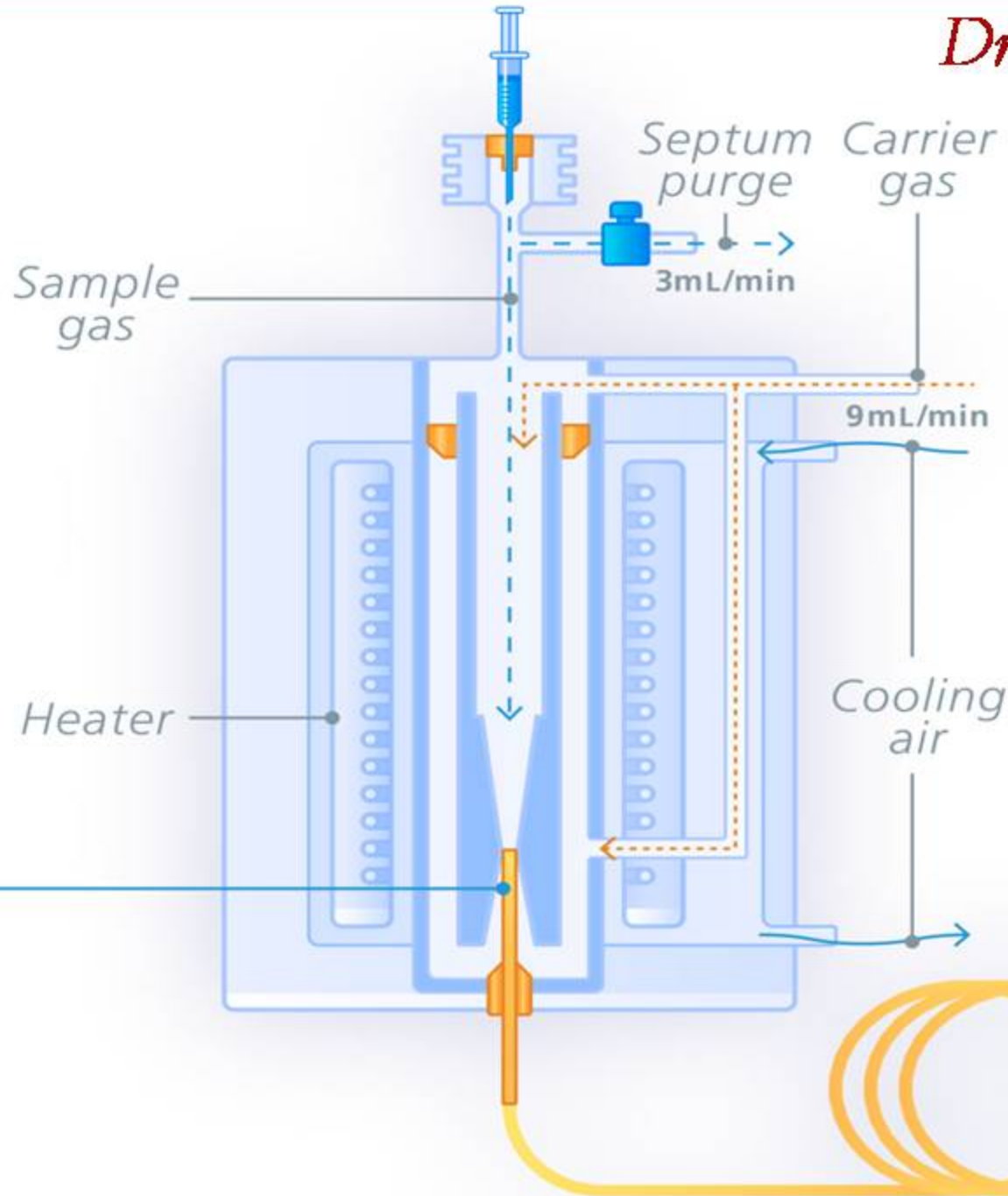


1~2 minutes



c. Injecteur « **Cold On-column** »

Ce dernier procédé consiste à injecter lentement l'échantillon, à froid, directement à l'intérieur de la colonne capillaire «**On-column**», sa vaporisation se faisant après dépôt (évitant ainsi les processus de vaporisation à haute température qui peuvent affecter de façon irréversible les résultats quantitatifs). Un refroidissement permanent du corps de l'injecteur par air froid empêche la vaporisation dans l'aiguille.



Upper part of
0.53mm I.D.
column

or

Empty, inactive
treated 0.53mm
I.D. column,
without
stationary phase
(retention gap)

0.25-0.53mm I.D.

L'usage d'une micro-seringue spéciale est nécessaire. L'aiguille (acier ou silice), dont le diamètre est de l'ordre de 0,15 mm, pénètre à l'intérieur d'une pré-colonne (ou d'une colonne) refroidie vers 40 °C, avant de reprendre sa température normale.

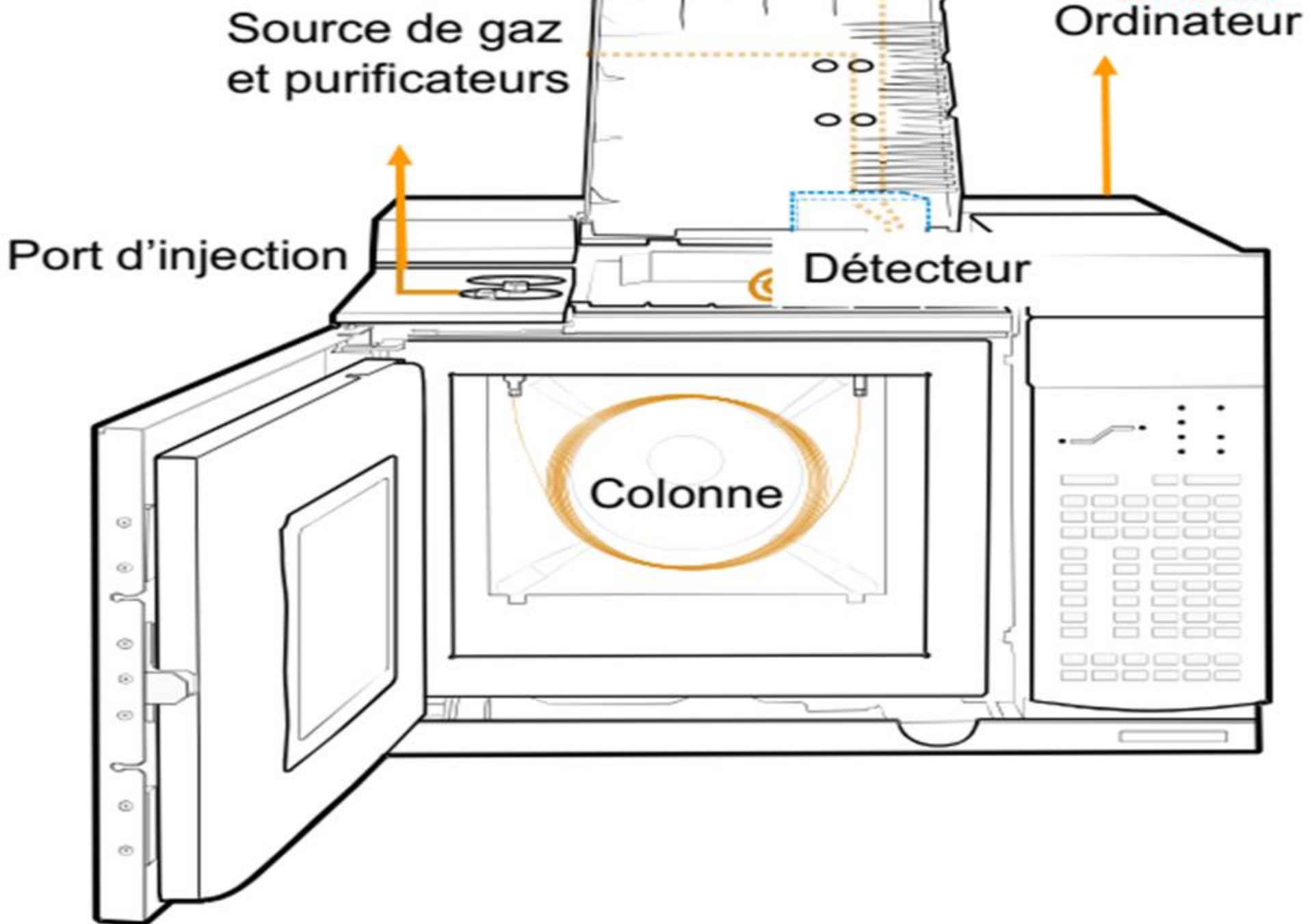
Ce procédé, utile pour les **composés fragiles** (applications en biochimie) mais difficile à maîtriser sans injecteur automatique, est réputé pour :

- Ne pas provoquer de discrimination entre les composés de volatilité différente ;
- **Éliminer les risques de décomposition** ou de **dégradation thermique** tout en permettant l'**utilisation de solvants très volatils** ;
- **Limiter la perte d'efficacité** en **prévenant l'éjection des échantillons vers l'arrière** et donc l'**élargissement des pics**.

4. Composés concernés

- Molécules volatiles naturellement ;
- Composés gazeux ;
- Molécules susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décompositions ;
- Composés qui, par des réactions de dérivation, sont rendus volatils à des températures ne provoquant pas leur décomposition.

5. Four



- La colonne se trouve dans un **four régulé**.
- L'échantillon vaporisé est transporté vers la colonne par le gaz vecteur. Les composés se répartissent sélectivement entre la phase stationnaire (**revêtement**) et la phase mobile (**gaz vecteur**).

- La **température** est un paramètre important. Elle joue un **rôle** sur la **rétention**, la **sélectivité**, l'**efficacité**;
- La **rétention augmente** quand la température diminue ;
- la **sélectivité diminue** avec la température ;
- La **séparation est meilleur** à basse température.
- **Isotherme** : la **température** est **constante** tout au long de l'analyse ;
- **Gradient** : Un **gradient de température** peut être appliqué au four pour **éluer tous les composés**.

- ❑ Pour les composés de même volatilité ;
- ❑ Rétention similaire ;
- ❑ Pour les composés dont la rétention diffère ;
- ❑ Mauvaise forme de pics ;
- ❑ Mauvaise sensibilité pour les composés fortement retenus ;
- ❑ Mauvaise séparation pour les composés dont $k < 2$;
- ❑ Pour les composés d'une série homologue la rétention varie de manière logarithmique.

- **Gradient** : Un **gradient de température** peut être appliqué au four pour **éluer tous les composés**.
 - **Température initiale faible** pour la séparation des composés à **bas point d'ébullition**
 - **Augmentation de la température** pour permettre l'**élution des autres composés** ;
 - Pour une **série homologue** la **rétenction** est **linéaire** avec la **température** ;

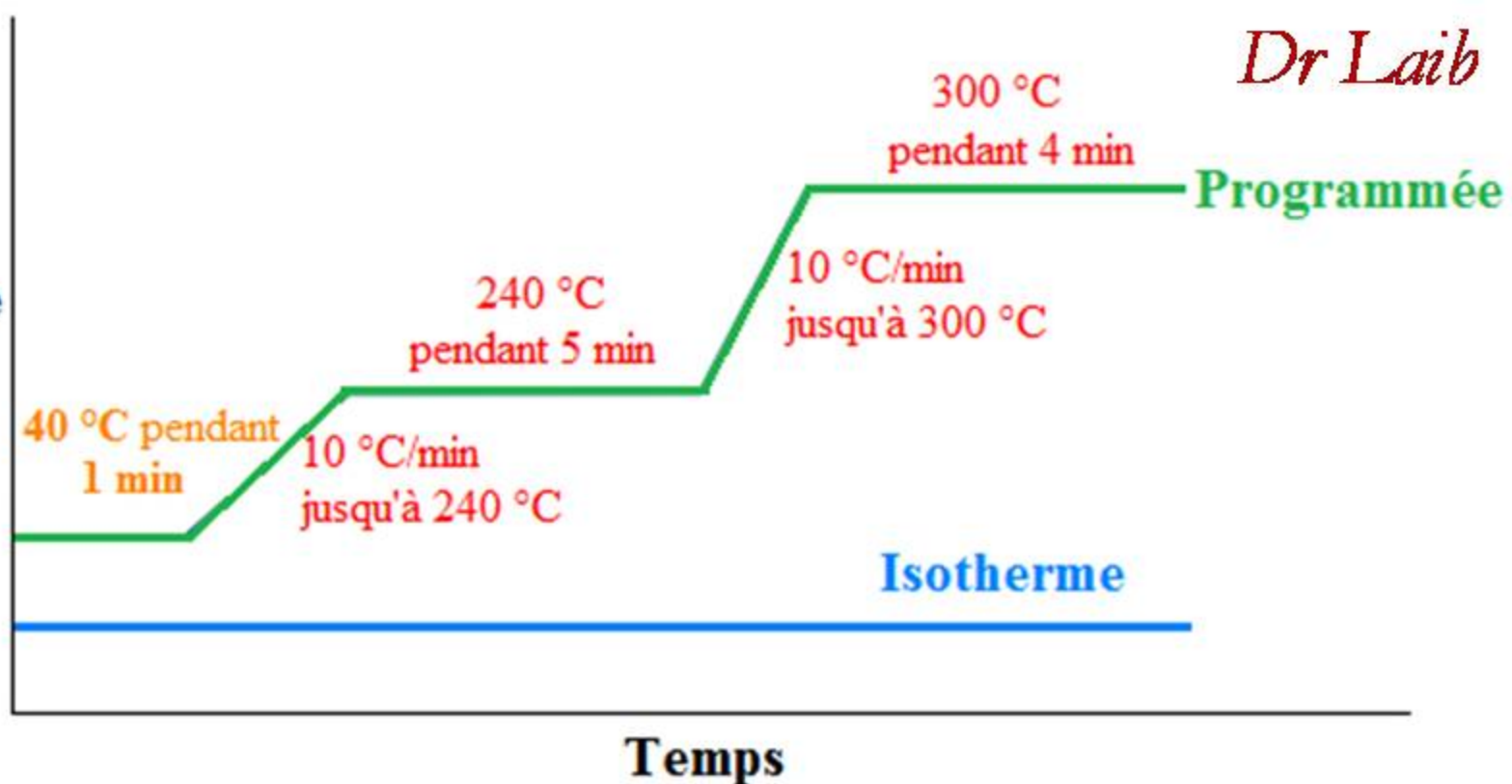
- Les composés sont élués avec à peu près la **même largeur de pic** ;
- La **sensibilité augmente** pour les **composés élués le plus tardivement**.

Théorie de la programmation de température

- ❖ En gradient de température la rétention est diminuée par **2** tous les **30 °C** ;
- ❖ Les **analytes** sont **initialement immobilisés en tête de colonne** ;
- ❖ Ils **stagnent** jusqu'à ce que la **température devienne compatible** avec leur **vaporisation** et le **partage dans la colonne** ;

- ❖ Comme chaque analyte a une pression de vapeur propre, c'est le principal processus de séparation en gradient de température ;
- ❖ Une fois que le composé commence à être chromatographié, il accélère dans la colonne à la même vitesse que les autres analytes.

Température



Mise en place de la programmation

Une programmation classique est utilisée pour évaluer la nature de l'échantillon (gamme de volatilité, nombre de composés, adaptation de la phase, etc.).

En général on adopte la programmation suivante:

- La **température initiale** doit être **aussi basse que possible** ;
- Le **gradient** doit être de **10 °C/min** ;

- La **température finale** doit être **compatible** avec la **température limite** de la **colonne** ;
- Le **temps final** doit être de **10 min** pour permettre l'**élution** des **composés**.
- Si les **pics** éluent dans un **temps inférieur à 25 %** du **temps du gradient**, Il est possible de travailler en **isotherme**.

Avantages d'une programmation de température

- Utile pour découvrir la nature de l'échantillon ;
- Meilleure séparation pour des composés qui ont des rétentions différentes ;
- Amélioration de la limite de détection, la forme des pics et la précision ;
- Permet le nettoyage de la colonne ;
- Est nécessaire pour certains types d'injection **splitless**.

- ❖ Plus complexe ;
- ❖ Augmentation du bruit de fond ;
- ❖ Dégradation plus rapide de la colonne ;
- ❖ Analyse plus longues du fait du refroidissement de la température.

6. Colonne

Elles contiennent la **phase stationnaire**, et se présentent sous forme de **tubes fins enroulés**.

Il existe **2 types de colonnes** :

1. Les colonnes remplies

Chromosorb[®] ; Sphérosil[®] ; Porapak[®]

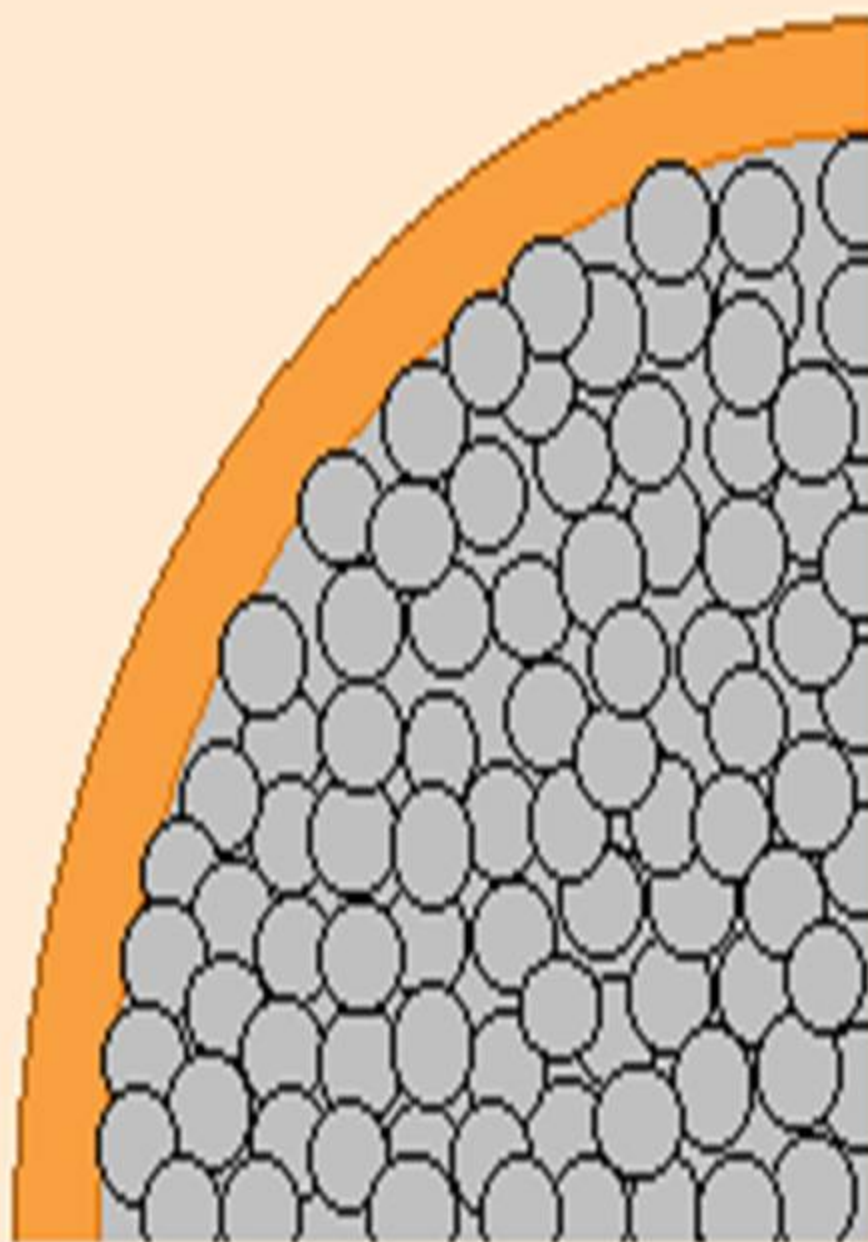
Diamètre de 2 à 6 mm et longueur de 1 à 3 m. Elles sont en tubes d'acier ou verre.

Elles sont **remplies** d'un support poreux et **inerte** sous forme de **grains sphériques** (**d'environ 0,2 mm de diamètre**) sur lequel est **imprégnée** la **phase stationnaire**.

Elles sont **moins résolutives** que les **colonnes capillaires** ;



colonne
capillaire



colonne
remplie

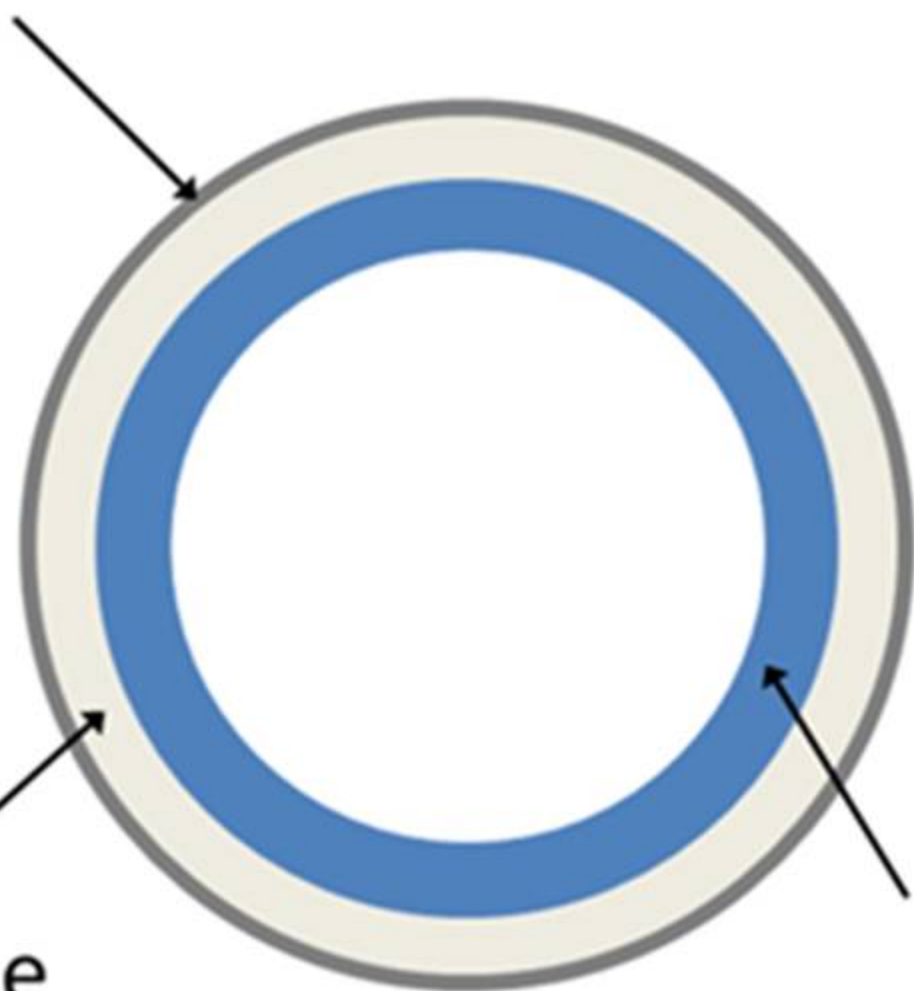
2. Les colonnes capillaires (à tube ouvert) *Dr Laib*

Diamètre de 0,1 à 0,53 mm et longueur de 10 à 100 m. Elles sont en **tube d'acier inoxydable** ou en **silice fondue** ;

La **phase stationnaire** est directement **déposée sur la paroi interne de la colonne** sur une **épaisseur de 0,05 à 5 μm .**

Revêtement en polyimide

Dr Laib



Phase
stationnaire

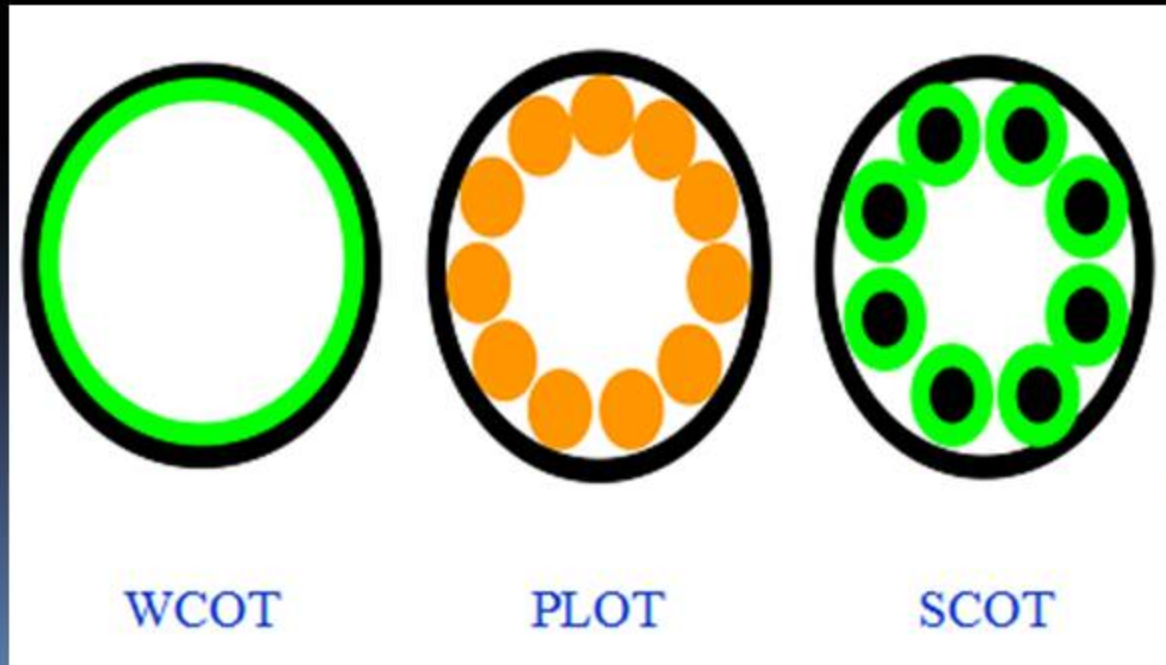
Silice fondue

On distingue les colonnes:

SCOT (Support Coated Open Tubular) : elle contient le support solide **recouvert** de la phase stationnaire liquide ;

WCOT (Wall Coated Open Tubular) : elle contient uniquement le film de la phase stationnaire = une pellicule liquide à l'intérieur du tube ;

PLOT (Porous Layer Open Tubular) : elle contient un solide poreux très finement divisé ; ce type de colonne **n'est pas adapté** pour les **huiles essentielles**, mais pour l'analyse des gaz, le phénomène mis en jeu est l'adsorption.



6.1. phase stationnaire

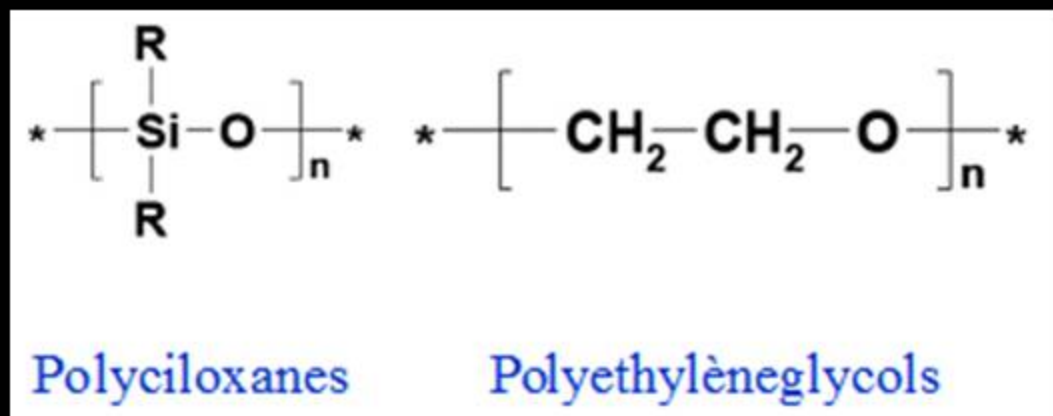
Choix de la phase stationnaire

Une phase **apolaire** retiendra d'autant plus un composé qu'il sera **apolaire** (et inversement), **Exemple : Squalane (apolaire) ; Carbowax (polaire)**

Une **phase apolaire** retiendra les **composés** dans l'ordre de leur **température d'ébullition (donc sortie des composés dans l'ordre de leur température d'ébullition croissante)**

Une **phase phénylée** retiendra mieux un composé **aromatique**.

Phases stationnaires liquides



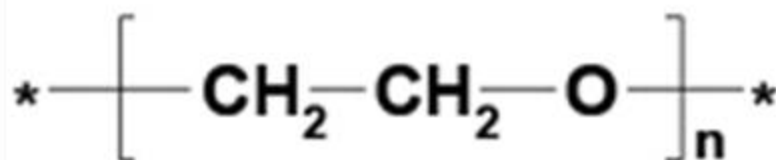
Différentes phases stationnaires

Les phases les plus courantes sont:

Les polyéthylèneglycols (PEG)

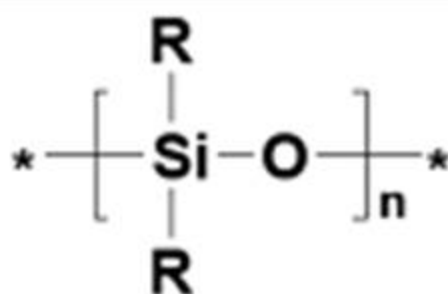
Les Polymères polaires (composés des colonnes

Carbowax[®]) de type:



Polyéthylèneglycols

Les polysiloxanes (« **huiles et gommages de silicones** ») correspondant à la **répétition** d'un motif de base de type:



Polyciloxanes

Suivant le pourcentage de groupement **R** par rapport aux groupes **CH₃**, on peut **modifier** la **polarité** de la colonne et donc ses propriétés en chromatographie.

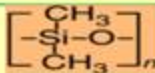
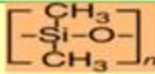



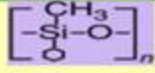
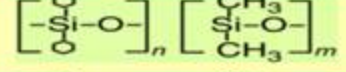
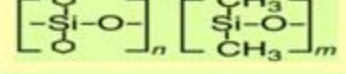
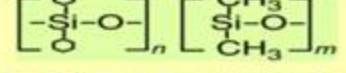
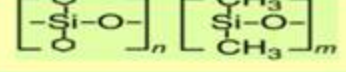
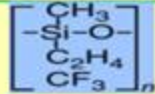
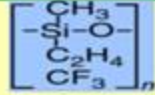
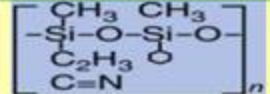
❖ Si **R= CH₃**, la colonne est **complètement apolaire** et **sépare** les **produits** suivant leur **point d'ébullition** (noms commerciaux : **DB-1, OV101, SE-30...**)

❖ Si le pourcentage de **R= Phényle** est égal à **5 %**, la colonne la plus utilisée en CPG, elle est répertoriée sous les noms commerciaux suivants: **DB5, CPsil5, OV5...**

❖ Si on incorpore un substituant cyanopropyle ($R = -CH_2-CH_2-CN$), la polarité augmente beaucoup (à cause du fort moment dipolaire du groupe $-CN$). Ce sont les phases DB 1701, CPSil 18...

Ces phases à base de **silicone** présentent **2 avantages** pour la CPG :

- Une **bonne inertie chimique**, elles ne réagissent ni avec les phases mobiles, ni avec les produits injectés ;
- Une **très bonne tenue à la température**, elles peuvent être **chauffées sans dommage** jusqu'à **300 °C**.

Name	Type	Structure	Solvent	Temp. limit (°C)
OV-1	Dimethylsilicone gum		Toluene	325–375
OV-101	Dimethylsilicone		Toluene	325–375
OV-3	Phenylmethyldimethylsilicone		Acetone	325–375
OV-7	Phenylmethylsilicone <i>Dr Laib</i>		Acetone	350–375
OV-11	Phenylmethylsilicone		Acetone	325–375
OV-17	Phenylmethyldimethylsilicone		Acetone	325–375
OV-61	Diphenyldimethylsilicone		Acetone	325–375
OV-73	Diphenyldimethylsilicone gum		Toluene	325–350
OV-22	Phenylmethyldiphenylsilicone		Acetone	350–375
OV-25	Phenylmethyldiphenylsilicone		Acetone	350–375
OV-105	Cyanopropylmethyl-dimethylsilicone		Acetone	275–300
OV-202	Trifluoropropylmethylsilicone		Chloroform	250–275
OV-210	Trifluoropropylmethylsilicone		Chloroform	275–350
OV-215	Trifluoropropylmethylsilicone gum		Ethyl acetate	250–275
OV-225	Cyanopropylmethylphenylmethyl silicone		Acetone	250–300
OV-275	Dicyanoallylsilicone		Acetone	250–275
OV-330	Silicone Carbowax copolymer		Acetone	250–275
OV-351	Polyglycolnitroterephthalic		Chloroform	250–275
OV-1701	Dimethylphenylecyano-substituted polymer		Acetone	300–325

Détecteurs

Le choix du gaz a trois conséquences directes sur le chromatogramme :

- Sensibilité du détecteur ;
- Efficacité de la colonne ;
- Forme des pics.

Le débit doit être parfaitement stabilisé même en cas de variations des conditions opératoires (programmation de température).

Détecteurs les plus courants

Dr Laib

Catharomètre

- Détecte des composés dont la conductivité thermique diffère du gaz vecteur

Détecteur à ionisation de flamme

- Détecte les composés qui brûlent ou s'ionisent dans une flamme

Détecteur à capture d'électron

- Détecte des composés capturant des électrons (par ex., composés halogénés)

Détecteur de composés azotés et phosphorés

- Détecte des composés contenant de l'azote et du phosphore

Détecteur à photométrie de flamme

- Détecte des composés contenant du soufre et du phosphore

Détecteur à émission atomique

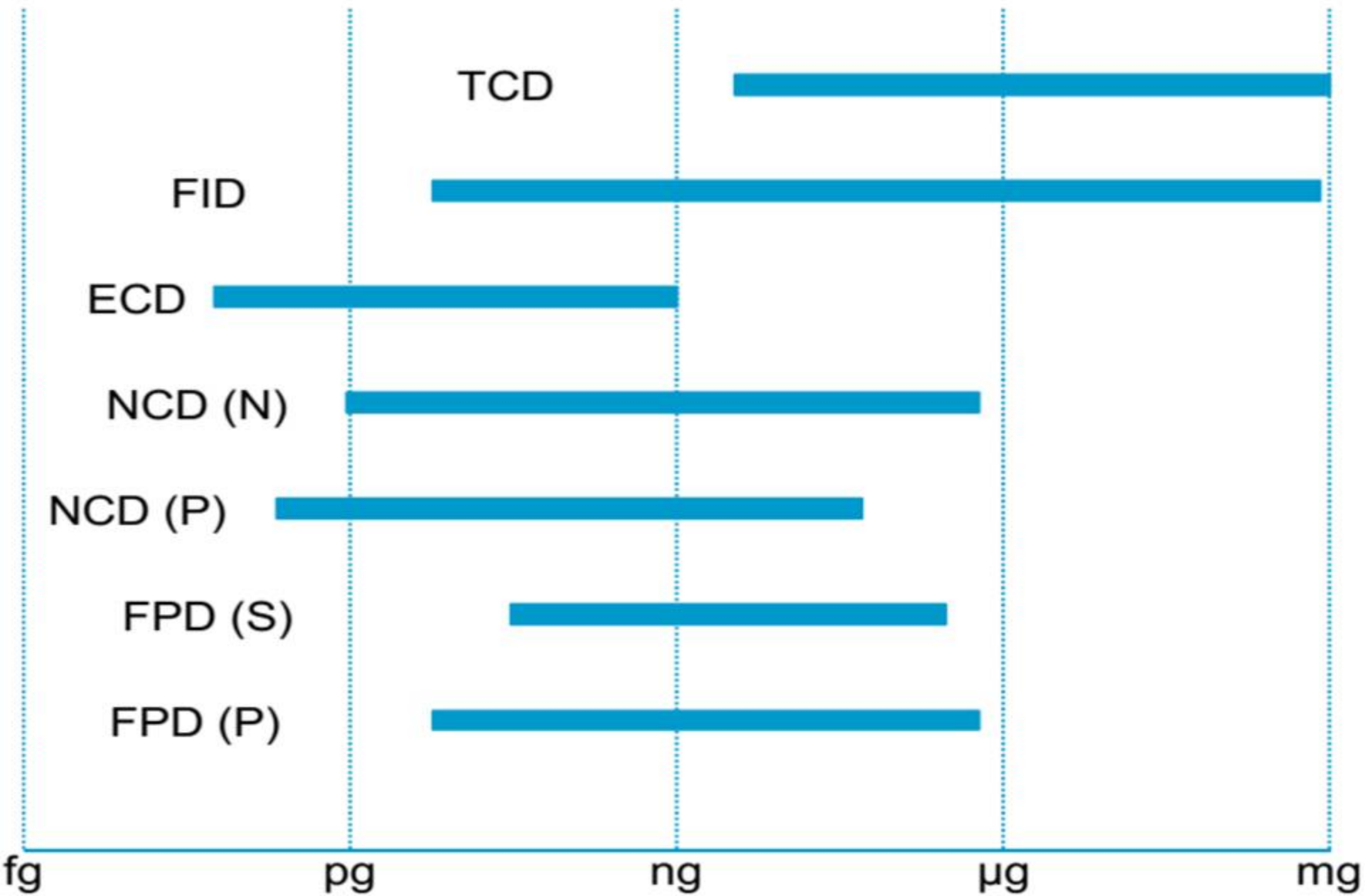
- Réglable pour de nombreux éléments

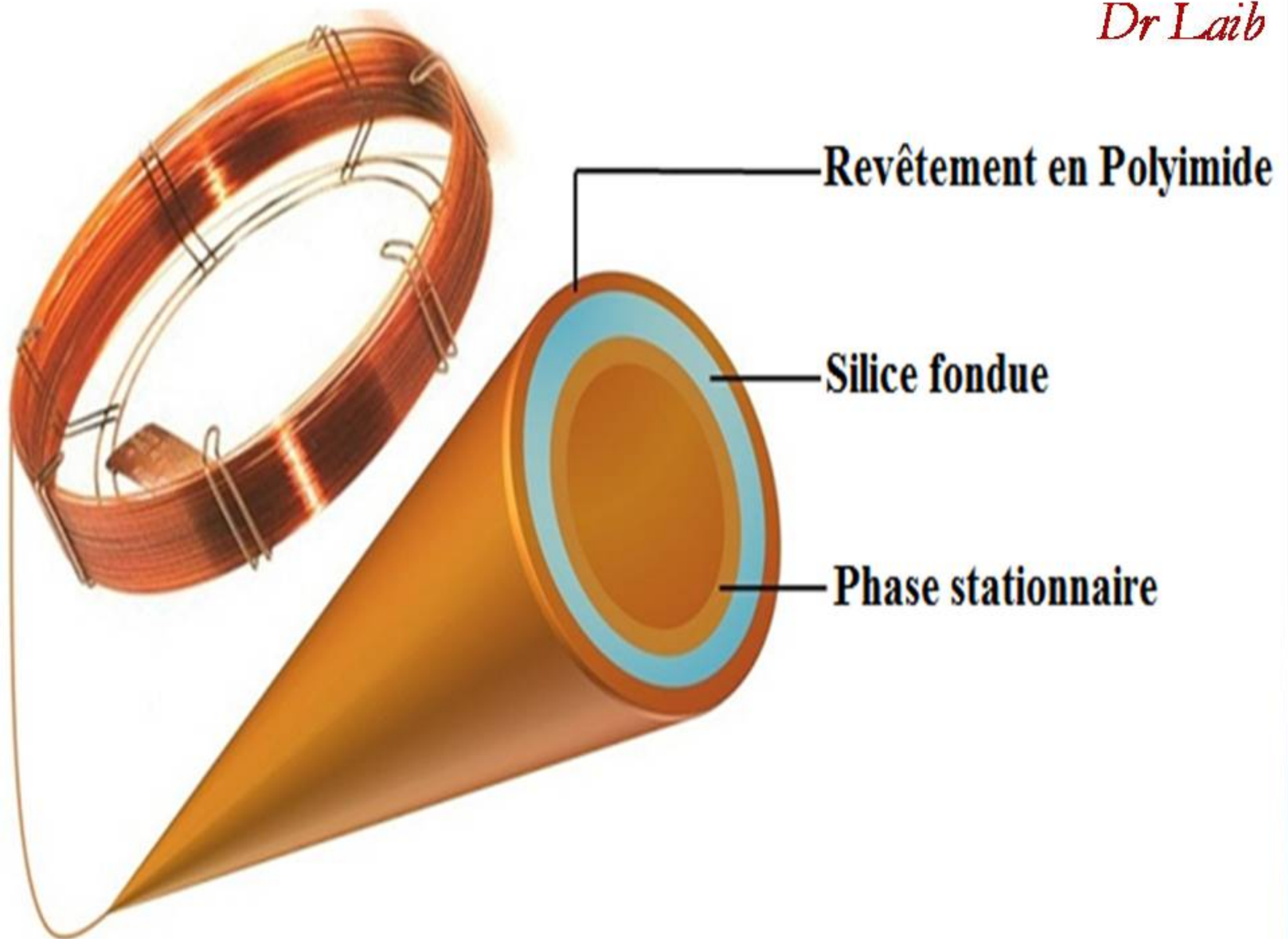
Détecteur de masse

- Identifie les composants à partir de leurs spectres de masse (outil d'identification le plus puissant actuellement disponible lorsqu'associé avec la GC)

Sensibilité des détecteurs

Dr Laib





À l'intérieur d'une colonne capillaire

Une colonne de GC capillaire est constituée par un tube étroit (**D.I. de 0,05 à 0,53 mm**) dont la surface interne est recouverte d'un revêtement mince en polymère (**0,1 à 10,0 μm**).

Il est critique de sélectionner la bonne colonne capillaire ; ce choix se fait d'après des facteurs comme la sélectivité, la polarité et la teneur en phényle.

Le **diamètre** de la colonne a un effet sur l'efficacité, la rétention de solutés, la pression de tête et le débit du gaz vecteur.

La **longueur** de la colonne a un effet sur la rétention de solutés, la pression de tête, le ressuage (**bleeding**) et le coût.

Domaine d'application

- Molécules volatiles (pression de vapeur notable en dessous de 250 °C) ;
- Dérivatisation pour augmenter la volatilité ;
- Masse moléculaire $< 500 \text{ g.mol}^{-1}$;
- Les molécules fortement polaires sont moins volatiles quand elles sont dans des solvants polaires (forces intermoléculaires).

Comparaison entre CPG & HPLC

Dr Laib

CPG

- Séparation en phase gazeuse
- Composés volatils et non thermolabiles
- Séparation à température élevée
- Sélectivité limitée
- Constante de diffusion élevée
- Viscosité faible

HPLC

- Séparation en phase liquide
- Indifférent
- Séparation à température ambiante
- Grande latitude d'ajustement des sélectivités
- Constante de diffusion faible
- Viscosité élevée