

2<sup>ème</sup> année BTS Bioanalyses et Contrôles

# Théorie CPG-HS



L. GODIN  
<http://ligodin.free.fr>

[godin.lionel@orange.fr](mailto:godin.lionel@orange.fr)

# **TP n°6 : OPTIMISATION de MÉTHODE & DOSAGE de l'ETHANOL dans une SPÉCIALITÉ PHARMACEUTIQUE par CPG – HEADSPACE**

<b>1. DEFINITION</b>	<b>2</b>
1.1. La CPG	2
1.2. Les méthodes d'étalonnage	2
<b>2. LE TURBOMATRIX HS 16</b>	<b>4</b>
2.1. L'appareil	5
2.2. Les 3 étapes : standby (veille), pressurisation et échantillonnage	5
<b>3. LE CHROMATOGRAPHE</b>	<b>6</b>
3.1. Synoptique	6
3.2. Alimentation en gaz vecteur	6
3.3. Injecteurs	7
3.4. Four + colonnes	7
3.5. Le détecteur : TCD	7
<b>4. LES GRANDEURS CHROMATOGRAPHIQUES</b>	<b>8</b>

# 1. DÉFINITION

## 1.1. La CPG

En **Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)**, l'échantillon est vaporisé et injecté au sommet de la colonne. L'éluion est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile. Contrairement à la plupart des autres types de chromatographie, il n'y a pas d'interaction entre les molécules d'analyte et la phase mobile; sa seule fonction est de transporter l'analyte dans la colonne.

La **CGL** est basée sur le partage de l'analyte entre une phase gazeuse mobile et une phase liquide immobilisée sur la surface d'un support inerte.

En CPG, on ne peut pas a priori prévoir les temps de rétention des constituants d'un mélange. Il est donc nécessaire de commencer par effectuer l'analyse de solutions étalons des produits de référence. Lors de l'analyse du mélange, les conditions de **température** et de **pression**, les **conditions d'injection**, la **colonne** et le **détecteur** devront être strictement identiques.

## 1.2. Les méthodes d'étalonnage

### DOSAGE BASÉ SUR LA HAUTEUR DU PIC

La hauteur d'un pic s'obtient en joignant par une droite les lignes de base de part et d'autre du pic en mesurant la longueur de la verticale abaissée sur cette droite depuis le sommet du pic.

Cette mesure peut habituellement s'effectuer avec une bonne précision et elle conduit à des résultats exacts, à moins que des variations de fonctionnement de la colonne ne modifient la largeur du pic pendant le laps de temps nécessaire à l'obtention des chromatogrammes de l'échantillon et des étalons.

Les paramètres qui doivent être contrôlés soigneusement sont la température de la colonne, la vitesse d'écoulement de l'éluant et l'injection de l'échantillon.

L'influence de la vitesse d'injection de l'échantillon est particulièrement critique pour les 1<sup>er</sup> pics d'un chromatogramme. Des erreurs relatives de 5 à 10 % ne sont pas rares lorsque l'injection se fait à l'aide d'une seringue.

### DOSAGE BASÉ SUR L'AIRES DU PIC

L'aire du pic est indépendante des effets d'élargissement dus aux paramètres mentionnés dans le paragraphe précédent. C'est pourquoi, l'aire est un paramètre analytique plus satisfaisant que la hauteur. Par contre, la hauteur se mesure plus facilement, et pour les pics étroits, sa détermination plus exacte.

De nombreux appareils modernes sont équipés d'intégrateurs qui fournissent des mesures précises des aires relatives des pics.

### ÉTALONNAGE EXTERNE

⇒ On réalise un chromatogramme de référence, pour lequel on a injecté un volume V d'une solution de référence de cc  $C_{réf}$  et on repère l'aire  $A_{réf}$  du pic.

⇒ On réalise un chromatogramme de l'échantillon dans les mêmes conditions c.a.d injection du même volume V de l'échantillon dans le même solvant de cc  $C_{éch}$ , et on repère  $A_{éch}$  du pic :

$$C_{réf} = K.A_{réf} \quad \text{et} \quad C_{éch} = K.A_{éch}$$

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

La méthode sera d'autant meilleure que  $C_{\text{réf}}$  et  $C_{\text{éch}}$  sont du même ordre de grandeur et si l'on effectue plusieurs échantillons.

### ÉTALONNAGE À L'AIDE DE SOLUTIONS CONNUES (GAMME d'ÉTALONNAGE EXTERNE)

La méthode consiste à préparer une série de solutions étalons dont la composition est proche de la solution inconnue. À partir des chromatogrammes des solutions étalons, on établit un graphe des aires des pics ou de leurs hauteurs en fonction de la concentration  $C$  :

$$\text{Aire}_{\text{étalon}} = K_E \cdot C_{\text{étalon}}$$

La fonction ainsi obtenue doit être une droite qui passe par l'origine. Les analyses sont basées sur ce graphe, il faut donc fréquemment répéter l'étalonnage pour obtenir la meilleure exactitude.

La source d'erreur la plus importante propre à cette méthode est liée à l'incertitude sur le volume d'échantillon; il arrive aussi que la vitesse d'injection y contribue. Le volume des échantillons est habituellement petit ( $\cong 1 \mu\text{L}$ ) et les incertitudes relatives associées à l'injection de volumes reproductibles de cette taille à l'aide d'une microseringue peuvent être de l'ordre de plusieurs %. La situation est encore plus difficile en CPG où l'échantillon doit être injecté dans un sas porté à haute température. Dans ce cas l'évaporation qui se produit à l'orifice de l'aiguille peut entraîner de grandes variations du volume injecté.

### MÉTHODE DE L'ÉTALON INTERNE ou MARQUEUR CHROMATOGRAPHIQUE (GAMME ÉTALON avec ÉTALON INTERNE)

La meilleure précision en chromatographie quantitative s'obtient en utilisant des étalons internes, car on minimise les incertitudes introduites par l'injection de l'échantillon, la vitesse d'écoulement et les variations d'état de la colonne.

Dans cette méthode, une quantité soigneusement mesurée d'un étalon interne (constitué d'une substance non présente dans le mélange à analyser) est introduite dans chaque étalon et dans chaque échantillon; le rapport de l'aire (ou la hauteur) du pic de l'analyte à l'aire (ou la hauteur) du pic de l'étalon interne constitue le paramètre analytique.

$$\frac{\text{Aire}_{\text{analyte}}}{\text{Aire}_{\text{étalon interne}}} = K_I \cdot \frac{C_{\text{analyte}}}{C_{\text{étalon interne}}}$$

Pour que cette méthode fournisse de bons résultats, il faut que le pic de l'étalon interne soit bien séparé des pics de tous les autres constituants présents dans l'échantillon, mais il doit être proche du pic de l'analyte.

L'utilisation d'un étalon interne bien adapté peut conduire à des précisions relatives de 0,5 à 1 %.

## 2. LE TURBOMATRIX HS 16

### 2.1. L'appareil

La chromatographie en phase gazeuse associée à l'espace de tête constitue une technique d'analyse inégalée pour les applications impliquant l'extraction sans solvant de composés volatils.



#### Technologie à balance de pression unique et brevetée

Particulièrement innovant, l'échantillonnage à balance de pression évite l'utilisation de vannes multivoies, réduisant ainsi le nombre de composants entrant en contact avec l'échantillon. La distorsion de pics due à l'adsorption ou aux volumes morts de seringues est totalement supprimée. Les risques d'effets mémoire sont également éliminés. Vous bénéficiez ainsi d'une précision optimale, sans devoir recourir à des blancs pour purger le système.

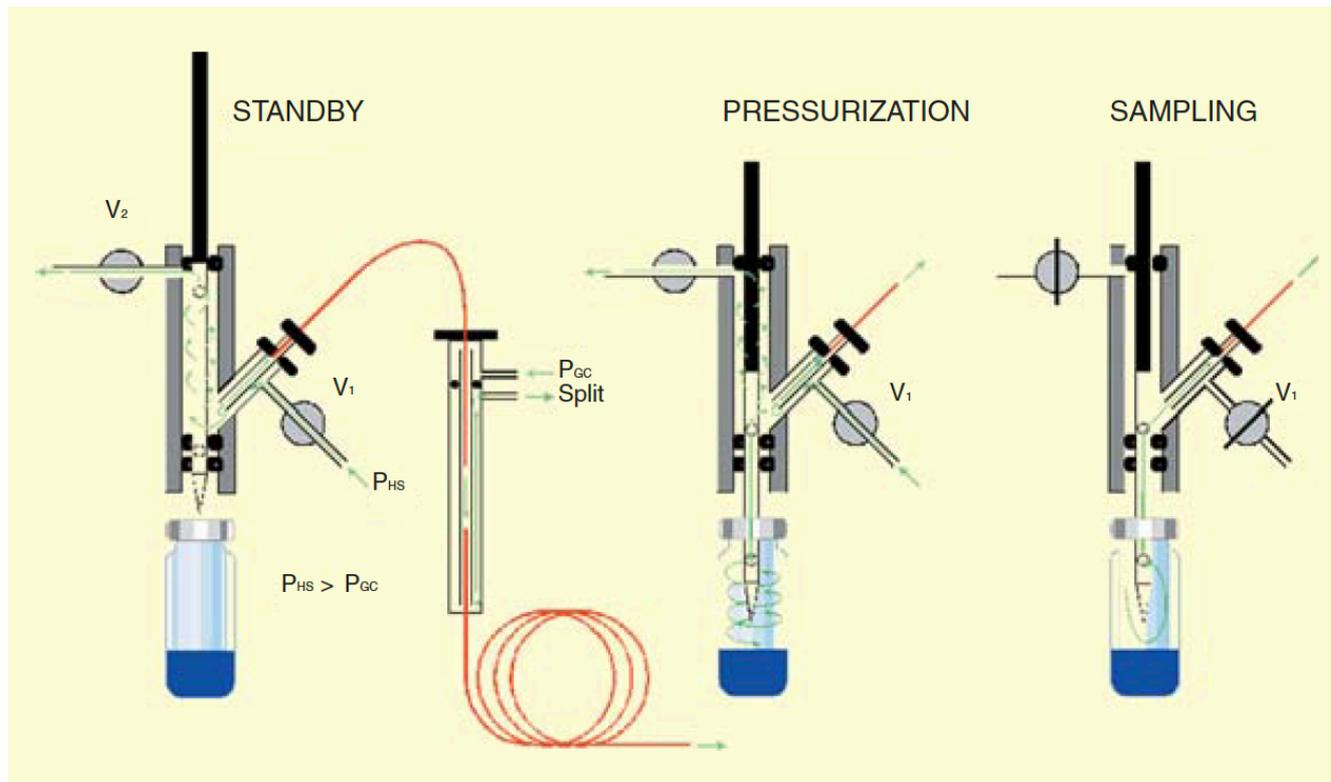
#### Circuit de passage d'échantillon inerte

La colonne analytique ou la ligne de transfert en silice fondue désactivée est directement connectée à la tête d'échantillonnage pour constituer un circuit d'analytes véritablement inerte. Ceci réduit au maximum les risques de contamination croisée et les pertes d'analyte pour une meilleure intégrité des échantillons dans toutes les applications.

## 2.2. Les 3 étapes : standby (veille), pressurisation et échantillonnage

La technologie à équilibre de pression en détail

Exclusivité de PerkinElmer, cette technologie permet d'introduire les échantillons dans la colonne sans recourir à une seringue à gaz ou à des vannes multivoies. Au lieu de cela, les pressions des gaz vecteurs sont utilisées avec précision pour gérer le transfert, éliminant ainsi la plupart des sources de variabilité et de contamination inhérentes aux autres systèmes.



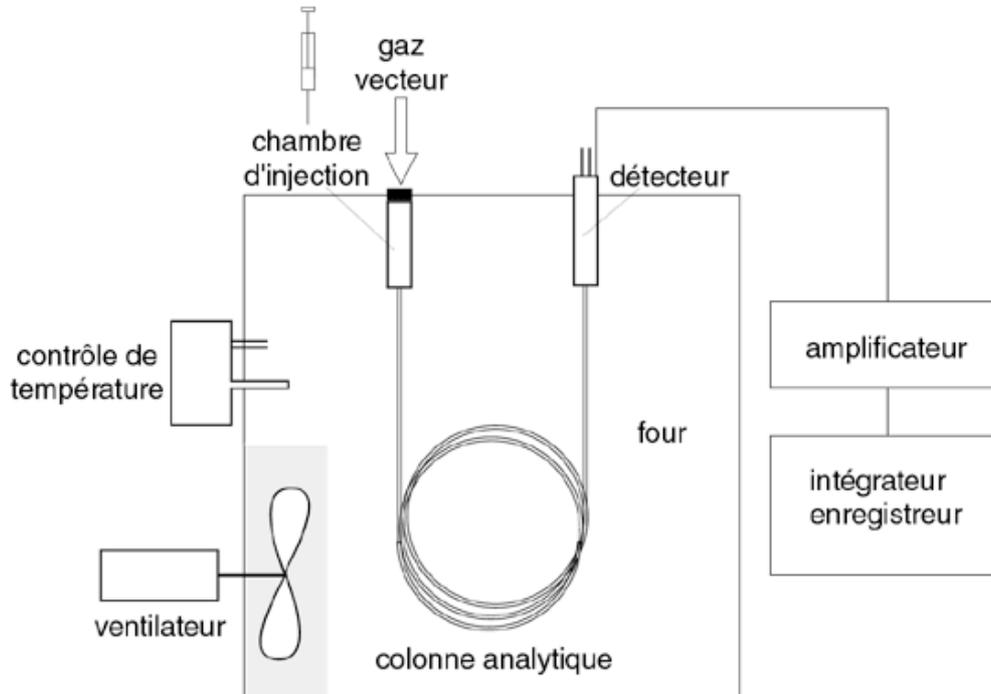
La zone de l'aiguille est chauffée en permanence et est constamment exposée à un gaz vecteur afin d'éviter toute contamination. La colonne ou la ligne de transfert sont connectées directement sur l'aiguille, générant une inertie maximum et des volumes morts minimales.

Tous les flacons sont pressurisés de manière identique. La reproductibilité et la précision obtenues sont optimales, quelle que soit la pression d'équilibrage.

Une électrovanne interrompt le flux de gaz vecteur et le flacon agit alors comme un réservoir de gaz vecteur. Durant l'injection, à mesure que la pression diminue, le volume d'échantillon est transféré vers la colonne. Ceci évite la dilution de l'échantillon par le gaz vecteur et évite son expansion avant l'injection.

# 3. LE CHROMATOGRAPHE

## 3.1. Synoptique



## 3.2. Alimentation en gaz vecteur

Les gaz vecteurs (ou gaz porteur) doivent être chimiquement inertes, comme c'est le cas pour He, Ar, N, CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>.

**L'hélium est la phase mobile employée dans notre cas.** C'est un hélium 4,6, c'est-à-dire certifié pure à 99,996 %.

Le choix du gaz est souvent dicté par le type de détecteur utilisé. À l'alimentation en gaz sont associés des régulateurs de pression, des jauges et des débitmètres, et souvent un tamis moléculaire qui élimine l'eau et d'autres impuretés.

Le débit est généralement contrôlé par le régulateur de pression à 2 étages qui équipe le cylindre à gaz et l'une ou l'autre sorte de régulateur de pression ou de flux (EFC : Electronic Flow Control) qui fait partie intégrante du chromatographe.

La pression en sortie de cylindre à He est de 100 bar. La pression d'admission est de 5 bar, avec des débits de l'ordre de 5 à 10 mL/min pour les colonnes mégabore, telle que celles que l'on utilise.

### 3.3. Injecteur

L'efficacité de la colonne nécessite que l'échantillon occupe un volume adéquat. On l'introduit sous forme d'un "bouchon" de vapeur; l'introduction trop lente d'échantillon volumineux cause un élargissement des pics et réduit la résolution. La méthode la plus courante consiste à utiliser une microseringue avec laquelle on injecte l'échantillon liquide ou gazeux à travers un diaphragme ou septum en élastomère dans une chambre à vaporisation instantanée située au sommet de la colonne.

La chambre d'injection est habituellement maintenue à environ 50 °C au-dessus du point d'ébullition du constituant le moins volatil de l'échantillon.

Pour injecter, toujours prélever 1 µL d'air, 1 µL de produit et 1 µL d'air (l'air étant un produit non retenu le long de la colonne, va permettre de déterminer le temps mort de celle-ci). Il faut ensuite placer l'aiguille à la verticale de l'injecteur en la guidant avec les deux mains, puis appuyer à fond sur l'injecteur, et enfin appuyer délicatement sur le piston (sous peine de tordre celui-ci).

### 3.4. Four + colonnes

La température de la colonne est un paramètre important qui doit être contrôlé à qq dixièmes de degré. C'est pourquoi, on place la colonne dans une enceinte thermostatique. La température optimale de la colonne dépend du point d'ébullition de l'échantillon et du degré de séparation requis. En général, une température égale ou légèrement supérieure au point d'ébullition moyen de l'échantillon conduit à un temps d'élution raisonnable (de 2 à 30 min).

### 3.5. Le détecteur : TCD

Le TCD, ou catharomètre, fut l'un des 1er détecteurs employés. Cet instrument, toujours largement utilisé, est basé sur la mesure des variations de la conductivité thermique d'un flux gazeux liées à la présence de molécules d'analyte.

La partie sensible du TCD consiste en un élément chauffé électriquement, dont la température à courant constant dépend de la conductivité thermique du gaz environnant.

**L'élément chauffé peut être un filament de Pt, Au ou W, ou une thermistance semi-conductrice.**

La valeur de la résistance du filament ou de la thermistance est une fonction de la température, qui dépend notamment de la vitesse à laquelle les molécules de gaz environnant évacuent par conduction l'énergie thermique de l'élément détecteur vers les parois d'un bloc métallique dans lequel il est placé.

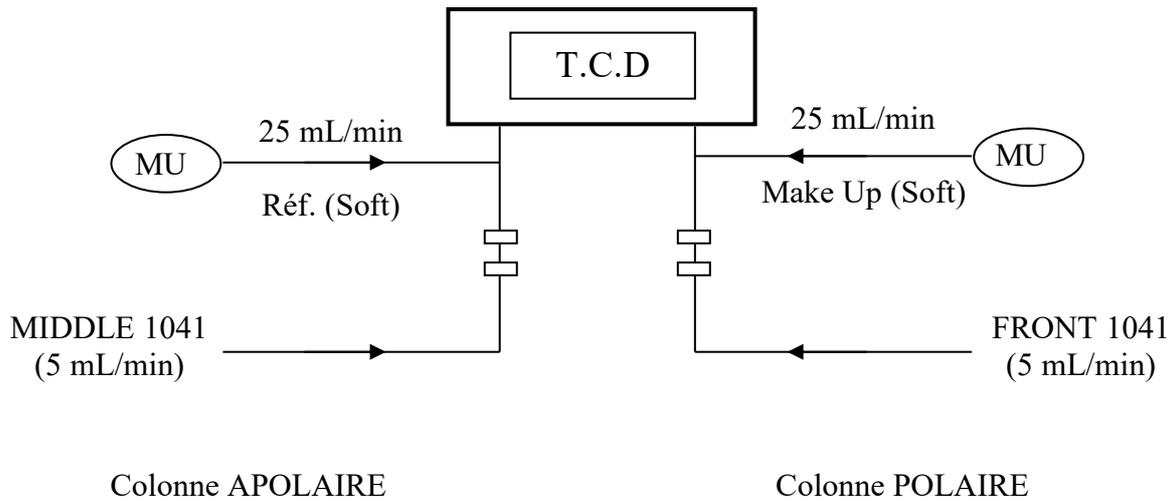
**Dans les appareils de chromatographie, on emploie un système de détection différentiel dont un élément est placé dans le flux gazeux en amont et l'autre en aval de la colonne. L'effet de la conductivité thermique du gaz vecteur s'annule, et les fluctuations du débit, de la pression et du courant électrique sont minimisés.**

**On compare généralement les résistances des détecteurs couplés en les incorporant dans les 2 bras d'un pont de Wheatstone.**

Les conductivités thermiques de H<sub>2</sub> et He sont environs 6 à 10 fois plus grandes que celles de la plupart des composés organiques. Dès lors, la présence de molécules organiques, même en faible quantité, entraîne une ↘ importante de la conductivité thermique de l'éluat; il en résulte une ↗ notable de la température du détecteur.

Les conductivités de la plupart des autres gaz vecteurs sont trop proches de celles des constituants organiques; c'est pourquoi l'utilisation d'un détecteur à conductivité thermique impose l'utilisation de H<sub>2</sub> ou He.

Les avantages d'un TCD sont sa simplicité, son large domaine dynamique de linéarité ( $\approx 10^5$ ), sa réponse générale aux espèces organiques et inorganiques, et son caractère non destructif qui permet de collecter les solutés après leur détection. Sa sensibilité est faible ( $\approx 10^{-8}$  g de soluté / mL de gaz vecteur).



Pour qu'un TCD puisse fonctionner, il faut au moins un débit de 30 mL/min d'où l'intérêt du make up. Lorsqu'il y a 2 colonnes, il faut au niveau logiciel une valeur de débit identique sur la réf et le MU afin que la somme totale soit toujours de 30 mL/min.

## 4. LES GRANDEURS CHROMATOGRAPHIQUES

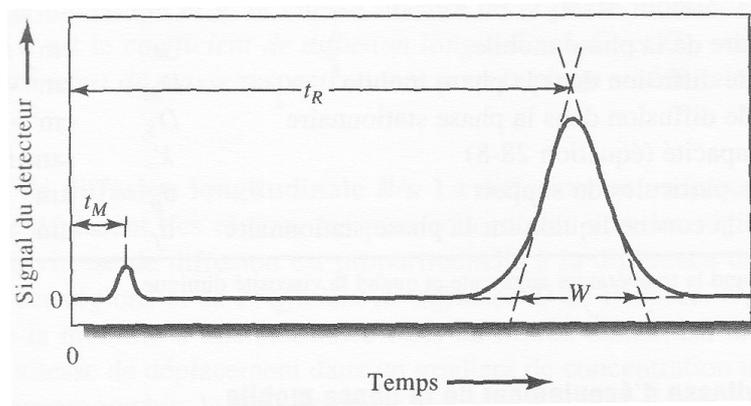
La CPG est une méthode d'analyse physico-chimique. On sépare les constituants d'un mélange (les solutés) par entraînement au moyen d'une **phase mobile** (gaz vecteur) le long d'une **phase stationnaire** (liquide (plutôt gomme) fixée sur de la silice), grâce à la répartition sélective des solutés entre ces deux phases.

Chaque soluté est donc soumis à une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et une force de mobilité (due à la phase mobile).

En pratique, on s'intéresse ici à des composés volatiles non thermosensibles. Ils sont injectés à l'aide d'une micro-seringue) dans une chambre d'injection chauffée bien au-dessus de la température d'ébullition des composés du mélange. Après cette volatilisation rapide des produits, ils sont poussés par le gaz vecteur (ici de l'hélium) vers la colonne analytique.

Selon leur affinité respective avec la phase stationnaire, ils avanceront plus ou moins vite. À la sortie de la colonne on détecte les produits à l'aide d'un catharomètre (TCD) qui renvoie une tension proportionnelle à la quantité de produits qui passe.

Le signal obtenu est traité par un intégrateur. Celui-ci trace l'évolution de ce signal au cours du temps. On obtient alors un chromatogramme. Les produits bien séparés sortent idéalement sous la forme d'une gaussienne.



Détermination de l'écart-type  $\tau$  d'un pic chromatographique :  $W = 4\tau$ .

Le premier pic dans notre cas, sera le pic de l'air, l'air n'étant pas retenu par la phase stationnaire cela correspond au temps mort noté  $t_M$  (temps mis par une espèce non retenue pour parcourir le système chromatographique depuis l'injecteur jusqu'au détecteur).

Les pics des produits sont caractérisés par :

- ☞ leur temps de rétention (temps de sortie des produits) noté  $t_R$  ;
- ☞ Leur largeur à mi-hauteur  $\Delta$ , leur écart-type  $\tau$ , ou leur largeur à la base du pic  $W$ .

On utilise, aussi, d'autres grandeurs qui caractérisent un pic que vous verrez en cours :

- ☞ le facteur de capacité  $k'$

Le **facteur de capacité (rétention)** ou **coefficient de distribution massique** (UICPA) (à ne pas confondre avec la "capacité de la colonne" qui exprime la quantité maximale de substance qu'elle peut fixer) est un paramètre expérimental important qui permet de décrire la vitesse de progression des solutés dans les colonnes. Le facteur de capacité  $k'_A$  est défini en termes de **quantités du soluté A** par :

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Lorsque  $k'_A \ll 1$ , l'élution est si rapide qu'il est difficile de déterminer le temps de rétention exact. Par contre, si  $k'_A \geq 20$  ou  $30$ , les durées d'élution deviennent exagérément longues.

Les séparations s'effectuent de manière optimale lorsque les valeurs de  $k'_A$  des divers solutés du mélange considéré sont comprises entre 1 et 5.

En CPG, on peut modifier  $k'_A$  en agissant sur la température et le remplissage de la colonne.

En CPL, les facteurs de capacité peuvent être souvent optimisés en agissant sur la composition de la phase mobile et de la phase stationnaire.

☞ Le nombre de plateaux théoriques tel que :  $N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{W}\right)^2 = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{\Delta}\right)^2$

Ce nombre caractérise l'efficacité de la colonne pour la séparation : plus il est grand mieux c'est.

☞ La Hauteur Equivalente à un Plateaux Théorique HEPT telle que  $H = \frac{L}{N}$

Plus elle est petite, mieux c'est.

D'autres grandeurs vont caractériser la séparation entre deux produits :

☞ La sélectivité notée  $\alpha$  telle que  $\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{t_{R_B} - t_M}{t_{R_A} - t_M}$  avec  $t_{R_B} > t_{R_A}$ .

Plus cette grandeur est supérieure à 1, meilleure sera la séparation.

☞ La résolution notée  $R_S$  telle que  $R_S = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$

On considère que la séparation est acceptable si  $R_S > 1,5$ .

Optimisation : pour optimiser une séparation :

☞ Choix de la colonne : les colonnes apolaires vont en général séparer les produits selon leur température d'ébullition (s'ils sont de polarité proche), les colonnes polaires vont retenir plus les composés polaires (qui se ressemble s'assemble).

☞ On règle le débit pour avoir la HEPT la plus petite.

☞ On règle la température pour avoir le temps d'analyse le plus court avec une résolution supérieure à 1,5.