

2^{ème} année BTS Bioanalyses
en Laboratoire de Contrôle

Théorie CPG



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

l.godin@etsl.fr

TP n°6 : QUALIFICATION d'une CPG

1. DEFINITION	2
1.1. La CPG	2
1.2. Les méthodes d'étalonnage	2
2. LA QUALIFICATION	4
2.1. Introduction	4
2.2. Les différents types de qualification	4
2.3. Design Qualification	4
2.4. Qualification d'Installation	5
2.5. Qualification Opérationnelle	5
2.6. Qualification de Performance	5
2.7. Périodicité des qualifications	6
3. LE CHROMATOGRAPHE	7
3.1. Synoptique	7
3.2. Alimentation en gaz vecteur	7
3.3. Injecteurs	8
3.4. Four + colonnes	8
3.5. Le détecteur : TCD	8
4. LES GRANDEURS CHROMATOGRAPHIQUES	9

1. DÉFINITION

1.1. La CPG

En **Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)**, l'échantillon est vaporisé et injecté au sommet de la colonne. L'élution 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^{er} 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'AIRE 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 $C_{\text{réf}}$ et on repère l'aire $A_{\text{réf}}$ 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 $C_{\text{éch}}$, et on repère $A_{\text{éch}}$ du pic :

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

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

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. LA QUALIFICATION

2.1. Introduction

La qualification, ou validation (selon la terminologie européenne ou américaine), est une demande de plus en plus courante des industries.

Elle se doit, en accord avec l'assurance qualité et les BPL (Bonnes Pratiques de Laboratoire), de vérifier que l'appareil a été conçu et fabriqué selon un protocole bien spécifique, et qu'il répond à des caractéristiques fonctionnelles et opérationnelles concordantes avec les attentes de l'assurance qualité.

La livraison de l'appareil doit être vérifiée et il doit être installé selon un protocole strictement défini. La conformité des performances de cet appareil doit alors être vérifiée ainsi que tout au long de son utilisation selon un plan de qualification, comprenant les instructions de maintenance et toutes les opérations permettant d'assurer une performance dans la durée.

Ce document a été conçu de manière à prouver à notre clientèle que nous pouvons répondre à toutes ses attentes quant au choix du fournisseur et du matériel.

Il permet également de guider nos clients dans les vérifications qui sont à faire durant la vie de l'appareil, et de leur fournir une documentation structurée, sous forme d'un classeur qui, outre les documents remplis et signés à l'installation, pourra recevoir toutes les pièces nécessaires au processus de qualification.

2.2. Les différents types de qualification

La qualification, spécifique à un appareil, se décline en quatre parties :

- Qualification de la conception (Design Qualification ou DQ).
- Qualification d'Installation (IQ).
- Qualification Opérationnelle (OQ).
- Qualification des Performances (PQ).

2.3. Design Qualification

Ce terme regroupe la validation de la conception et du développement du matériel. Dans ce cadre, il appartient à l'utilisateur de démontrer que le matériel choisi répond bien à ses besoins, à la fois opérationnels et fonctionnels.

Il appartient au constructeur de fournir au client des détails sur le développement du matériel, et en particulier sur les points suivants :

- L'utilisation d'un plan d'établissement des spécifications.
- L'existence d'un contrôle qualité parfaitement documenté ainsi que des procédures d'assurance qualité.
- La qualification du personnel.
- Les plans de test du système.

La rigueur du contrôle des modifications, l'enregistrement des erreurs et les procédures correctives

2.4. Qualification d'Installation

La qualification d'installation est la preuve documentée que l'appareil ou l'équipement est installé conformément aux spécifications techniques.

Elle se traduit par une série de vérifications mécaniques, en statique, des sous-systèmes ou équipements, une vérification de l'environnement de l'instrument, ainsi que la compilation des documents remis par le fournisseur. Cela constitue la preuve de la conformité du matériel.

La qualification d'installation est sous la responsabilité de l'utilisateur. Toutefois, ces aspects sont généralement traités par le fournisseur. La responsabilité finale de contrôler la réception des différents matériels, logiciels et documentations appartient à l'utilisateur.

2.5. Qualification Opérationnelle

La qualification opérationnelle est la preuve documentée établissant que l'appareil est capable de fonctionnements répétés dans les limites déterminées par le cahier des charges du constructeur.

Elle se traduit par une série d'essais, en dynamique, des sous-systèmes.

La qualification opérationnelle, qui doit se faire avant toute utilisation en routine, peut être effectuée directement après la Qualification d'Installation.

La qualification opérationnelle est de la responsabilité de l'utilisateur. Toutefois, la plupart des tests sont généralement effectués par le fournisseur.

2.6. Qualification de Performance

Dans le cadre d'une utilisation très spécifique, il peut être nécessaire de réaliser d'autres tests que ceux recommandés par le fournisseur. Il appartient dans ce cas à l'utilisateur de les mettre au point et de les réaliser.

La qualification des performances est la preuve documentée que le système, dans son ensemble, est capable de fonctionnements répétés appropriés à son utilisation en routine. Elle doit être effectuée, tout au long de la vie de l'appareil, par les utilisateurs, selon un plan de qualification bien défini.

Scion Instruments peut fournir au client des indications sur la manière de vérifier et de maintenir les performances

Il appartient à l'utilisateur de définir les tests qui lui sont nécessaires pour démontrer que son système fonctionne correctement.

Il s'agit de répertorier, par exemple :

- les tests spécifiques à chaque sous-ensemble.
- les tests de l'ensemble de l'appareil.
- leur fréquence (à la fois en routine et à chaque occasion particulière le nécessitant).
- les instructions inhérentes aux tests.
- les résultats attendus.
- les critères d'acceptation.

- le mode de documentation des tests.
- la qualification requise par l'opérateur.
- les actions à prendre en cas d'échec au passage du test.

2.7. Périodicité des Qualifications

La qualification doit se faire dès l'installation de l'appareil, afin de pouvoir effectuer les analyses de routine dans les meilleures conditions possibles.

La requalification périodique est destinée à redonner une garantie de fiabilité de l'appareil :

- à intervalles réguliers.
- lors de l'addition d'un nouvel accessoire ou module.
- lors d'une modification apportée à l'appareil.
- après le remplacement d'une pièce majeure de l'appareil.
- après une période prolongée de non utilisation.
- à l'occasion d'un déplacement de l'instrument.

L'initiative de la requalification est laissée à l'utilisateur, en accord avec son assurance qualité.

Comme toutes les opérations de qualification, celle-ci peut être réalisée par Scion Instruments. Les tests réalisés sont alors identiques à ceux effectués lors de la première qualification (uniquement ceux de la partie Qualification Opérationnelle).

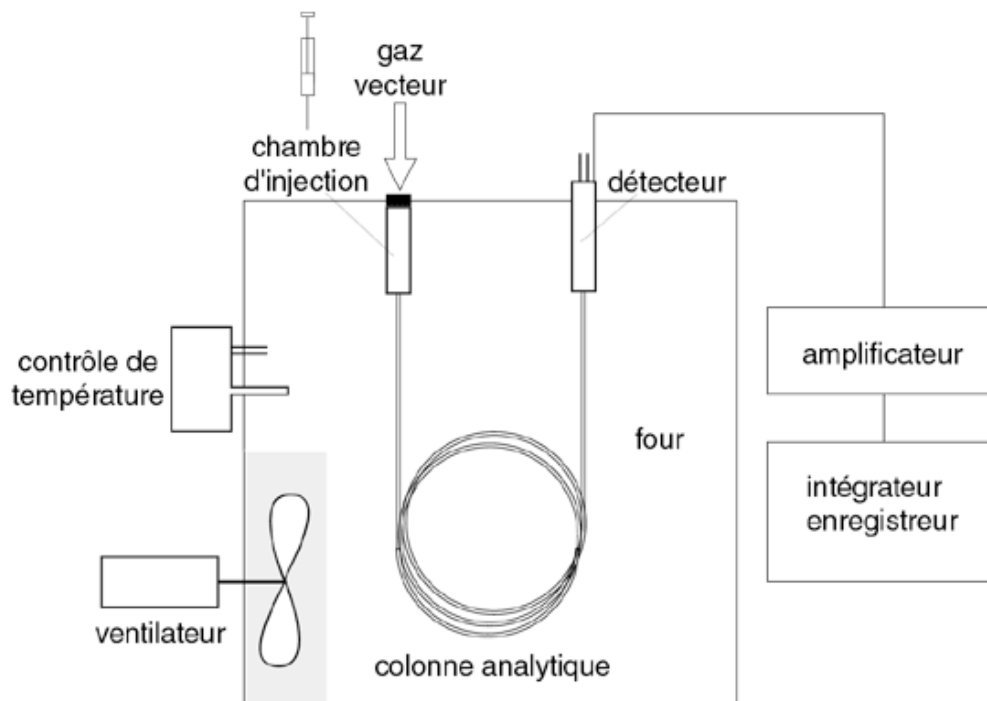
Il est essentiel de suivre les performances d'un instrument dans la durée, de manière à s'assurer de la validité des résultats analytiques. En pratique, **les requalifications sont généralement effectuées une fois par an.**

Cependant, un instrument vieillit, et il se peut que certaines de ses performances changent au cours du temps. Il appartient au client de déterminer quelles spécifications sont requises et significatives pour les analyses dont il a la charge. Il déterminera un seuil acceptable en tenant compte de ses propres conditions expérimentales et de l'environnement.

Si les résultats de la qualification sont en dehors des limites fixées par l'utilisateur, les performances de l'instrument peuvent être restaurées, dans certains cas, par une action corrective telle que le remplacement d'un sous-ensemble. Ces prestations de rénovation ne sont pas incluses dans les contrats de maintenance ou de qualification

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, CO₂ et H₂.

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 qqs 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.

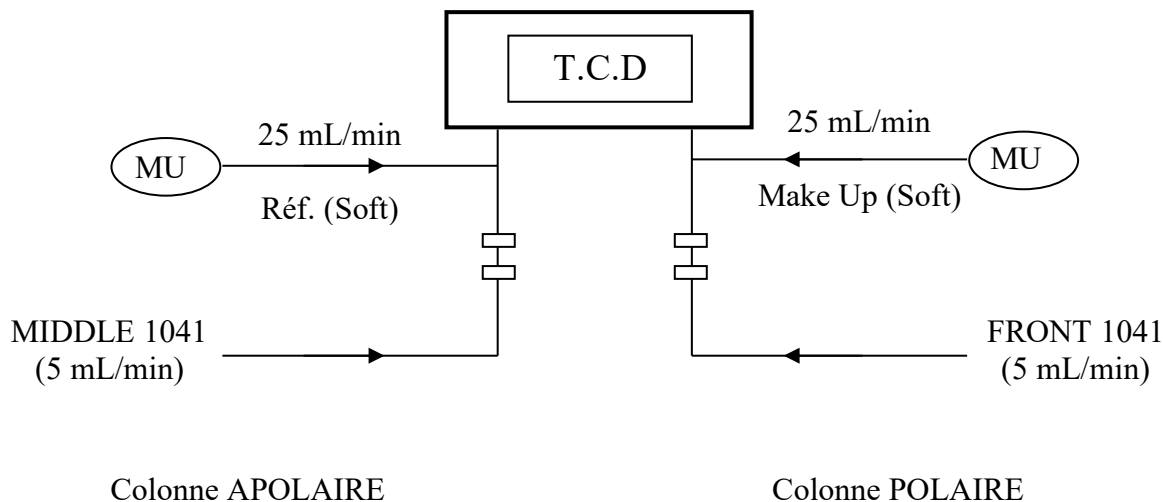
Dans les appareils de chromatographie, on emploie un système de détection différentiel dont un élément est placé dans le flux gazeux en amont et l'autre en aval de la colonne. L'effet de la conductivité thermique du gaz vecteur s'annule, et les fluctuations du débit, de la pression et du courant électrique 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 H₂ 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 H₂ 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

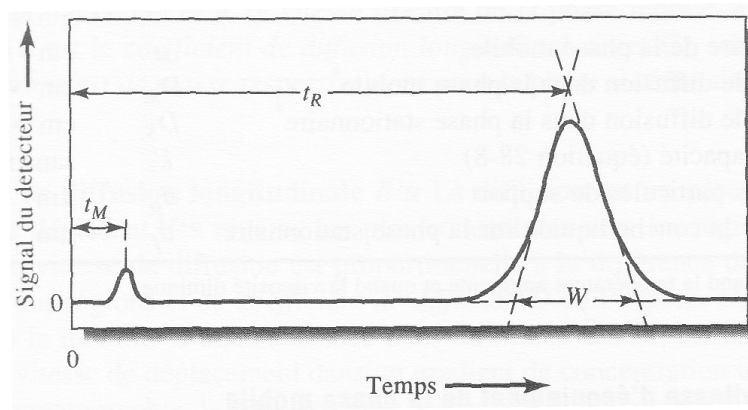
La CPG est une méthode d'analyse physico-chimique. On sépare les constituants d'un mélange (les solutés) par entraînement au moyen d'une **phase mobile** (gaz vecteur) le long d'une **phase stationnaire** (liquide (plutôt gomme) fixée sur de la silice), grâce à la répartition sélective des solutés entre 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 τ 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 Δ , leur écart-type τ , 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 : $N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_R}{\Delta} \right)^2$

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 α 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 ressemblent s'assemblent).

☞ 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.