

# Chapitre V. Méthodes physico-chimiques d'analyse des médicaments

---

## 2. Méthodes chromatographiques : Chromatographie en phase gazeuse

Dr. FIZIR MERIEM

## Chromatographie en phase gazeuse

### I. Définition

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique de séparation applicable aux composés gazeux ou susceptible d'être volatilisés par élévation de température sans décomposition (dont la masse moléculaire  $MM < 300$ ) ; les constituants peuvent différer par leur nature et leur volatilité. La séparation exige des quantités de l'ordre de mg seulement ; parfois même de  $\mu\text{g}$ .

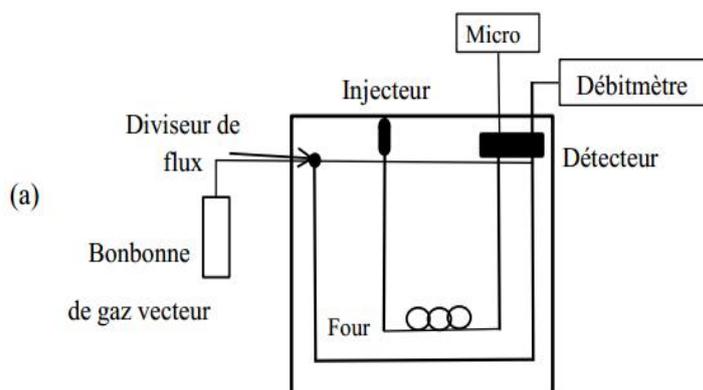
On distingue selon la phase stationnaire:

**Chromatographie de partage :** La chromatographie gaz-liquide : la phase stationnaire est un liquide immobilisé sur un support solide par imprégnation ou par greffage.

**Chromatographie d'adsorption :** La chromatographie gaz-solide : la phase stationnaire est un solide poreux, réservé à l'analyse de mélanges de gaz ou de liquides à bas points d'ébullition.

### II. Principe de la technique et appareillage

En CPG la phase mobile est un gaz, ce fluide traverse une colonne renfermant des granules poreux qui constitue la phase stationnaire. Lorsque un échantillon à analyser est injecté et vaporisé ; ces constituants sont entraînés à des vitesses inégales par la phase mobile, à la sortie de la colonne se trouve un détecteur relié à un enregistreur. L'appareillage employé pour effectuer la séparation est un chromatographe dont la figure 1 présente schématiquement les principaux éléments.



(b)



**Fig.1** (a) et (b) schéma et photo d'un appareil de chromatographie gaz

## II.1. Gaz vecteur

L'élution est assurée par un flux de gaz inerte appelé gaz vecteur ou porteur (phase mobile). Le gaz vecteur doit être pur, inerte (il ne doit pas réagir avec les constituants du mélange à séparer) et le moins miscible possible avec la phase stationnaire. L'hélium est le gaz porteur le plus courant, bien que l'on utilise aussi l'argon, l'azote et l'hydrogène. Le choix du gaz vecteur est conditionné par l'efficacité de la séparation et la sensibilité du détecteur.

- ✚ Catharomètre :  $N_2$ ,  $H_2$ , He
- ✚ Capture d'électron :  $N_2$  ou  $H_2$
- ✚ ionisation de flamme :  $N_2$

Il n'y a pas d'interaction entre le soluté et la phase mobile en CPG.

## II.2. Injecteur

Le système d'injection permet l'introduction de l'échantillon dans le chromatographe, par l'intermédiaire d'une micro-seringue dont la capacité varie habituellement de 1 à 10  $\mu\text{L}$ . Le système d'injection joue plusieurs rôles, que l'échantillon se trouve sous forme solide, liquide ou gazeux:

- ✚ Rôle d'interface qui permet d'introduire l'échantillon dans le chromatographe
- ✚ Rôle de système de vaporisation (dans le cas d'un échantillon liquide ou solide)
- ✚ Rôle d'organe de transfert dans la colonne chromatographique.

Il y'a plusieurs mode d'injections

### 1. Injection par vaporisation directe

L'introduction du mélange se fait par l'intermédiaire d'une micro seringue dont le volume varie généralement de 1 à 10  $\mu\text{L}$  et dont l'aiguille a un diamètre de l'ordre de 0,15 mm 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. Ce système est conçu pour les colonnes remplies.

### 2. Injection « split/splitless »

Les systèmes d'injection pour colonnes capillaires sont:

- ✚ les diviseurs d'entrée ou splitter (split)
- ✚ le splitless

Il s'agit d'injecteurs pouvant fonctionner suivant deux modes, avec ou sans division (encore appelés split ou splitless).

En mode split, le gaz vecteur arrive avec un grand débit dans la chambre de vaporisation ; une vanne de fuite sépare le courant gazeux en deux parties dont la plus petite est la seule à pénétrer dans la colonne. Seulement 1% de l'échantillon injecté passe réellement sur la colonne. L'autre partie (99%) s'échappe par un système de fuite. Ce mode est utilisé dans le cas des colonnes capillaires à faible débit.

L'inconvénient de ce mode d'injection est l'évaporation sélective des composés les plus volatils avec modification de la composition réelle de l'échantillon injecté.

Le mode splitless la solution injectée est volatilisé puis entraîné dans les premières spires de la colonne capillaire où elle se condense. L'injecteur est ensuite balayé par le gaz vecteur qui élimine l'excès de solvant. Ce procédé est réservé aux échantillons très dilués.

### II.3. Four

Le four est une enceinte thermostatée dans laquelle se trouve la colonne possédant un système de ventilation. Au lieu de maintenir la température constante on peut l'astreindre à

suivre une loi de variation donnée, généralement linéaire, pour obtenir une chromatographie à température programmée.

#### II.4. Colonne

On distingue trois types de colonnes.

##### a) Colonne remplie (à garnissage)

Existant depuis les débuts de la CPG, elles sont faites avec des tubes spiralés le plus souvent en acier ou plus rarement en verre, de diamètre intérieur de 2 à 6 mm, ont une longueur comprise entre 1 et 3 m et sont enroulées sous forme hélicoïdale. Elles sont remplies d'un support poreux, inerte et stable à température élevée, imprégné de 5 à 20% de phase stationnaire (Fig.3 et 4).

Le support le plus utilisé est la terre de diatomées (silicates fossiles)

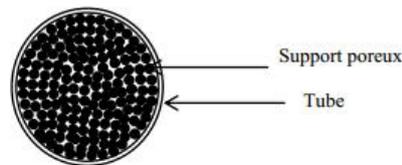


Fig.3 Colonnes remplies

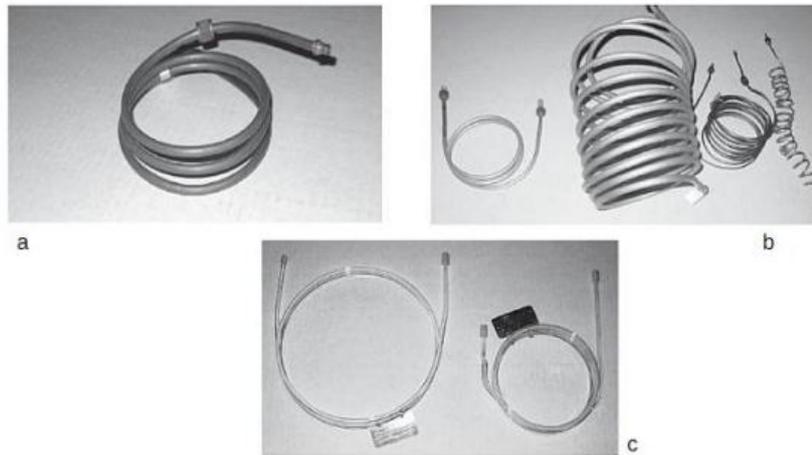
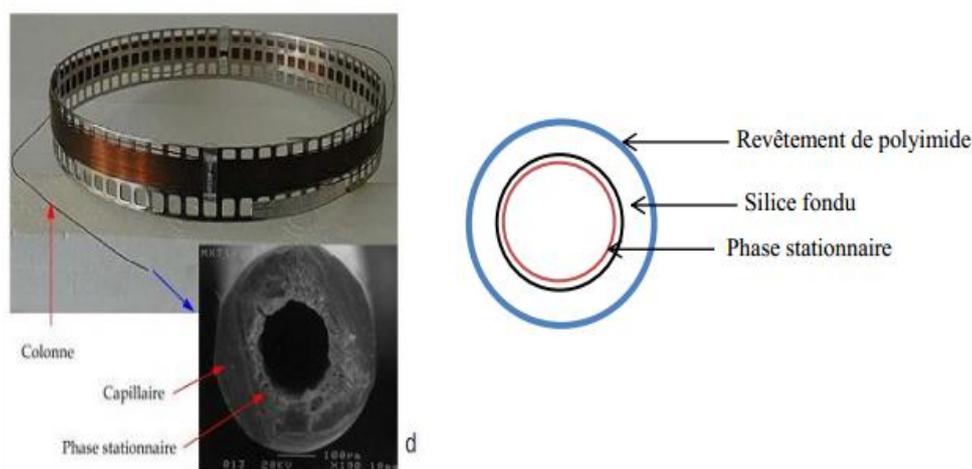


Fig.4 Photo colonnes remplies a) Cuivre 2m x 6,4 mm; b) Aluminium 6m x1cm c) Verre 2m x 0,25 d.e

##### b) Colonne capillaire

Les colonnes capillaires ont un diamètre interne variant entre 0,05 et 0,35 mm et une longueur comprise entre 10 et 50 m enroulés on spirale. Elles sont revêtues d'une couche de polymère ou d'un film d'aluminium et sont enroulées sur un support métallique

cylindrique léger, en forme de cage. Il n'y a alors pas de remplissage: la phase stationnaire ou l'adsorbant est déposée ou greffée sur la paroi interne de la colonne (sur la figure 5 on observe la phase stationnaire déposée sur le métal). La faible quantité de phase stationnaire permet des analyses rapides mais impose l'injection d'une quantité très faible d'échantillon  $<1\mu\text{g}$ .



**Fig.5** photo, schéma d'une colonne capillaire et microphotographie électronique à balayage de son extrémité.

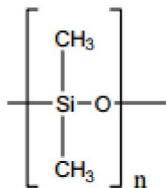
### c) Colonne semi-capillaire

Elles sont constituées d'un tube de silice de 0,53 mm de diamètre interne et ont une longueur variant de 5 à 50 m. Elles remplacent, à l'heure actuelle, les colonnes à remplissage sur les chromatographes anciens, tout en conservant les mêmes injecteurs et détecteurs. Elle supporte l'injection d'une quantité plus grande d'échantillon qu'une colonne capillaire mais la résolution est moins bonne (plus le diamètre d'une colonne est faible, meilleure est la résolution). La colonne, enroulée sous forme hélicoïdale, est reliée à l'injecteur à l'une de ses extrémités et au détecteur à l'autre.

### II.5. Phase stationnaire

Les phases stationnaires les plus courantes, classées par ordre de polarité croissante et leurs noms commerciaux sont :

#### 🚩 Phases apolaires 100% méthyle silicone



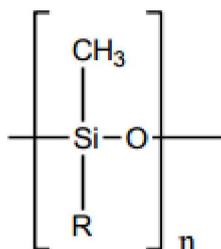
SE-30 (30 à 350°C) n=15000-35000

OV-1 (100 à 350°C) n=40000-50000

OV-101 (0 à 350°C) n= 400

Le SE-30, l'OV-1 et OV-101, diméthyle siloxanes, se différencient par leur nombre de groupement diméthyle silyle. L'OV-101 en possédant moins, a une température d'utilisation la plus basse.

#### ✚ Méthyl-phényl ou compositions diverses



Avec R = phényl, vinyl, cyanopropyl, cyanoéthyl

SE-52, OV-73 respectivement 5% et 5% phényl

SE-54, OV-73 5% phényl, 1% vinyl

OV-1701 7% phényl, 7% cyanopropyl

Le pourcentage donne dans chaque cas la fraction de groupements méthyle remplacés par le groupement indiqué sur le squelette polysiloxanes. Pour le SE-52 le 5% polydiméthylphényl siloxane a un cycle phényle lié à 5% des atomes de silicium du polymère.

#### Phases peu polaires

L'OV-7 et l'OV-17 méthyle phényle silicone, sont de polarité moyenne

OV-7 20% phényl, 80% vinyl

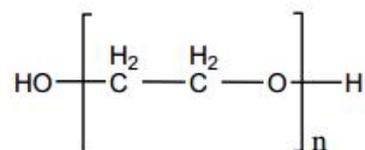
OV-17 50% phényl, 50% vinyl

### Phases polaires

Ce sont des dérivés de glycols, utilisés pour séparer les molécules de forte polarité

OV-275 (50 à 225°C), 100% cyanopropyl silicone

Les polyéthylènes glycols (Carbowax 20M)



Polyéthylène glycol

### Exemple

Un mélange d'heptane, propanol-1 et pentanol sont élués dans cet ordre lorsqu'on utilise une phase stationnaire polaire telle que le Carbowax. Cet ordre est inversé quand on utilise une phase stationnaire non polaire telle que le polydiméthyl siloxane.

#### 1. Phase stationnaire polaire

Substance	Propanol-1	Pentanol	Heptane
Point d'ébullition	97	137	98
Ordre de sortie	2	3	1

#### 2. Phase stationnaire apolaire

Substance	Propanol-1	Pentanol	Heptane
Point d'ébullition	98	126	97
Ordre de sortie	2	1	3

## II.6. Les systèmes de détecteurs

### - Quelques définitions

**Limite de détection (LD)** : est la quantité de soluté requise pour avoir un rapport signal bruit au moins égal à 3.

**Limite de quantification (LQ)** : est la quantité de soluté requise pour avoir un rapport signal bruit au moins égal à 10.

**Domaine de linéarité (LL)** : domaine dans lequel la réponse du détecteur est directement proportionnelle à la concentration.

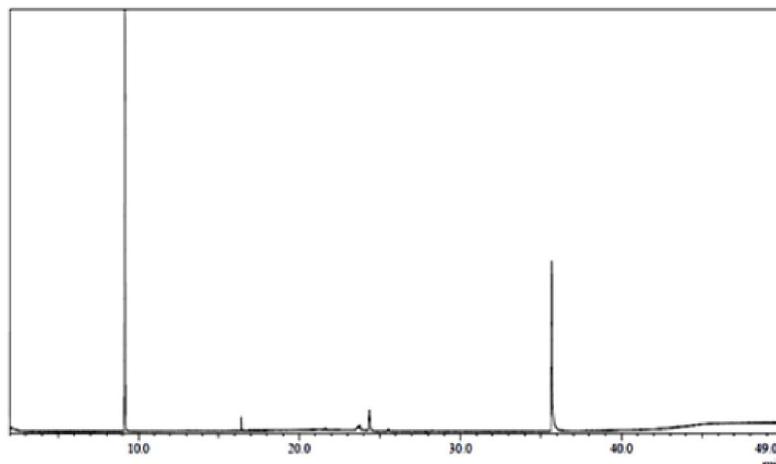
**Sensibilité** : capacité d'un détecteur à répondre à de faibles variations de concentration ou de masse.

**- Caractéristiques d'un détecteur idéal**

- ✓ Bonne sensibilité la sensibilité des détecteurs actuels sont comprises entre ( $10^{-8}$  et  $10^{-15}$  g soluté/s).
- ✓ Bonne stabilité et reproductibilité.
- ✓ Réponse linéaire sur plusieurs décades de concentrations.
- ✓ Domaine de température de fonctionnement compris entre la température ambiante et au moins 400 °C.
- ✓ Une préservation de l'intégrité de l'échantillon.

**II.6.1. La spectrométrie de masse**

Le spectromètre de masse est un des détecteurs les plus puissants pour la chromatographie gazeuse. On appelle GC-MS (Gaz Chromatography-Mass Spectroscopy) la combinaison de la chromatographie gazeuse et de la spectrométrie de masse. Un spectromètre de masse mesure le rapport masse sur charge ( $m/z$ ) des ions qui ont été produits à partir de l'échantillon par une source d'ionisation qui est assez énergétique pour briser des liaisons chimiques dans les molécules de l'échantillon et forme beaucoup de fragments ; qui sont très utiles pour identifier l'espèce moléculaire qui entre dans le spectromètre de masse à partir du spectre de fragmentation ou par comparaison avec bibliothèque de spectre (Fig.6).



**Fig.6** Chromatogramme GC-MS d'un mélange contenant plusieurs produits

## **II.7. Optimisation de séparation**

Plusieurs facteurs influence la séparation d'un mélange analysé par CPG:

### **II.7.1. La température**

Généralement, les composés les plus volatils sont les plus rapidement entraînés ; du fait leur tension de vapeur plus élevée. Cependant, si la température de la colonne est trop élevée, l'équilibre des composants ne peut s'établir dans chaque phase et les pics apparaissent presque tous en même temps. D'autre part, si la température est trop basse ; la vitesse est lente et la diffusion importante et le temps de rétention devient trop long. Lorsque l'écart entre les points d'ébullition des constituants du mélange à séparer est grand, il est souvent préférable d'augmenter la température du four.

### **II.7.2. Le débit du gaz vecteur**

Le débit du gaz vecteur doit laisser le temps pour que les constituants du mélange puissent s'équilibrer entre les deux phases mobile et stationnaire. Si le débit est trop rapide, la séparation des pics est médiocre et s'il est trop lent, les pics perdent leur finesse par suite d'une diffusion excessive des molécules dans le gaz vecteur. Quand le débit est bien réglé, on a intérêt à augmenter la température du four pour améliorer la finesse des pics.

### **II.7.3 La longueur de la colonne**

De façon générale, on accroît l'efficacité de la séparation en augmentant la longueur de la colonne mais ceci se fait au détriment de la finesse des pics (toute augmentation se

traduit par un nombre de plateaux N supérieur). De plus, la longueur des colonnes est limitée par le fait qu'une colonne trop longue exige une trop forte pression du gaz vecteur.

### II.7.4. La nature de la phase stationnaire

Le liquide qui constitue la phase stationnaire est, selon les cas, un hydrocarbure ramifié tel que le qualane de polarité nulle, un polyalkylsiloxane peu polaire, un polyéther polaire ou un polyester très polaire. La dissymétrie des pics ou les temps de rétention trop élevés sont le reflet de phénomènes d'adsorption ou d'affinité trop importante des composés vis-à-vis la phase stationnaire.

### II.7.5. Précaution générale

- ✚ l'échantillon à analyser doit toujours avoir subi un traitement initial (minimum) de purification : élimination de l'eau et des particules en suspension.
- ✚ la nature de la phase stationnaire qui se trouve dans le four doit être contrôlée.
- ✚ Ne jamais utiliser la colonne en dehors des limites de températures indiquées par le fabricant la seringue doit être rincée plusieurs fois avec l'échantillon avant l'injection
- ✚ l'aiguille au moment de son introduction à travers le septum de l'injecteur de ne pas être courber
- ✚ le septum doit être changé régulièrement (toutes les 50 injections environ)
- ✚ le mélange doit être injecté dès que l'aiguille se trouve enfoncée.