

Fabrice Bertoncini<sup>1</sup>, Colombe Vendeuvre<sup>1</sup>, Didier Espinat<sup>1</sup>, Didier Thiébaut<sup>2</sup>

# Apport de la chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle pour la caractérisation de matrices

## RÉSUMÉ

Cet article présente le principe générale et les atouts de la chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle (GC $\times$ GC). Les systèmes instrumentaux aujourd’hui disponibles sont présentés ainsi que différentes applications récentes démontrant l’impact décisif de cette technique pour l’analyse détaillée de mélanges complexes.

## MOTS-CLÉS

Chromatographie en phase gazeuse, GC $\times$ GC, chromatographie bidimensionnelle

## Interest of comprehensive two-dimensional gas chromatography for unravelling complex mixture

## SUMMARY

*This article presents the general principle and the assets of two-dimensional gas chromatography (GC $\times$ GC). The instrumental systems now available are presented as well as various recent applications showing the decisive impact of this technique for the detailed analysis of complex mixtures.*

## KEYWORDS

Gas chromatography, comprehensive GC $\times$ GC, two dimensional gas chromatography

## I - Introduction

Les besoins de caractérisation détaillée de mélanges complexes dans des domaines très variés – pétrole, protéomique, environnement, parfumerie, industrie agro-alimentaire – ont motivé le développement de systèmes analytiques multidimensionnels. Leur intérêt réside dans un pouvoir résolutif accru à condition que les critères énoncés par Giddings (1) soient respectés : (i) les constituants d’un mélange sont séparés dans des dimensions indépendantes, dites orthogonales, et (ii) la résolution obtenue dans chaque dimension est préservée tout au long de la séparation. Ces systèmes ont longtemps consisté en l’association en série de colonnes chromatographiques de sélectivité différente pour améliorer la résolution sur une fraction du mélange (technique de heart-cutting). L’introduction récente de la chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle ou comprehensi-

ve GC (GC $\times$ GC) a ouvert de nouvelles possibilités pour améliorer la caractérisation détaillée globale des mélanges complexes de produits volatils. Le principe et les avantages de la GC $\times$ GC, les systèmes commerciaux disponibles sont décrits ainsi que des applications variées et récentes démontrant l’impact décisif pour l’analyse détaillée de mélanges complexes de cette technique.

## II - Principe et Avantages

### 1. Principe de la GC $\times$ GC

La GC $\times$ GC est une technique de séparation en phase gazeuse dans laquelle tous les composés élus d’une première colonne sont successivement soumis à une séparation dans une deuxième colonne de sélectivité différente (2). Les deux colonnes sont connectées en série au moyen d’un mo-

<sup>1</sup> Institut Français du Pétrole, IFP-Lyon, BP3, 69390 Vernaison – E-Mail : fabrice.bertoncini@ifp.fr

<sup>2</sup> Ecole Supérieure de Physique et Chimie Industrielles de Paris, 10 rue Vauquelin, 75235 Paris

## Apport de la chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle pour la caractérisation de matrices complexes

dulateur qui échantillonne l'effluent de la première colonne sous forme d'impulsions chimiques et les transfère en continu vers la deuxième colonne. La durée requise pour effectuer cette opération, appelée période de modulation, impose une deuxième séparation très rapide (quelques secondes). Afin que chaque impulsion soit séparée dans un temps inférieur à la période de modulation, on choisit une colonne courte et de faible diamètre interne (typiquement  $1\text{ m} \times 0,1\text{ mm d.i.}$ ). La figure 1 schématise le principe de la GC $\times$ GC. Le pic d'élution issu de la première colonne (A) est échantillonné par le modulateur. Chaque fraction est focalisée puis injectée en continu dans la deuxième colonne. Le signal détecté correspond donc une succession de séparations réalisées dans la deuxième dimension (B). En accolant ces chromatogrammes, le signal est reconstruit dans un plan de rétention à deux dimensions qui s'apparente à une cartographie de l'échantillon dans laquelle l'intensité des pics chromatographiques est traduite par un dégradé de couleur. Dans l'exemple présenté dans la figure 1, deux solutés (x et y) co-élués après la première séparation sont séparés lors de la deuxième séparation pourvue que la nature des phases stationnaires soit adaptée.

### 2. Orthogonalité de la séparation

La séparation est dite orthogonale si les mécanismes de rétention dans chaque dimension sont indépendants l'un de l'autre (3). Cette condition est réalisée par la mise en œuvre de colonnes dont les phases stationnaires sont de natures chimiques différentes pour une séparation en programmation de température. Généralement, les systèmes de GC $\times$ GC associent une première colonne de type apolaire (diméthylpolysiloxane) à une seconde colonne de type polaire (polyéthyléneglycol, phényl-méthylpolysiloxane ou cyclodextrine). La polarité d'une phase stationnaire désigne sa propension à développer des interactions spécifiques par effets électroniques, stériques ou chiraux. En GC, le facteur de rétention d'un soluté est inversement proportionnel au produit de sa tension de vapeur et de son coefficient d'activité dans la phase stationnaire à dilution infinie. Si la première séparation est réalisée dans une colonne de type apolaire, les coefficients d'activité sont tous proches de l'unité car il n'y a pas d'interactions spécifiques. La rétention est gouvernée uniquement par la tension de vapeur et les composés sont séparés par température d'ébullition croissante. Dans la seconde colonne, polaire, la séparation est très rapide (< 10 secondes) et a donc lieu dans des conditions pratiquement isothermes, compte tenu de la faible rampe de température ( $\sim 2^\circ\text{C}/\text{min}$ ). Les solutés injectés dans la deuxième colonne étant élus de la première dimension à la même température ( $T_e$ ), leur température d'ébullition n'a plus d'influence sur la deuxième séparation et leur rétention est donc uniquement gouvernée par leur coefficient d'activité. Le chromatogramme est donc structuré

selon les propriétés physico-chimiques des constituants du mélange à séparer : tension de vapeur et polarité. Ainsi, l'organisation en bandes d'élution spécifique à chaque famille chimique facilite l'identification des composés par la combinaison de deux informations indépendantes.

### 3. Critères d'optimisation

Pour que la séparation GC $\times$ GC soit effective, deux contraintes sont fixées pour le choix de la période de modulation. On considère qu'un minimum de trois échantillonnages par pic élue de la première dimension est nécessaire. Par ailleurs, si le temps de rétention d'un composé dans la seconde dimension est supérieur à la période de modulation, alors son pic d'élution appartient au cycle(s) de modulation suivant(s), ce qui entraîne une mauvaise représentation du chromatogramme 2D conduisant à des problèmes d'identification et à une baisse de la résolution (4). Ainsi le choix de la période de modulation (Pmod) est fixé par la règle suivante :

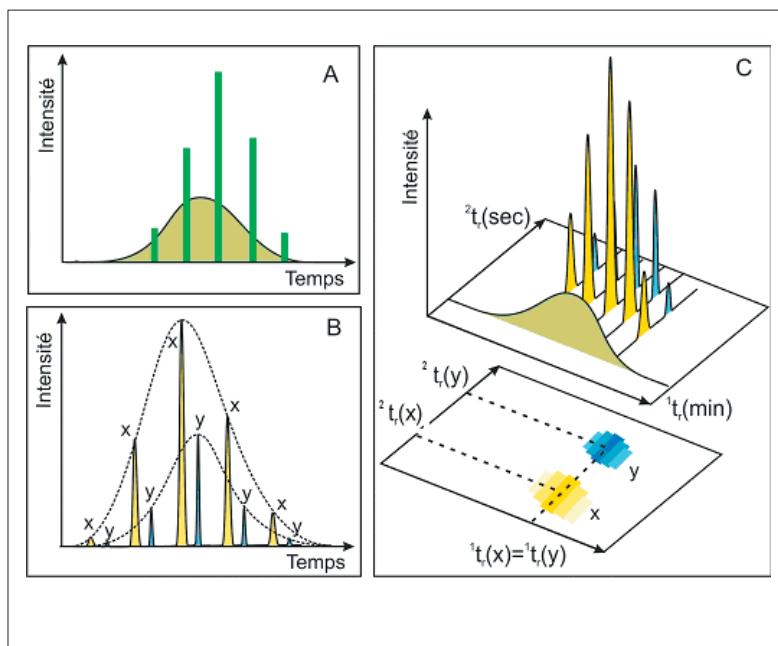
$${}^2t_{r,\max} < Pmod < {}^1\omega/3$$

où  ${}^2t_{r,\max}$  est le temps de rétention du composé le plus retenu dans la seconde dimension et  ${}^1\omega$  est la largeur du pic dans la première dimension.

**Figure 1**

Principe de la modulation et de la reconstruction du signal en GC $\times$ GC.

- A) Echantillonnage d'un pic élue de la 1<sup>re</sup> dimension - B) Séparation de chaque impulsion échantillonnée dans la 2<sup>ème</sup> dimension - C) Construction du chromatogramme 2D.



### 4. Capacité de pics

La capacité de pics désigne le nombre maximal de pics qu'il est possible d'inscrire dans l'espace de séparation. Il est admis que la capacité de pics en GC $\times$ GC est égale au produit des capacités de pics dans chaque dimension alors qu'elle est seulement égale à leur somme dans le cas de systèmes simplement couplés en ligne. Par exemple, si les capacités de la 1<sup>re</sup> et la 2<sup>ème</sup> dimension sont respectivement 500 et 5, alors le système permet

## TECHNOLOGIE APPLIQUÉE

Figure 2

Les différents types de modulateurs utilisés en GC $\times$ GC et leur principe de fonctionnement pour un cycle de modulation par accumulation et désorption.

A : Sweeper - B : Longitudinally Modulated Cryogenic System - C : Modulateur à double jets cryogéniques de CO<sub>2</sub> - D : Modulateur à vanne.

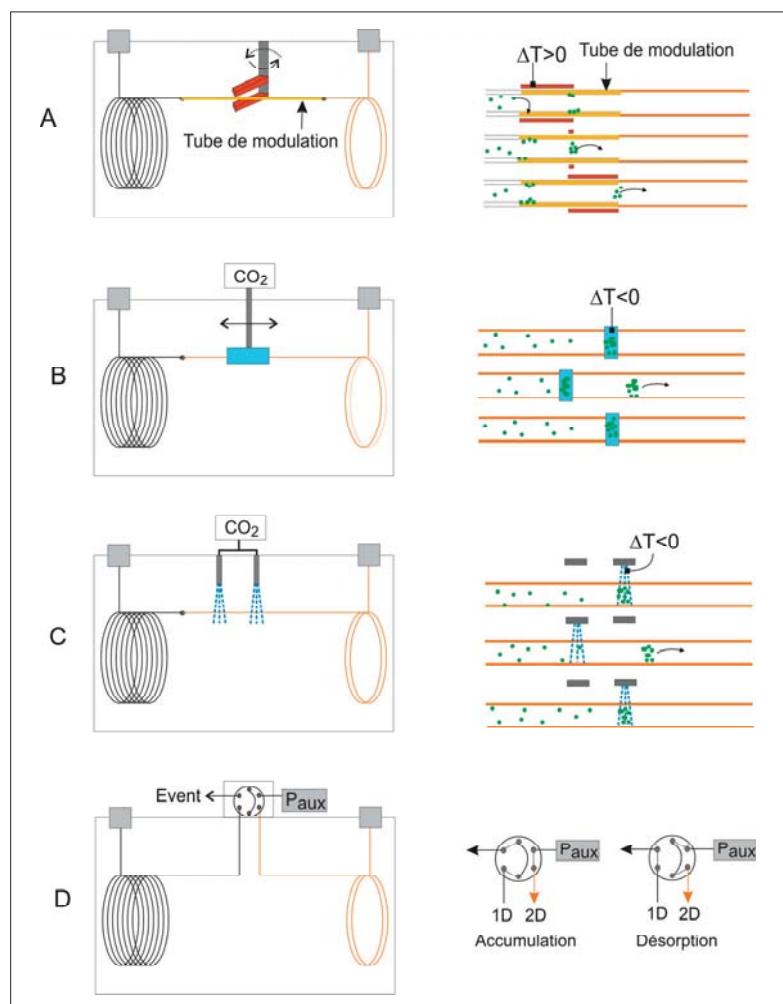


Tableau I

Systèmes de modulation développés depuis l'introduction de la technique. \* : systèmes commercialisés.

Type de modulateur	Bande de ré-injection (temps en ms)	Gamme d'application (T <sub>eb</sub> , °C)	Robustesse
Modulateurs à vanne			
Vanne à diaphragme	< 50	0–200	+
Débit différentiel	< 50	0–390	+
Modulateurs chauffants			
TDM	20		---
Sweeper	60	125–400	-
Modulateurs cryogéniques			
LMCS	20–50	>125	+
*Double jets CO <sub>2</sub>	<10	>100	++
Double jets CO <sub>2</sub> rotatif	<10	>100	-
*Quatre jets N <sub>2</sub>	<10	>-40	++
*Simple jet N <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub>	<10	>-40	++

de séparer théoriquement 2500 composés, ce qui exigerait d'une séparation conventionnelle environ 10 millions de plateaux théoriques, soit 50 fois plus que le nombre maximal disponible en chromatographie en phase gazeuse (GC).

## 5. Gain en détectabilité

Le modulateur entraîne la focalisation des analytes par des cycles de piégeage et de désorption. En raison de la conservation de la matière, les pics modulés sont fins (~ 300 ms) et d'amplitude élevée, le gain étant d'environ 50 par rapport à la GC. Compte tenu de la fréquence élevée (100 Hz) du détecteur nécessaire pour définir correctement les pics modulés, le gain en détectabilité réel en GC $\times$ GC est de l'ordre de 5 à 10 (5), ce qui représente un avantage non négligeable pour l'analyse de composés à l'état de traces.

## III - Systèmes de modulation

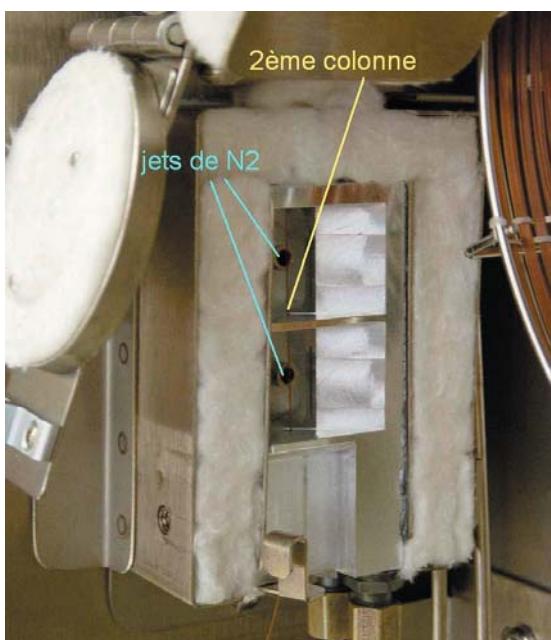
Le modulateur est l'élément clé du dispositif de GC $\times$ GC. Cette interface assure le fractionnement de l'effluent issu de la première séparation, la focalisation et le transfert de ces fractions en vue de la deuxième séparation, étape assimilée à une injection dans la deuxième colonne. Un des critères essentiels pour réaliser une séparation bidimensionnelle est le transfert en continu de la totalité de l'échantillon de la première vers la deuxième colonne. Différents types de modulateurs ont été développés accompagnant l'essor de la GC $\times$ GC (tableau I et figure 2). Leurs perfectionnements et l'introduction d'appareils commerciaux sont en grande partie à l'origine du succès de la technique. Le pouvoir de focalisation d'un modulateur est d'autant meilleur que la largeur de la bande de ré-injection est faible.

## Apport de la chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle pour la caractérisation de matrices complexes



**Figure 3**

Modulateur cryogénique à double jets de CO<sub>2</sub> équipant le chromatographe GC×GC commercialisé par la société Thermo.



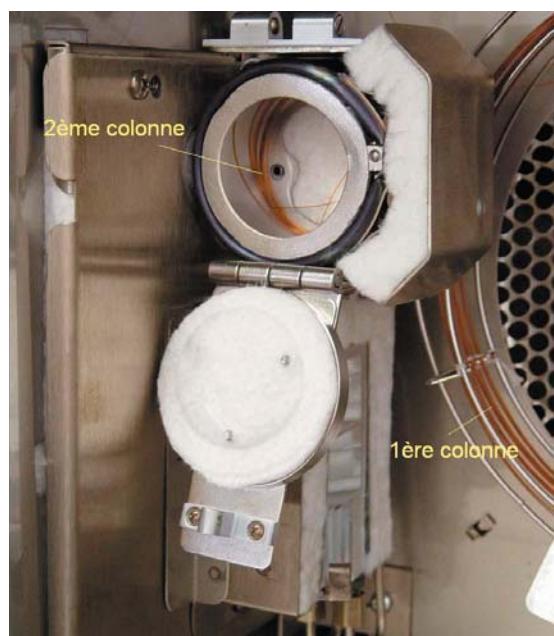
**Figure 4**

Modulateur cryogénique à quatre jets de N<sub>2</sub> et d'air chaud équipant le chromatographe GC×GC commercialisé par la société Leco (sous licence Zoex).

La modulation thermique par des cycles de piégeage et de désorption (*figure 2-A, 2-B et 2-C*) est généralement préférée à la modulation par commutation d'une vanne (*figure 2-D*), même si l'introduction récente d'un modulateur à vanne et à débits différentiels permet désormais un transfert quantitatif sans restriction de température (6). Les modulateurs thermiques, qu'ils soient chauffants ( $\Delta T > 0$ ) ou cryogéniques ( $\Delta T < 0$ ), imposent aux solutés élusés de la première colonne une différence de température par rapport à la température du four, appliquée au début de la seconde colonne. La modulation à double étape de piégeage est généralement mise en œuvre pour garantir le transfert total sans perte de composés. Les modulateurs thermiques chauffants comme le *sweeper* (2, 3) ont permis de démontrer le potentiel de la GC×GC, mais, en raison de leur manque

de robustesse et de leur limitation sur la température finale pour une analyse en programmation de température, ils ont peu à peu été abandonnés au profit des modulateurs cryogéniques.

Dans le cas des modulateurs cryogéniques, l'abaissement de température par un fluide cryogénique, au minimum 100°C au-dessous de la température du four, entraîne le piégeage des solutés au début de la seconde colonne; puis l'exposition à la température du four assure la désorption et le transfert des solutés en vue de la deuxième séparation. La modulation peut être obtenue en déplaçant périodiquement un compartiment froid le long de la colonne pour créer successivement deux points de piégeage entre une position amont et une position aval (*figure 2-B*). L'autre approche, plus simple et plus robuste, consiste en l'alternance de jets cryogéniques appliqués sur la deuxième colonne (*figure 2-C*) (7). Plusieurs stratégies ont été récemment développées utilisant un ou deux jets de CO<sub>2</sub> ou d'azote liquide. Les mo-



dulateurs à azote liquide sont préférables dans le cas de l'analyse de composés dont la température d'ébullition est inférieure à 100°C, mais dans ce cas un appoin de chaleur localisé sur la zone de piégeage est indispensable pour la désorption. Trois modulateurs sont actuellement commercialisés : le modulateur à double jets cryogéniques de CO<sub>2</sub> équipant un appareil Thermo (*figure 3*), le modulateur à quatre jets d'azote liquide et d'air chaud fourni avec un appareil Leco (*figure 4*) et le modulateur à boucle et simple jet de Zoex. L'introduction récente d'appareils commerciaux équipés de systèmes de modulation performants et de logiciels dédiés à la visualisation et à l'intégration des chromatogrammes de GC×GC a fortement contribué à rendre la technique plus attractive. Des développements sont cependant encore souhaitables dans les domaines de l'automatisation et de la comparaison des chromatogrammes.

## IV - Analyse quantitative

Comme en GC, la quantification d'un soluté en GC $\times$ GC s'effectue en étalonnant la réponse du détecteur par la mesure de l'aire du pic d'élution. Dans le cas spécifique de la GC $\times$ GC, on considère que l'aire d'un pic non modulé est égale à la somme des aires de chaque pic d'élution secondaire pour un même produit.

L'intégration en GC $\times$ GC présente trois avantages fondamentaux qui résident dans :

- la plus faible probabilité de co-élutions grâce à la capacité de pics élevée ;
- la possibilité, lors de l'intégration du second chromatogramme, de toujours disposer de la ligne de base puisqu'il y a toujours une seconde injection, ce qui permet une intégration plus précise qu'en GC où la présence d'un fond continu introduit une erreur importante sur l'intégration des chromatogrammes ;
- l'augmentation notable du rapport signal sur bruit qui conduit à une meilleure détectabilité.

## V - Applications

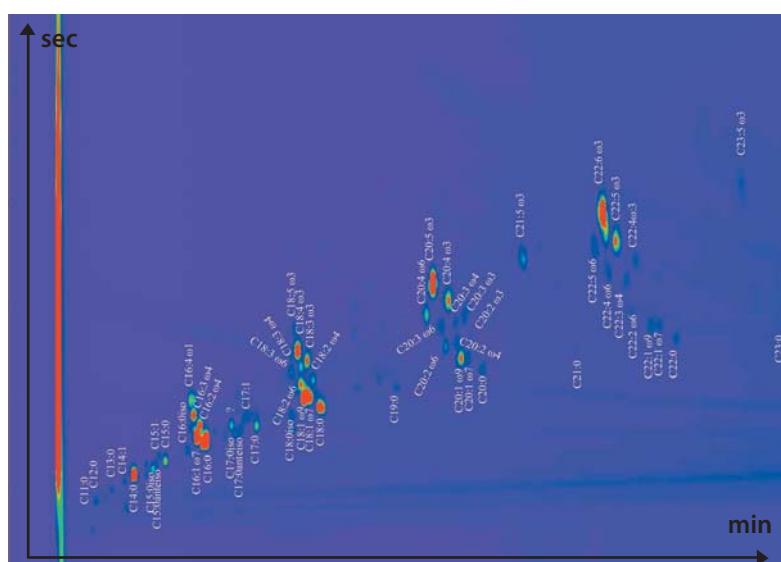
Historiquement, les premières applications de la GC $\times$ GC ont concerné les produits pétroliers. Une analogie peut être établie avec le développement de la GC dans les années 1950 soutenu alors par l'industrie pétrolière. Le champ d'application de la GC $\times$ GC n'est pourtant pas limité aux seuls hydrocarbures : elle s'est révélée décisive pour la caractérisation d'échantillons complexes, comme les contaminants type PCB (polychlorobiphényles) ou HAP (hydrocarbures poly-aromatiques), les huiles essentielles, les rejets gazeux, les produits pharmaceutiques ou alimentaires (*tableau II*) pour lesquels la séparation par GC n'est pas suffisamment résolutive (cf. les revues récentes 8, 9).

L'analyse des acides gras représente un exemple significatif du potentiel de la GC $\times$ GC. Cette analyse permet de déterminer leurs propriétés nutritives et physiologiques. Les graisses ou huiles naturelles ont des compositions très variables en acides gras selon la longueur des chaînes, le nombre et la position des doubles liaisons. On utilise la dénomination C18 :5w3 qui indique que l'acide gras (ou le dérivé d'ester méthylique correspondant) contient 18 atomes de carbone dans la chaîne substituant le groupement carboxylique et présente 5 doubles liaisons conjuguées dont la première est en position 3 par rapport à l'extrémité de la chaîne. La GC $\times$ GC permet d'organiser ces différentes molécules (après l'estérification nécessaire à leur stabilité thermique) en fonction de leur nombre d'atomes de carbone (de 11 à 23), du nombre (de 0 à 6) et de la position des doubles liaisons (figure 5). Une corrélation logarithmique reliant le temps de rétention dans la deuxième dimension à celui de la première dimension pour chaque série de composés homologues facilite l'identification d'un acide

Composés/Matrice	Dispositif	Modulateur
Environnement		
PCB	GC $\times$ GC- $\mu$ ECD	LMCS
PCB	GC $\times$ GC- $\mu$ ECD	sweeper
PCB	GC $\times$ GC-TOF-MS	quatre-jets N <sub>2</sub>
PAH	PLEa-GC $\times$ GC	LMCS
Produits alimentaires		
Acides gras	GC $\times$ GC-FID	sweeper
Acides gras	GC $\times$ GC-FID	LMCS
Café	SPMEb-GC $\times$ GC-TOF-MS	LMCS
Arômes dans une crème laitière	GC $\times$ GC-TOF-MS	LMCS
Résidus de pesticides extraits de fruit	GC $\times$ GC-TOF-MS	quatre-jets N <sub>2</sub>
Huiles essentielles		
Arbre à thé	énantio-GC $\times$ GC	LMCS
Bergamote	GC $\times$ énantio-GC	LMCS
Rejets gazeux		
Aérosol urbain	GC $\times$ GC-TOF-MS	quatre-jets N <sub>2</sub>
Fumée de cigarette	GC $\times$ GC-TOF-MS	quatre-jets N <sub>2</sub>
Composés pharmaceutiques		
matrice : urine	SPEC-GC $\times$ GC-FID	LMCS
matrice : sang	GC $\times$ GC-qMS	LMCS

Tableau II

Panorama des applications en GC $\times$ GC.

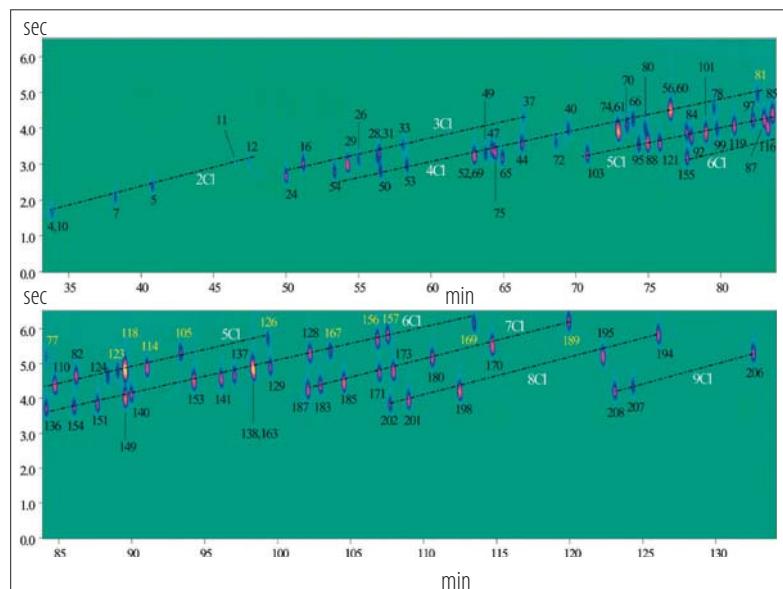


## Apport de la chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle pour la caractérisation de matrices complexes

gras inconnu à partir de sa position dans l'espace de séparation (10).

Un autre exemple concerne les composés polyhalogénés (polychlorobiphényles, polychloro-di-benzo-p-dioxines et polychlorodibenzofuranes) qui sont des composés particulièrement toxiques pouvant contaminer des échantillons alimentaires ou environnementaux. L'analyse des PCB est particulièrement importante, et l'attention est portée sur la position et le nombre de substituants chlore, qui confèrent à la molécule un caractère plus ou moins toxique. L'utilisation de la GC $\times$ GC couplée

à un micro détecteur à capture d'électron ( $\mu$ ECD) conduit à des résultats remarquables car les différents congénères portant le même nombre de substituants chlore s'alignent sur des droites (figure 6), ce qui permet l'identification de nombreux composés pour lesquels n'existe aucun composé standard ; par ailleurs le gain en sensibilité est de l'ordre de 3-5 comparé à la GC- $\mu$ ECD. Le choix d'une colonne phénol-polycarborane-siloxane (HT-8) ou cristal liquide (LC-50) dans la seconde dimension favorise la rétention des structures planaires (non-ortho) (11).



## VI - Conclusion

La chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle GC $\times$ GC est particulièrement intéressante pour l'analyse détaillée de mélanges complexes de composés volatils, dans la mesure où la totalité de l'échantillon est analysée dans deux dimensions de séparation indépendantes adaptées à la nature physico-chimique des constituants. Des efforts importants ont été accomplis depuis le début des années 1990 pour faire évoluer cette technique vers un outil indispensable à l'investigation des matrices complexes.

### Figure 6

Chromatogramme GC $\times$ GC- $\mu$ ECD d'un mélange de PCB contenant 2 à 9 atomes de chlore (Cl) (d'après Korytar et al (11), Copyright (2001), reproduit avec la permission d'Elsevier).

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) GIDDINGS J.C. Concepts and comparisons in multidimensional separation. *J. High Resol. Chromatogr.*, 1987, 10, 319-323.
- (2) PHILLIPS J.B., XU J., Comprehensive multi-dimensional gas chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1995, 703, 327-334
- (3) VENKATRAMANI C.J., XU J., PHILLIPS J.B. Separation orthogonality in temperature programmed comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Anal. Chem.*, 1996, 68, 1486-1492.
- (4) BEENS J., BLOMBERG J., SCHOENMAKERS P.J. Proper tuning of comprehensive two-dimensional gas chromatography to optimize the separation of complex oil fractions, *J. High Resol. Chromatogr.*, 2000, 23, 182-188.
- (5) LEE A.L., BARTLE K.B., LEWIS A.C., A model of peak amplitude enhancement in orthogonal two-dimensional gas chromatography. *Anal. Chem.*, 2001, 73, 1330-1335.
- (6) BUENO P.A., SEELEY J.V., Flow switching device for comprehensive two dimensional gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2004, 1027, 3-10.
- (7) BEENS J., ADAHCHOUR M., VREULS R.J.J., VAN ALTENA K. & BRINKMAN U.A.Th., Simple, non-moving modulation interface for comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2001, 919, 127-132.
- (8) DALLÜGE J., BEENS J., BRINKMAN U.A.Th., Comprehensive two-dimensional gas chromatography : a powerful and versatile analytical tool, *J. Chromatogr. A*, 2003, 1000, 69-108.
- (9) BLOMBERG J., SCHOENMAKERS P.J., BRINKMAN U.A.Th. Gas chromatographic methods for oil analysis., *J. Chromatogr. A*, 2002, 972, 137-173.
- (10) DE GEUS H.-J., AIDOS I., DE BOER J., LUTEN J.B., BRINKMAN U.A.Th., Characterisation of fatty acids in biological oil samples using comprehensive multidimensional gas chromatography, *J. Chromatogr. A*, 2001, 910, 95-103.
- (11) KORYTAR P., LEONARDS P.E.G., DE BOER J., BRINKMAN U.A.Th., High resolution separation of polychlorinated biphenyls by comprehensive two-dimensional gas chromatography, *J. Chromatogr. A*, 2002, 958, 203-218.