

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

I BUT DU TRAVAIL PRATIQUE

- Familiarisation avec les systèmes de chromatographie en phase gazeuse.
- Comprendre les principes de la chromatographie en phase gazeuse.
- Connaître les applications principales et particularités de la chromatographie en phase gazeuse.

II INTRODUCTION

La chromatographie en phase gazeuse (GC) est une méthode d'analyse immédiate. Elle permet de séparer les constituants d'un mélange selon leur partage (par solubilisation ou adsorption) entre deux phases dont l'une est stationnaire (solide ou liquide) et l'autre est mobile et gazeuse (gaz vecteur).

La phase stationnaire, déposée sur un support inerte, est placée dans une colonne (colonne chromatographique), parcourue par la phase mobile. Les deux phases sont en contact et sont insolubles l'une dans l'autre. Dans ces conditions, les constituants d'un mélange se partagent entre les deux phases en établissant un équilibre thermodynamique de partage. Pour chacun des constituants, le partage est différent, certains auront plus d'affinité pour la phase stationnaire que pour la phase gazeuse et vis-versa. Ces équilibres seront remis en question par l'apport continu de gaz vecteur, ce qui engendrera une vitesse de migration différente pour chaque constituant le long de colonne chromatographique.

On ne se contentera ici que de donner les définitions de quelques grandeurs chromatographiques. Pour la partie théorique, vous devez vous reporter aux cours de chromatographie, modèles chromatographiques et chromatographie GC.

II.1 Efficacité d'une colonne GC

Pour pouvoir comparer des colonnes de différentes longueurs, on définit la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT), de la manière suivante: $H = L/N$ où L est la longueur de la colonne. Il ne s'agit

que d'une analogie faite avec la distillation fractionnée. Le processus de séparation est beaucoup plus complexe.

Les pics étant supposés Gaussiens, on peut caractériser l'élargissement de ces pics, d'autant plus importants que l'efficacité de la séparation est faible, par un nombre de plateaux théoriques N .

Pour une gaussienne et selon la théorie statistique de la chromatographie, N s'exprime des trois manières suivantes:

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_R}{\delta} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2$$

où σ est l'écart-type de la gaussienne exprimé en unité de temps. δ et w représentent les largeurs du pic à mi-hauteur et à la base respectivement. En pratique, on mesure directement t_R , et w sur le chromatogramme.

II.2 Résolution des pics

La résolution $R_{s(1,2)}$ entre deux pics est définie par la relation:

$$R_{s(1,2)} = \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{\frac{1}{2}(w_{(1)} + w_{(2)})}$$

Il découle de cette définition que la séparation est d'autant meilleure que $R_{s(1,2)}$ est grand. Ainsi pour deux pics d'aires voisines, lorsque la résolution est supérieure à 1,5, la séparation est pratiquement achevée, puisqu'il n'y a alors que 2% de recouvrement. Pour une résolution inférieure à 0,8 la séparation est généralement insuffisante. La résolution peut aussi s'exprimer à l'aide de la relation de Purnell (voir cours de chromatographie qualitative).

II.3 Paramètres influençant l'efficacité

Globalement, les paramètres qui influencent sont les suivants:

- le diamètre des particules qui constituent la phase stationnaire. Il doit être le plus petit possible, au mieux les particules peuvent être remplacées par un film liquide visqueux.
- la colonne chromatographique doit être remplie de façon homogène.
- la nature du gaz vecteur est un facteur à prendre en compte.

- Le film de phase stationnaire ne doit pas être trop épais.

- le débit de la phase mobile influe de manière complexe sur la séparation et la théorie cinétique de la chromatographie nous permet d'établir l'équation de Van Deemter, équation qui relie la hauteur équivalente à un plateau théorique H à la vitesse linéaire d'écoulement moyenne de la phase mobile \bar{u} à température constante.

$$H = A + \frac{B}{u} + C\bar{u}$$

H : hauteur équivalente d'un plateau théorique : $H = \frac{L}{N}$ [cm]

\bar{u} : vitesse linéaire d'écoulement moyenne de la phase mobile [cm/s]

A : constante qui dépend du diamètre des particules de la phase stationnaire et de la qualité de remplissage de la colonne chromatographique [cm]

B : constante qui dépend de la diffusion longitudinale des constituants du mélange dans la phase mobile [cm²/s]

C : constante qui décrit la vitesse d'établissement des équilibres de partage des constituants du mélange entre la phase mobile et la phase stationnaire [s]

L : longueur de la colonne (cm)

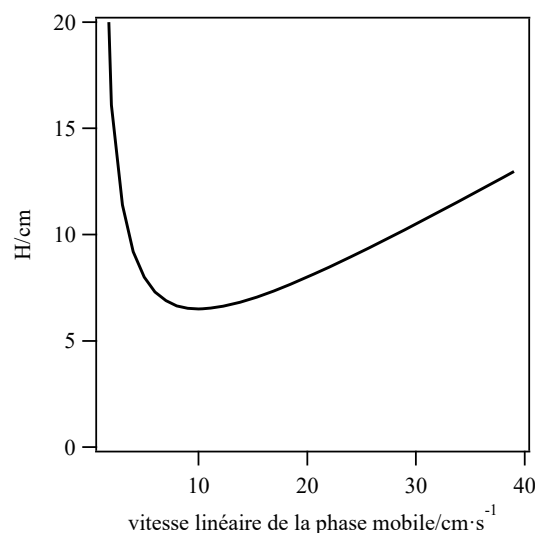


Figure 1 : Exemple de courbe de Van Deemter

H est minimum pour $u_{opt} = \sqrt{\frac{B}{C}}$ et possède la valeur $H_{min} = A + 2\sqrt{BC}$. u_{opt} est la vitesse linéaire d'écoulement moyenne optimale de l'éluant.

En faisant varier la vitesse linéaire d'écoulement moyenne et en mesurant le nombre de plateaux théoriques pour chaque vitesse, il est possible de déterminer expérimentalement l'allure de la courbe de Van Deemeter du système chromatographique.

On montre qu'il existe également un optimum de température. Généralement en GC, plus la température de la colonne est basse, meilleure est la séparation. Cela entraîne parfois un temps d'analyse parfois rédhibitoire.

III ANALYSES QUALITATIVE ET QUANTITATIVE EN GC

III.1 Analyse qualitative

Elle sert essentiellement à l'identification des composants d'un mélange. Pour une phase stationnaire donnée, le volume de rétention spécifique est caractéristique du soluté concerné. Mais sa mesure précise n'est pas possible avec un chromatographe ordinaire. Ainsi on a recours aux valeurs de rétention relatives, c'est-à-dire par rapport à un étalon :

$$\alpha_{(1,2)} = \frac{V'_{R(2)}}{V'_{R(1)}} = \frac{t'_{R(2)}}{t'_{R(1)}}$$

Les valeurs de rétention indexées "2" correspondent à l'étalon. Une colonne apolaire sépare les substances approximativement selon leurs pressions de vapeur saturantes à la température de la colonne. Une colonne polaire retient plus les composés polaires. Les temps de rétention sont mesurés au sommet des pics chromatographiques.

Pour la GC, des tables ont été constituées selon la nature de la phase stationnaire et la température de la colonne chromatographique. Néanmoins, un certain nombre de contraintes existent au niveau du choix des étalons et l'on préfère souvent se référer à une échelle universelle, par exemple à celle des indices de rétention de KOVATS (1963). Ces derniers sont fondés sur la relation linéaire constatée entre le logarithme du volume de rétention spécifique et le nombre n d'atomes de carbone d'un soluté dans une famille de produits homologues, par exemple celle des hydrocarbures saturés aliphatiques. Cette relation est plus souvent utilisée en temps de rétention net tel que :

$$\ln(t'_{R(n)}) = an + b$$

On peut qualifier ainsi, à une température donnée, un indice de Kovats permettant d'identifier une substance grâce à son temps de rétention net. Pour ce faire, on se base sur le temps de rétention d'un alcane linéaire. En effet, pour ce type de composé, l'indice de Kovats est $100n$ où n représente le nombre d'atomes de carbone. Ainsi, si une substance S présente un temps de rétention net compris entre celui d'un alcane à n atomes de carbone et un alcane à $n+1$ atomes de carbone, son indice de Kovats à température T constante est calculé comme suit :

$$I_s(T) = 100n + 100 \left[\frac{\ln(t'_{R(s)}) - \ln(t'_{R(n)})}{\ln(t'_{R(n+1)}) - \ln(t'_{R(n)})} \right]$$

$I_s(T)$: indice de Kovats d'un substance à la température T

n : nombre d'atome de carbone de l'alcane au temps de rétention net le plus petit

$t'_{R(s)}$: temps de rétention net de la substance

$t'_{R(n)}$: temps de rétention net de l'alcane à n atomes de carbone

$t'_{R(n+1)}$: temps de rétention net de l'alcane à $n+1$ atomes de carbone

Cette relation est uniquement valable en mode isotherme.

III.2 Analyse quantitative

Pour une analyse quantitative, en raison des spécificités des injecteurs des chromatographes GC, on procède à la normalisation interne et à l'étalonnage interne (voir cours de chromatographie quantitative).

IV APPAREILLAGES

Les colonnes HP-1 et DBWAX sont installées sur les GC 6850 (Agilent Technologies). Une colonne HP-5 équipe le GC-MS 7890A (Agilent Technologies). Les caractéristiques de ces colonnes chromatographiques sont les suivantes :

Colonne	HP-1	HP-5	DB-WAX
Longueur (m)	30 m	30 m	30 m
Diamètre interne (mm)	0,32 mm	0,25 mm	0,32 mm
Epaisseur de la phase stationnaire	0,25 µm	0,25 µm	0,25 µm
Type de colonne	apolaire	apolaire	polaire
Nature de la Phase stationnaire	100% PDMS	95% PDMS / 5% Phényle	100% PEG
Polarité réelle	5%	8%	52%

V PARTIE PRATIQUE

V.1 Généralités

- Laissez l'appareil se stabiliser au moins $\frac{1}{2}$ heure avant les mesures, car les volumes de rétention varient exponentiellement avec la température.
- La seringue utilisée pour l'injection est fragile; pour l'injection, procéder comme suit : enfoncez **lentement** l'aiguille complètement dans le septum, en la guidant avec les doigts, puis injectez en prenant soin de ne pas tordre le piston.
- Lorsqu'aucune mesure n'est réalisée pendant un long moment, laissez un faible courant de gaz vecteur dans le système chromatographique (gaz saver @ 20 mL/min).

V.2 Analyse qualitative

- Injecter 0,2 μ L du mélange d'hydrocarbures ($n\text{-C}_6$ à $n\text{-C}_{10}$) sur les colonnes polaire et apolaire. Le débit de gaz vecteur est fixé à 1,2 mL/min et le split ratio est de 50 : 1.
- Faites varier la température de 70°C à 130°C par palier de 20°C sur chaque colonne (running time initial de 20 minutes qui sera raccourci lorsque l'on augmentera successivement la température).
- Déterminer la nature de la colonne à utiliser. Pour ce faire, en vous basant sur le pic chromatographique de l'octane, calculer le nombre de plateaux théoriques des deux colonnes aux différentes températures étudiées.
- Déterminer la température à appliquer à la colonne choisie en vous basant sur la résolution des pics chromatographiques aux différentes températures étudiées.
- Effectuer 3 injections sur la colonne choisie à la température optimale.
- Prenez 0,2 g du mélange d'alcanes et introduisez 0,1 g de 2-méthylbutyrate d'éthyle. En gardant les paramètres chromatographiques déterminés précédemment, effectuer 3 injections de 0,2 μ L. Cette manipulation permettra de déterminer l'indice de Kovats du 2-méthylbutyrate d'éthyle (voir compte-rendu).

V.3. Analyse quantitative

- Basez-vous sur les 3 injections réalisées pour la détermination de l'indice de Kovats du 2-méthylbutyrate d'éthyle.
- Nous allons utiliser la méthode de normalisation interne pour calculer la masse et le pourcentage massique de l'octane contenu dans le mélange d'alcane. Pour ce faire, préparer les mélanges étalons suivants :

0,2 g de 2-méthylbutyrate d'éthyle + 0,3 g d'octane.

0,2 g de 2-méthylbutyrate d'éthyle + 0,4 g d'octane.

0,4 g de 2-méthylbutyrate d'éthyle + 0,2 g d'octane.

0,4 g de 2-méthylbutyrate d'éthyle + 0,3 g d'octane.

0,4 g de 2-méthylbutyrate d'éthyle + 0,4 g d'octane.

Si vous n'arrivez pas à obtenir précisément les masses données, il vous suffit de bien noter les masses obtenues.

- Analyser 0,2 µL de chaque mélange 3 fois avec les conditions chromatographiques que vous avez déterminées précédemment pour réaliser une courbe standard qui sera utilisée pour déterminer la masse et le pourcentage massique de l'octane dans le mélange d'alcane (voir compte-rendu).

VI Compte-rendu

VI.1 Analyse qualitative

- Consigner dans un tableau le nombre de plateaux théoriques calculés à partir du pic chromatographique de l'octane pour les deux colonnes utilisées aux différentes températures étudiées. Quelle colonne avez-vous choisie ?
- Consigner dans un tableau les résolutions calculées sur la colonne choisie aux différentes températures étudiées. Quelle température avez-vous choisie ?
- En utilisant les paramètres (colonne, température...) déterminés en GC-FID, identifier chaque pic chromatographique par GC-MS et discuter de l'ordre d'élution.
- Calculer le temps mort de la colonne utilisée à la température déterminée (en GC-FID) à l'aide de l'équation de Kovats : $\ln(t_R - t_M) = an + b$. Pour ce faire, construisez un système à trois équations en utilisant les temps de rétention moyens (t_R) des alcanes calculés à partir des 3 injections réalisées dans des conditions optimales. Effectuer les calculs en utilisant les couples de temps de rétention bruts suivants : ($t_{R(6)}$, $t_{R(7)}$, $t_{R(8)}$) ; ($t_{R(7)}$, $t_{R(8)}$, $t_{R(9)}$) ; ($t_{R(8)}$, $t_{R(9)}$, $t_{R(10)}$) et ($t_{R(6)}$, $t_{R(8)}$, $t_{R(10)}$). Donner le temps mort moyen et son écart-type en vous basant sur les quatre systèmes décrits ci-avant.
- A l'aide d'un logiciel (Matlab), déterminer le temps mort de la colonne en effectuant un "fitting" de la loi exponentielle de Kovats et comparer avec le temps mort moyen calculé à l'aide des systèmes d'équations. Les temps morts ainsi obtenus sont-ils différents du temps mort calculé en se basant sur les dimensions de la colonne chromatographique et le débit de gaz vecteur ? Si oui, pourquoi ?
- En utilisant les temps de retentions nets moyens obtenus dans les conditions optimales, calculer l'indice de Kovats du 2-méthylbutyrate d'éthyle introduit dans le mélange d'alcane. Pensez-vous que cet ester peut être utilisé comme étalon interne pour doser un des alcanes présents dans le mélange ?

VI.2. Analyse quantitative

- Tracer la courbe : $\frac{Aire\ (alcane)}{Aire(étalon)} = k_{m,A/E} \left(\frac{m\ (alcane)}{m\ (étalon)} \right)$
- Déterminer le facteur de réponse $k_{m,A/E}$ ainsi que son écart-type en effectuant une régression linéaire.
- Utiliser les données obtenues pour la détermination de l'indice de Kovats du 2-méthylbutyrate d'éthyle pour accéder à la masse et au pourcentage massique de l'octane dans le mélange par étalonnage interne. Vous devrez donner ces valeurs avec leurs écart-types.
- Comparer le pourcentage massique d'octane obtenu par étalonnage interne avec celui obtenu par normalisation interne.