

# Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

## 1. Définition et application générale :

La chromatographie en phase gazeuse est une **méthode d'analyse par séparation** qui s'applique aux **composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition** (composés volatils, thermiquement stables), c'est-à-dire, essentiellement les **composés organiques**. Comme toute technique de chromatographie, elle permet de **séparer les constituants d'un mélange** en se basant sur une **différence de distribution** de chacun des solutés **entre deux phases** : une phase stationnaire, qui va retenir plus ou moins fortement les composés, et une phase mobile, qui va les entraîner le long de la phase stationnaire.

En CPG, la phase stationnaire est constituée d'un liquide à haut point d'ébullition et la phase mobile est un gaz inerte (appelé gaz vecteur ou gaz porteur : He, Ar, H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> ...) qui parcourt la phase stationnaire à débit constant. Le choix du gaz vecteur est conditionné par le type de détecteur.

## 2. Principe général d'un appareil à chromatographie en phase gaz :

Il est constitué de 3 grandes parties :

- Un injecteur : qui permet l'introduction de l'échantillon (solutés pur ou solubilisés dans un solvant) et son évaporation
- Une colonne : placée dans un four, elle constitue la phase stationnaire qui va permettre la séparation des solutés du mélange. En CPG, elle est généralement de type capillaire.
- Un détecteur : qui va permettre de détecter les solutés en sortie de colonne après séparation. En CPG, la détection par FID (*Flame Ionization Detection* ou détection par ionisation de flamme) est la plus couramment utilisée. Le couplage avec un spectromètre de masse (GC-MS) est de plus en plus souvent utilisé.

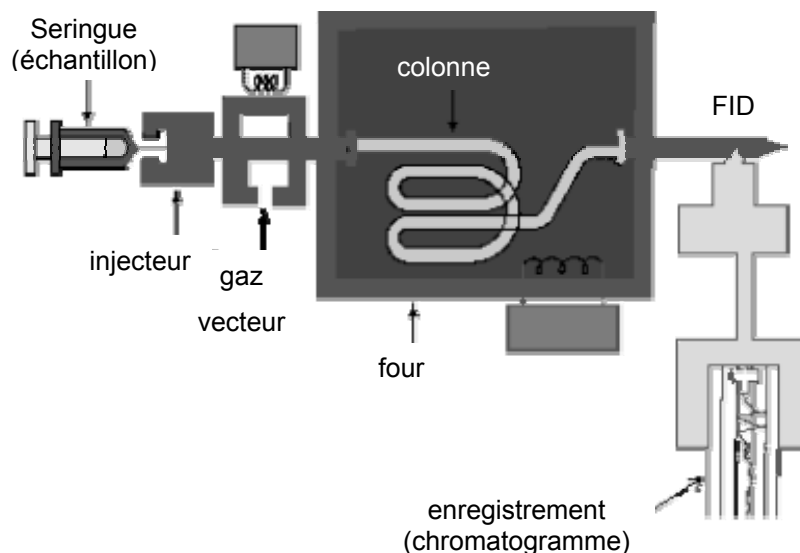
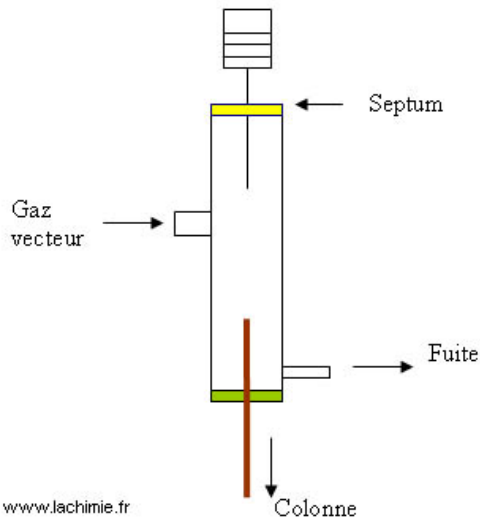


Schéma d'une CPG

### Injecteur :

Les produits sont injectés grâce à des microseringues (volume de 0,5 à 10  $\mu\text{L}$ ) à travers un septum. L'injecteur permet la vaporisation des solutés de l'échantillon qui vont alors se mélanger au gaz vecteur. On rencontre en général 2 types d'injecteurs : avec diviseur (split), qui permettent d'injecter de très faibles volumes et de ne pas

saturer la colonne (colonnes capillaires), ou sans diviseur de flux (splitless), recommandés pour la détection de traces.



En mode splitless, la vanne de fuite est fermée pendant l'injection (de 30 secondes à 1 minute), le solvant et le soluté sont piégés en tête de colonne grâce à une faible température de four. L'augmentation de la température du four permet ensuite d'éluer les composés et le solvant qui sort le premier.

La température de l'injecteur est fixée à une température de 20°C supérieure à la température d'ébullition du composé le moins volatil (bloc chauffant : 180 – 400°C).

Remarque : l'évaporation va entraîner l'expansion du gaz : 1 µl de liquide va donner 100 à 1000 µl de gaz (exemple : à 200°C et 100 kPa, 1 µl de méthanol donne 483 µl de méthanol gazeux).

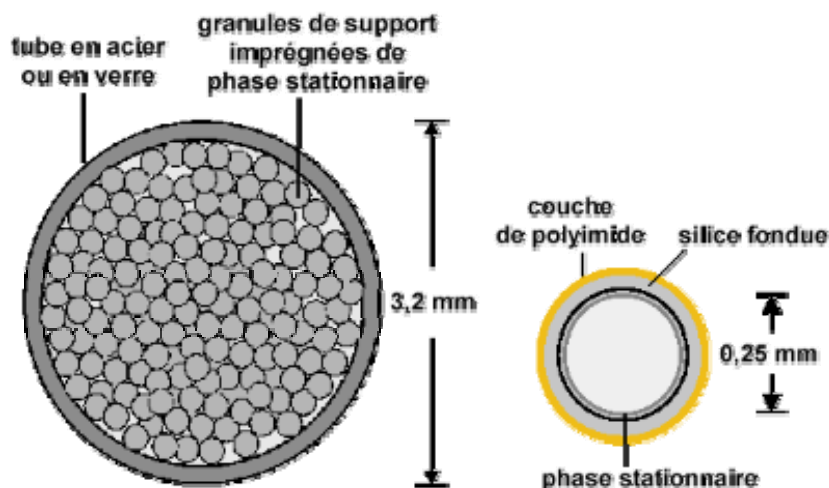
#### Autres types d'injecteurs

- On-column à froid : l'échantillon est déposé en tête de colonne, à faible température, et entraîné après vaporisation rapide.
- vanne d'injection

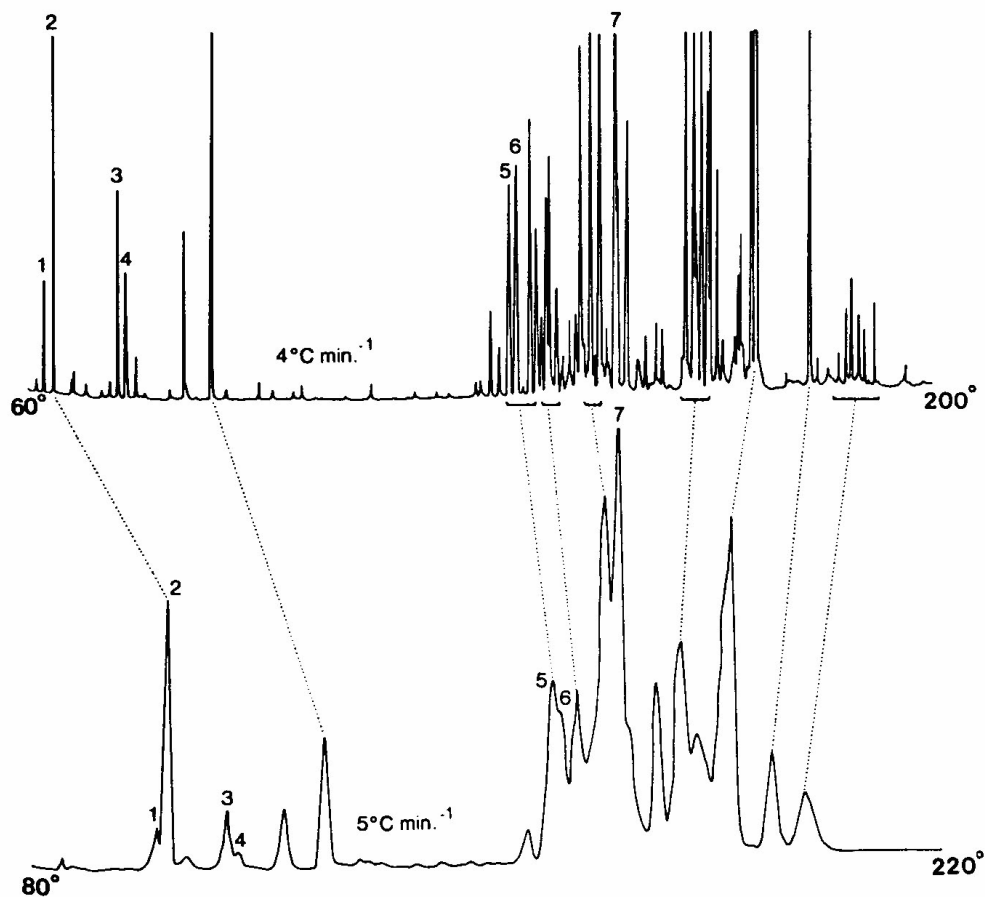
#### Colonnes en CPG :

Il s'agit d'un tube en acier inox rempli de grains fins (de granulométrie contrôlée permettant un remplissage homogène et une séparation efficace) constitués d'un support inerte recouvert d'un film liquide de haut point d'ébullition qui joue le rôle de phase stationnaire pour les colonnes remplies.

Dans le cas des colonnes capillaires, la phase stationnaire est directement déposée sur la paroi interne de la colonne.



Remarque : dans les 2 cas, il s'agit de chromatographie gaz-liquide car la phase mobile est un gaz et la phase stationnaire un liquide. La phase stationnaire peut aussi être un solide adsorbant (silices, alumines, zéolithes, polymères...). On parle alors de chromatographie gaz-solide.



Séparation en CPG sur colonne capillaire (en haut) et sur colonne remplie (en bas) des constituants d'une huile. Illustration du pouvoir résolutif d'une colonne capillaire.

Des caractéristiques de la colonne, c'est-à-dire de la phase stationnaire, dépend la qualité de la séparation :

- nature de la phase stationnaire : les principales phases stationnaires sont de type polyéthylène glycols -  $[\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}]_n$  - ou polysiloxanes -  $[\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O-Si}(\text{CH}_3)_2\text{O}]_n$  - (ces dernières étant les plus courantes). Plus leur polarité est élevée, plus la phase stationnaire est polaire et plus elle va retenir les composés polaires.
- température de la colonne : elle peut être variable au cours de la chromatographie (gradient de température) pour raccourcir le temps de rétention des composés les plus retenus et affiner les pics correspondant.
- longueur de la colonne (quelques mètres, jusqu'à 100 m)
- diamètre interne de la colonne (0,1 – 0,5 mm). Plus il est faible, plus l'efficacité de la colonne est élevée
- épaisseur du film de phase stationnaire : les films épais sont plus larges d'utilisation mais augmentent le temps de rétention ce qui a souvent pour conséquence d'augmenter la température de la colonne.

**Processus de séparation de deux solutés :**

Un soluté A pénétrant dans la colonne à l'état vapeur et arrivant au contact de la phase stationnaire va se partager entre les deux phases. A l'équilibre, on peut écrire :

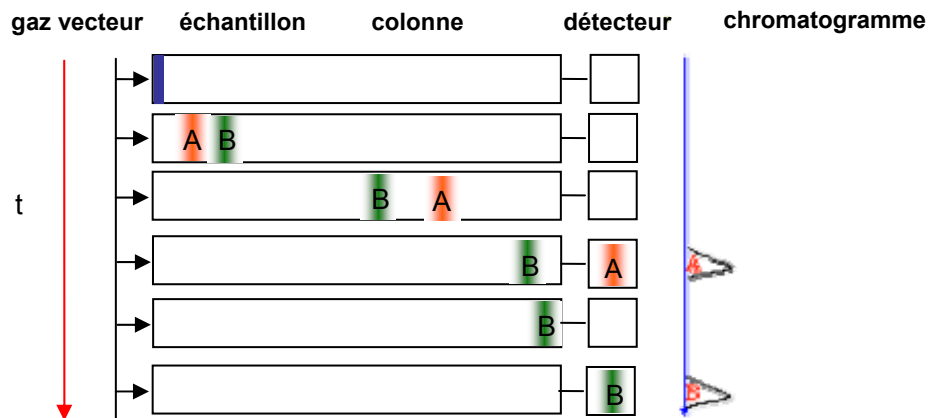
$$K = [A]_s / [A]_v$$

K, ou coefficient de partage, est une constante. Pour un soluté A donné, sa valeur dépend de la température de la colonne et de la nature de la phase stationnaire.

La séparation de plusieurs solutés en mélange se fonde sur deux grands critères en CPG :

- la volatilité
- la polarité

Les solutés sont principalement séparés suivant leur température d'ébullition auquel on rajoute l'influence de leur polarité. Il est généralement conseillé d'utiliser la colonne la moins polaire possible permettant une bonne séparation. Sur une colonne apolaire, les composés apolaires sont élués suivant leur température d'ébullition. Entre 2 composés de même température d'ébullition, le composé le plus polaire sera le moins retenu.

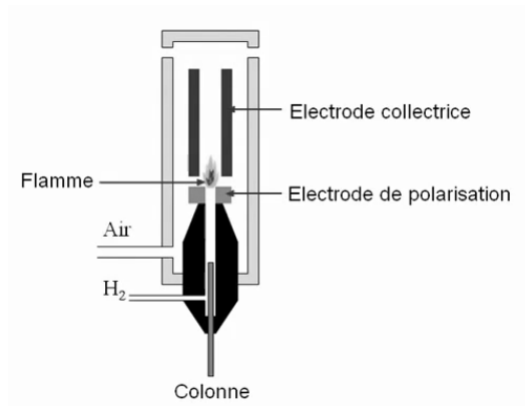


Les interactions différentielles des solutés A et B avec les 2 phases résultent en une séparation des ces derniers. Ici, A est plus volatil que B ou interagit moins fortement avec la phase stationnaire (A est moins polaire que B).

Remarque : la solubilité d'un gaz diminue quand la température augmente : les analytes sont donc moins retenus quand la température croît d'où l'utilisation d'un gradient de température pour éluer les composés les plus fortement retenus sur la phase stationnaire.

#### **Détection FID :**

- très sensible, universel (sauf composés simples :  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  et inorganiques), ne convient qu'aux composés organiques
- les composés sont brûlés dans une flamme  $\text{O}_2/\text{H}_2$
- une électrode collecte les ions carbone formés qui proviennent de la décomposition des solutés dans la flamme (destructif) qui vont générer un faible courant (de quelques nA) d'ionisation, qui va être ensuite amplifié.
- large gamme de linéarité :  $10^7$  ; limite de détection : 20 à 100 pg
- en l'absence de solutés en sortie de colonne, le gaz vecteur arrive à débit constant (pression constante) au détecteur et produit un courant ionique résiduel très faible et constant  $\rightarrow$  ligne de base  $\sim 0$
- lorsqu'un soluté brûle dans la flamme, il y a formation d'ions  $+$ , captés par une électrode collectrice portée à un potentiel négatif par rapport à la tête du brûleur, et d'électrons  $\rightarrow$  création d'un courant ionique de quelques nA, proportionnel au débit-masse de soluté.
- il est discriminant : sa réponse varie suivant les produits injectés, ce qui impose un étalonnage (coefficients de réponse) si on veut analyser un mélange



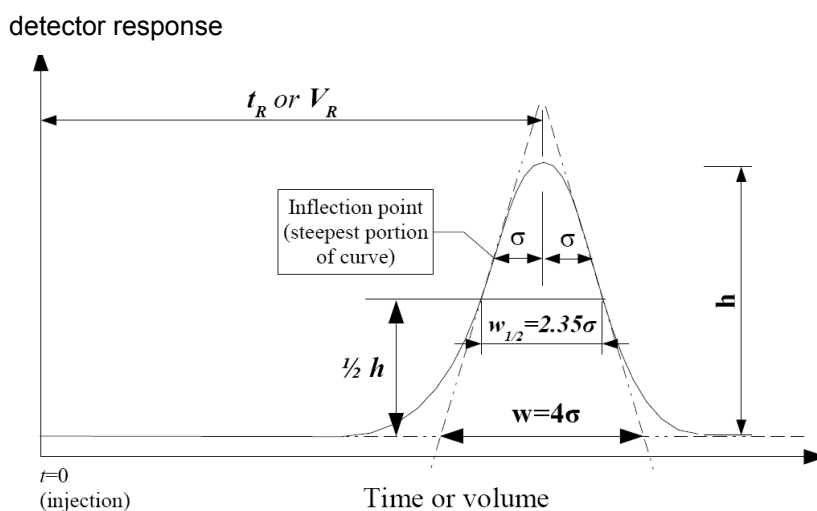
Principe de la détection par ionisation de flamme (FID)

**Autres détecteurs :**

- Thermo-ionique : utilisés pour les composés azotés ou phosphorés, ou halogénés. Les composés azotés minéraux ne sont pas détectés. Gaz vecteur : azote
- A capture d'électrons : détection de molécules ayant des groupements électrophiles donc ayant une grande affinité électronique (particulièrement adapté aux composés halogénés).
- A photométrie de flamme : principalement utilisé pour les composés contenant du soufre ou du phosphore. Sa réponse est proportionnelle au débit massique. Gaz vecteur :  $N_2$  ;  $H_2$
- Spectrométrie de masse : très sensible (moins d'1 pg) et universel. Gaz vecteur : He
- Infrarouge : assez peu sensible mais universel. Les gaz vecteur compatibles sont l'hydrogène, l'azote et l'hélium
- Photoionisation : adapté à la détection de composés ionisables. Le détecteur est très sensible et sa réponse est proportionnelle sur une large gamme à la concentration en soluté.

**Chromatogramme d'un soluté : aspects qualitatif et quantitatif**

- Le tracé d'un chromatogramme correspond à l'enregistrement de l'intensité du signal généré par le détecteur en fonction du temps



- A partir du chromatogramme, il est possible d'identifier un soluté grâce à son temps (ou volume) de rétention par comparaison avec un standard (aspect qualitatif), ainsi que de déterminer sa concentration dans un mélange (aspect quantitatif).

# Spectrométrie de masse MALDI-TOF (MALDI-TOF MS)

## 1. Principe de l'analyse par spectrométrie de masse :

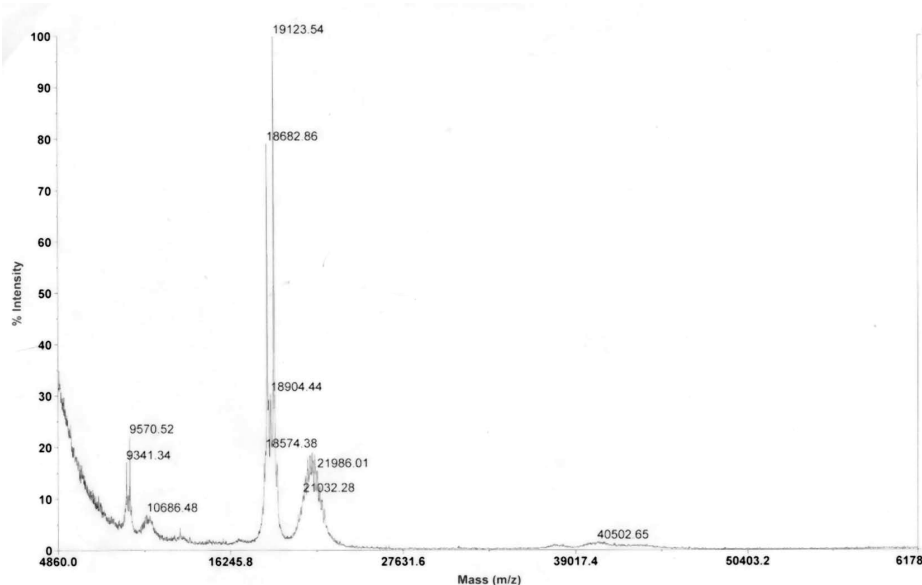
- déterminer la masse moléculaire d'un composé : la spectrométrie de masse MALDI-TOF s'adresse principalement aux composés thermolabiles, non volatils de **haut poids moléculaire** (peptides, protéines, glycoprotéines, oligosaccharides, oligonucléotides)
- déterminer la masse moléculaire des monomères (ou résidus) constituant ces composés par fragmentation (MS/MS) : obtention de la séquence primaire, sites de modifications post-traductionnelles...

## 2. Principe général d'un spectromètre de masse

Il est constitué de 3 grandes parties :

- une source d'ionisation : ionise les molécules de l'échantillon (type ESI= ElectroSpray Ionisation ; MALDI = Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation). Les ions sont plus faciles à analyser que les composés neutres
- un analyseur : permet la séparation des ions en fonction de leur ratio masse sur charge  $m/z$  (quadrupole, temps de vol=TOF, FT-ICR)
- un détecteur : détecte les ions après leur séparation et donne un signal en fonction de leur abondance relative. Il mesure et amplifie le courant ionique.

→ on obtient un spectre  $m/z$  en fonction de l'intensité de chaque ion



Remarque : les 3 parties sont généralement maintenues sous un vide poussé pour permettre aux ions de traverser l'ensemble de part en part sans être gênés par des collisions avec des molécules d'air.

## Introduction de l'échantillon :

- dépend de la méthode d'ionisation et du type d'échantillon
- soit directement dans la source d'ionisation (MALDI ou ESI), soit « en chemin » vers la source. Ce dernier mode d'introduction (ESI uniquement) implique un couplage avec un appareil de chromatographie localisé en amont du spectromètre de masse (LC-MS ou GC-MS). Dans ce cas, l'analyse MS intervient après

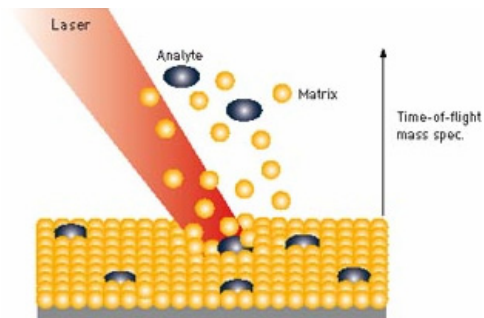
passage (et donc séparation des différents constituants d'un mélange) sur une colonne chromatographique : les composés arrivent les uns après les autres au spectromètre de masse.

### **Spectrométrie de masse MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionisation – time of flight)**

- Ce type de MS permet l'analyse de composés de haut poids moléculaires avec une précision de l'ordre de 1:10 000<sup>e</sup> au moins pour les composés de masse inférieure à 40 000 Da.
- L'échantillon est co-cristallisé avec un composé, appelé **matrice**, qui va absorber fortement l'énergie du laser qui va permettre l'ionisation des molécules de l'échantillon.



*cible MALDI*

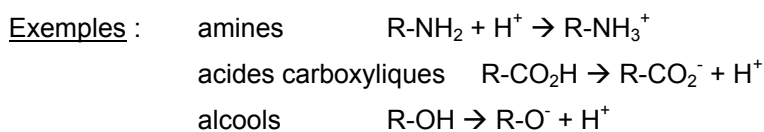


La matrice va transformer l'énergie du laser en énergie excitatrice pour les molécules de l'échantillon et permettre l'éjection d'ions de la surface du mélange échantillon/matrice en phase gazeuse. Il s'agit d'un mode d'ionisation douce qui n'endommage pas les molécules.

→ ce mode d'ionisation génère des ions portant une seule charge et donc des spectres faciles à interpréter. En général, la fragmentation des ions ne se produit pas.

→ deux modes d'ionisation : positive ou négative. Le choix du mode d'ionisation se fait en fonction des groupes fonctionnels présents dans l'échantillon : présence de groupements qui acceptent ou perdent un proton.

- ionisation positive (en général pour les peptides et protéines) : donne comme espèces majeures des ions moléculaires protonés ( $M+H^+$ ) @  $m/z$ , accompagnés parfois d'adduits (sodium  $m/z + 22$  et/ou potassium  $m/z + 38$ , par exemple). On observe parfois des espèces doublement chargées @  $\frac{1}{2} m/z$  et des dimères @  $2 m/z$ .
- ionisation négative (en général pour les oligonucléotides et les oligosaccharides) : produit comme espèces majeures des ions moléculaires déprotonés ( $M-H^-$ ) @  $m/z$ , accompagnés parfois d'adduits, d'espèces doublement chargées @  $\frac{1}{2} m/z$  ou de dimères @  $2 m/z$ .



- les ions sont ensuite accélérés dans un champ électrique vers le détecteur qui détermine leur masse comme une fonction du "temps de vol" (*time-of-flight*, TOF) : les molécules de masse plus faible vont progresser et

atteindre le détecteur plus rapidement que les molécules de masse plus élevées). L'analyseur mesure donc le temps qu'ont mis les ions pour parcourir la région sans champ électrique (dans le « drift tube »)

**Analyseur en temps de vol :**

