

# De la chromatographie en phase liquide à la chromatographie électrocinétique

J.-L. Rocca

Laboratoire des Sciences Analytiques, UMR CNRS 5619, Université C. Bernard-Lyon 1, Bât. 308, 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France

La chromatographie en phase liquide est devenue une des techniques privilégiées pour résoudre des problèmes « simples » couramment rencontrés dans les laboratoires, grâce aux très nombreuses années de développements technologiques. Avec les mêmes bases chromatographiques, nous assistons actuellement à l'émergence de la chromatographie électrocinétique. Elle présente de nombreux avantages : elle permet en particulier la miniaturisation extrême et d'atteindre des efficacités de séparation que l'on ne peut obtenir aujourd'hui avec la chromatographie traditionnelle.

## Évolution de la Chromatographie en Phase Liquide (LC)

La Chromatographie en Phase Liquide (LC) moderne résulte de développements successifs, plus ou moins rapides, qui l'ont conduit à sa maturité actuelle. La technologie actuelle offre une instrumentation fiable, de plus en plus informatisée, permettant une automatisation quasi complète des méthodes d'analyse, mais il convient cependant de rester vigilant pour que cette informatisation ne soit qu'un confort pour l'analyste, sans pour cela se substituer à la compétence de l'analyste. Cependant, on peut considérer que le développement majeur de la technique résulte des progrès considérables qui ont été réalisés dans le domaine des phases stationnaires, tant sur leur structure que sur leur texture.

Ainsi, les améliorations apportées aux méthodes de greffage ont permis de réaliser des structures de surface reproductibles, relativement stables, et suffisamment variées pour permettre à l'analyste des choix de couples « phases mobiles / phases stationnaires » offrant les sélectivités nécessaires à la résolution de la plupart des séparations, compte tenu des efficacités actuellement générées par les colonnes de chromatographie.

En ce qui concerne la texture des phases stationnaires, les diminutions successives de leur granulométrie ont permis la réduction des temps d'analyses, ramenés à quelques minutes ou à quelques dizaines de minutes dans la plupart des analyses conduites avec des colonnes remplies de grains de 5 micromètres. En effet, cette réduction de la taille des grains permet d'accroître le nombre de plateaux théoriques par unité de temps générés par les colonnes chromatogra-

phiques. D'autres caractéristiques de texture restent également importantes, telles que diamètre moyen et distribution des diamètres de pores, distribution granulométrique, surface spécifique, forme, etc... La contrepartie de cette réduction du diamètre des grains est l'augmentation de la perte de charge des colonnes (pression en tête de colonne) à nombre de plateaux théoriques constant : réduire la granulométrie d'un facteur 2 conduit à une pression accrue d'un facteur  $2^2$  si la colonne reste éluée à sa vitesse optimum, bien que sa longueur soit divisée par 2 pour générer le même nombre de plateaux théoriques. Ces différentes considérations conduisent aujourd'hui à l'utilisation courante de colonnes remplies de grains de 5 micromètres, pour des longueurs de quelques dizaines de centimètres, voire même de 3 micromètres pour des longueurs plus courtes de quelques centimètres. Envisager l'utilisation de phases stationnaires de plus faibles granulométries pose des problèmes, même si on assiste aujourd'hui à l'apparition de phases stationnaires de 1 à 2 micromètres : ces colonnes restent utilisées avec des débits d'élution faibles par rapport aux débits qu'il conviendrait d'imposer pour générer les performances attendues sur de telles colonnes, et ceci dans le seul but de limiter leurs pressions d'utilisation.

Un autre aspect de l'évolution de la technique chromatographique concerne sa miniaturisation. Cette évolution, bien que latente depuis quelques années, semble s'amorcer aujourd'hui pour diverses raisons, parmi lesquelles on peut citer la nécessité de réduire la sensibilité massique des analyses (très faibles quantités massiques d'échantillons), la nécessité de réduire la consommation des solvants organiques qu'il convient de mettre en œuvre pour les analyses (réduction du rejet des solvants usés), couplage de la LC avec la spectrométrie de masse, ... Cette miniaturisation ne peut se faire sans veiller à ce que la dispersion générée par l'environnement de la colonne (vanne d'injection, tubes de connexion, système de détection) ne détruise tout ou partie de la séparation chromatographique réalisée par la colonne proprement dite : les choix technologiques restent alors limités, voire même inexistantes dans le cas de miniaturisation extrême de la colonne.

Même si la LC est devenue aujourd'hui une technique mature qui satisfait sous sa forme actuelle la plupart des laboratoires d'analyse, certains de ses développements sont (ou seront) rendus nécessaires par les nouvelles exigences auxquelles la technique doit (ou devra) répondre. Face aux problèmes d'ordre théorique ou technique exposés ci-dessus, les chercheurs ont été amenés à examiner les possibilités de la chromatographie électrocinétique (EKC).

### Évolution de la Chromatographie Électrocinétique (EKC)

La EKC est directement issue des développements successifs de la technique initiale d'Électrophorèse Capillaire de Zone, consistant à faire migrer des espèces chargées sous l'effet d'un champ électrique.

Cette technique donna tout d'abord naissance à l'Électrophorèse Capillaire de Zone à Haute Performance, décrite par Mikkers [1], puis à l'Électrophorèse Capillaire de Zone (ZCE) développée par Jorgenson [2], par la simple utilisation de tubes capillaires de silice fondue de faibles diamètres internes, rendant possible l'utilisation de très hauts voltages conduisant ainsi à des temps d'analyse courts et à des efficacités de séparation très élevées. En effet, dans des conditions convenables d'utilisation de la technique (dissipation convenable de la chaleur générée par effet Joule au sein de l'électrolyte), on peut démontrer que le seul processus de dispersion au cours de la migration est le processus de diffusion moléculaire, la convection du milieu électrolytique par électroosmose n'engendrant quant à elle aucun phénomène de dispersion du fait d'un profil plat des vitesses dans une section droite du tube. Tout d'abord réservée à la séparation de biopolymères car la technique est d'autant plus performante en terme de nombre de plateaux théoriques (proche du million de plateaux théoriques) que les composés sont de hauts poids moléculaires (composés à faibles coefficients de diffusion), elle fut ensuite utilisée pour la séparation d'ions classiques (minéraux ou organiques), en restant néanmoins performante même si le nombre de plateaux théoriques est alors plus modeste (100 000 – 200 000).

Toutefois limitée à l'analyse d'ions, la technique d'Électrophorèse Capillaire de Zone a engendré la technique de Chromatographie Électrocinétique permettant également la séparation d'espèces neutres : cette technique dite de Chromatographie Électrocinétique Micellaire (MEKC) fut tout d'abord décrite par Terabe [3]. La séparation d'espèces neutres n'étant pas possible sous l'effet d'un simple champ électrique car migrant à la même vitesse par simple transport par l'électrolyte, l'idée initiale fut de provoquer des interactions entre ces molécules neutres et une phase hydrophobe constituée par des micelles en solution dans l'électrolyte (milieu micellaire possédant une vitesse de migration différente de celle de l'électrolyte). Cette différence de

vitesse entre les deux phases, l'électrolyte et cette pseudo-phase stationnaire, rend possible la séparation des espèces neutres si leurs constantes d'équilibre de distribution entre chacune des deux phases sont différentes : toute interaction de l'espèce avec la pseudo-phase stationnaire altère la vitesse de migration de l'espèce concernée. Ainsi, dans cette technique MEKC, on retrouve les principes de la migration chromatographique, d'où le nom de chromatographie électrocinétique micellaire. Si en chromatographie classique le phénomène de « rétention chromatographique d'une espèce » traduit la diminution de sa vitesse de migration par rapport à celle de la phase mobile par son interaction avec la phase fixe, le même phénomène est rendu possible en MEKC par les vitesses différentes des deux phases : on peut même assister à une accélération de l'espèce concernée si la vitesse de migration de la pseudo-phase stationnaire est supérieure à celle de l'électrolyte. Comme on peut le voir, on peut dès lors imaginer tout système de phases (électrolyte/pseudo-phase stationnaire), la seule condition étant que les vitesses de migration de l'espèce soient différentes, selon qu'il est distribué vers l'électrolyte ou selon qu'il est distribué vers la pseudo-phase stationnaire. De nombreux exemples illustrent cette technique de MEKC, par l'utilisation de tensioactifs divers et variés à des concentrations supérieures à leur concentration critique micellaire. L'utilisation de pseudo-phases stationnaires telles que des cyclodextrines (natives ou modifiées) ou des sels biliaires peut conduire à la séparation chirale de certains énantiomères.

Depuis peu, l'utilisation de microémulsions comme pseudo-phases stationnaires peut désormais permettre l'analyse de molécules fortement hydrophobes par chromatographie électrocinétique en microémulsion [4].

Le dernier stade du développement de cette technique est la technique de chromatographie électrocinétique consistant à utiliser non plus des pseudo-phases stationnaires, mais de véritables phases stationnaires comme celles traditionnellement utilisées en LC, la phase mobile n'étant plus poussée à travers le circuit chromatographique par une pompe classique de chromatographie en phase liquide, mais poussée par le phénomène d'électroosmose. Ce principe de migration de la phase mobile à travers un lit chromatographique par électroosmose avait déjà été envisagé par V. Pretorius en 1974 [5] dans un article intitulé « Electroosmose : un nouveau concept pour la chromatographie en phase liquide à grande vitesse ». Depuis les premières séparations montrées par

**Tableau I. Mobilités électrosmotiques, mobilités électrophorétiques des microémulsions, facteurs de rétention des composés digitaux, efficacités (N) des microémulsions A, B, C, D.**

Micro-émulsion	Mobilités $cm^2 s^{-1} V^{-1}$	Deslanoside	Digoxin	Acetyldigoxin	Acetyldigitoxine
A	$m_{eo} = 3.63 \times 10^{-4}$	$k' = 1.93$	$k' = 2.23$	$k' = 4.08$	$k' = 9.26$
	$m_{ep} = -2.86 \times 10^{-4}$	N # 50 000	N # 400 000	N # 55 000	N # 158 000
B	$m_{eo} = 3.90 \times 10^{-4}$	$k' = 1.61$	$k' = 1.81$	$k' = 3.32$	$k' = 8.25$
	$m_{ep} = -2.83 \times 10^{-4}$	N # 77 000	N # 450 000	N # 132 000	N # 166 000
C	$m_{eo} = 3.83 \times 10^{-4}$	$k' = 1.71$	$k' = 1.97$	$k' = 4.17$	$k' = 11.90$
	$m_{ep} = -2.87 \times 10^{-4}$				
D	$m_{eo} = 3.75 \times 10^{-4}$	$k' = 1.30$	$k' = 1.39$	$k' = 2.45$	$k' = 6.09$
	$m_{ep} = -2.58 \times 10^{-4}$				

Knox en 1991 [6] par l'utilisation d'un tube de silice fondue de 40 micromètres de diamètre interne et rempli sur 50 centimètres de phase stationnaire ODS Hypersil de 5 micromètres de diamètre, sont apparues de nouvelles phases stationnaires de type silice greffée apolaire, entièrement ou superficiellement poreuses ou des phases stationnaires mixtes, de granulométrie voisine de 1 ou 2 micromètres, quasi monodisperses. Ces phases ne peuvent être utilisées en LC traditionnelle dans des conditions de débit optimum, même pour des colonnes courtes de quelques centimètres du fait des pressions très élevées qu'elles génèrent. En revanche, des colonnes garnies de telles phases stationnaires, de plusieurs dizaines de centimètres de longueur, peuvent être utilisées en chromatographie électrocinétique car l'écoulement électroosmotique de la phase mobile s'effectue sans générer de perte de charge en tête de colonne. Par ailleurs la réduction de la dispersion générée par la convection conduit à des efficacités réduites de colonne inférieure à 2, valeur qu'il est impossible d'atteindre en LC traditionnelle. Ainsi, des colonnes remplies de phases stationnaires de 1,5 micromètres de diamètre sur des longueurs de 50 centimètres peuvent permettre d'espérer des efficacités voisines de 150 000 à 200 000 plateaux théoriques. On voit ainsi que la chromatographie électrocinétique est une des solutions permettant non seulement la miniaturisation extrême de la technique puisque les colonnes (50 micromètres de diamètre interne) sont éluées à des débits de l'ordre de quelques centaines de nanolitres par minute, mais également l'utilisation de phases stationnaires de très fine granulométrie que l'on ne sait utiliser aujourd'hui en LC traditionnelle. Citons enfin les travaux de Tsuda [7] montrant l'utilisation d'une colonne capillaire de 10 micromètres de diamètre interne (phase sta-

tionnaire déposée sur la paroi du tube) réalisant la séparation d'espèces chargées par électrochromatographie, séparation ne pouvant être effectuée avec la même colonne ni en Électrophorèse Capillaire de Zone traditionnelle (différences de mobilités apparentes insuffisantes pour permettre la séparation), ni en LC « classique » (sélectivité du couple « phase mobile/phase stationnaire » insuffisante pour permettre la séparation). Un article récemment publié dans *J. of Microcolumn Separations* [8] résume les différentes possibilités de cette technique.

### Conclusion

De nombreux travaux sont aujourd'hui publiés dans le domaine de l'électrochromatographie : le potentiel de cette technique est très important mais il reste encore de gros progrès à faire, tant sur le plan théorique que sur le plan technologique, pour rendre cette technique utilisable facilement. Nous avons voulu montrer dans cet article que ses ressources sont très nombreuses et très variées, même si la maîtrise de ses conditions expérimentales reste encore très difficile à atteindre. Cette technique semble en tout cas particulièrement adaptée à la miniaturisation extrême et permet d'atteindre des efficacités de séparation que l'on ne peut espérer aujourd'hui en LC traditionnelle.

La LC traditionnelle, quant à elle, lorsqu'elle est bien utilisée, dispose encore de ressources qui restent loin d'être épuisées : elle permet la résolution de problèmes « simples » qui ne requièrent que quelques dizaines de milliers de plateaux théoriques, mais qui restent les problèmes les plus

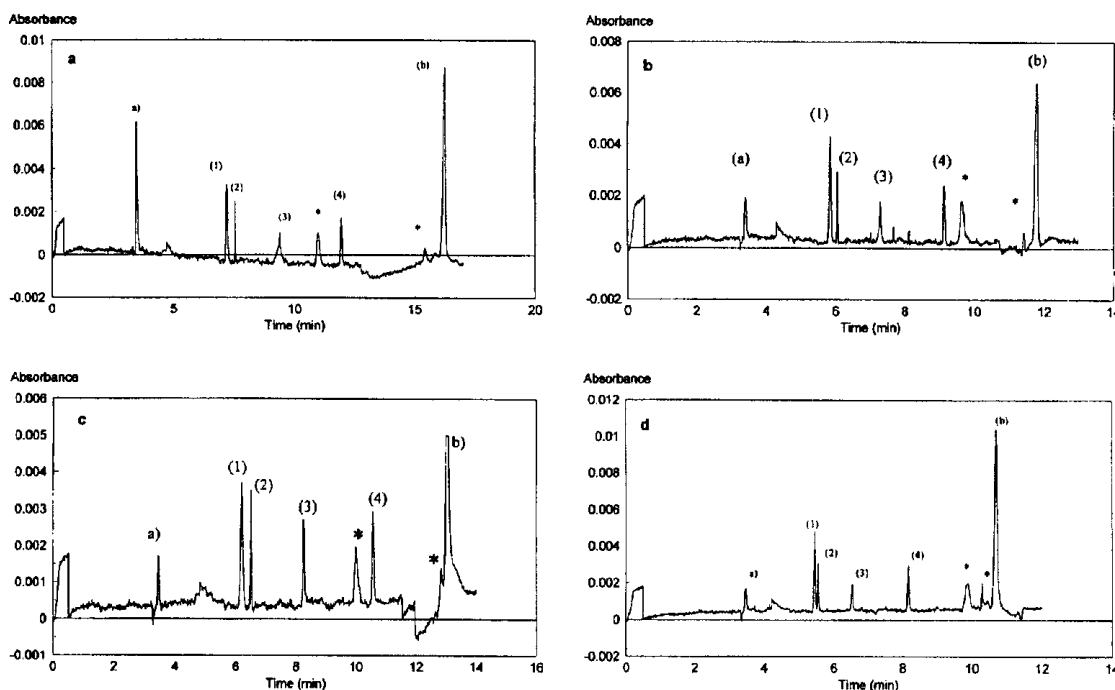


Figure 1. Séparation de quatre glycosides cardiaques par chromatographie électrocinétique en milieu microémulsion. a) Microémulsion A, b) Microémulsion B, c) Microémulsion C, d) Microémulsion D. Capillaire de silice fondue :  $L = 47$  cm,  $l = 40$  cm,  $I.D. = 50$   $\mu$ m,  $V = 25$  kV, Détection UV à 220 nm. a) Méthanol, (1) deslanoside, (2) digoxine, (3) acétyldigoxine, (4) acétyldigitoxine, (\*) impureté, b) dodécylbenzène.

fréquemment rencontrés dans les laboratoires d'analyse. Elle dispose d'une technologie fiable, fruit de très nombreuses années de développement. Il semble cependant que dans le cadre de sa miniaturisation future, de nouveaux concepts technologiques soient à développer.

LC traditionnelle ou EKC future, les bases chromatographiques restent néanmoins les mêmes à quelques variantes près et la compétence de l'analyste restera la condition essentielle pour la réalisation de bonnes séparations.

### Références

1. Mikkers, F. E. P.; Everaerts, F. M.; Verheggen, Th. J. *Chromatogr.* **1979**, 169, 11.
2. Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D. *Anal. Chem.* **1981**, 53, 1298.
3. Terabe, S.; Otsuka, K.; Ishikawa, K.; Tsukiya, A.; Ando, T. *Anal. Chem.* **1984**, 56, 111.
4. Debusschere, L.; Demesmay, C.; Rocca, J. -L.; Lachatre, G.; Lofti, H. *J. Chromatogr. A* **1997**, 779, 227.
5. Pretorius, V.; Hopkins, B. J.; Schieke, J. D. *J. Chromatogr.* **1974**, 99, 23.
6. Knox, J. *Chromatographia* **1991**, 7-8, 317.
7. Tsuda, T. *LC/GC Int.* **1992**, 5, 26.
8. Robson, M. M.; Cikalo, M. G.; Myers, P.; Euerby, M. R.; Bartle, K. D. *J. Microcolumn Sep.* **1997**, 9, 357.