

Électrochromatographie (CEC) "Who is afraid of CEC"

A.M. Siouffi¹, V. Tomao¹ et J. Pesek²

¹ UMR Synthèse, Catalyse et Chiralité, Faculté des Sciences et Techniques de Saint Jérôme, Université d'Aix-Marseille III, 13397 Marseille Cedex 20, France

² Department of Chemistry, San Jose State University, One Washington Square, San Jose, CA 95192, USA

Capillary electrochromatography (CEC) combines HPLC (High Performance Liquid Chromatography) and HPCE (High Performance Capillary Electrophoresis). The paper deals with some questions that arise to the beginner or those who are not experts in the technique. It is presented as a controversial debate between trained HPLC analyst and enthusiastic CEC user. It is summarized that the analyst can monitor many parameters such as fluid velocity, gradient formation, etc., to achieve excellent separations. Very small particles are capable of providing high efficiencies. Monoliths are under development. However CEC is not yet a mature technique since some problems must be solved such as frit manufacture, injection device and dedicated instrument.

laquelle le tube contient une phase stationnaire. La phase mobile est en général une solution hydroorganique, la phase stationnaire est une silice greffée. C'est un hybride de la chromatographie et de l'électrophorèse. Les solutés sont séparés suivant leur mobilité électrophorétique et leur coefficient de distribution entre la phase mobile et la phase stationnaire.

Comme toute technique hybride il y a des avantages et des inconvénients tirés de l'une et de l'autre méthode, et l'utilisateur éventuel peut se demander ce qui l'emporte. Nous donnerons tour à tour la parole à l'accusation et à la défense.

En CLHP, le contrôle de la vitesse linéaire du fluide vecteur peut être réalisé très aisément, ce n'est pas le cas de la CEC

Il est vrai que les paramètres sont plus difficiles à maîtriser en CEC car la force ionique de la phase mobile et la température sont des facteurs qui n'interviennent que de façon minimale en CLHP.

La CEC est-elle aussi efficace (en nombre de plateaux) que la CLHP ?

Oui dans la mesure où l'on ne peut pas allonger indéfiniment une colonne de CLHP alors qu'on peut le faire avec une colonne de CEC puisqu'on n'est pas limité par la perte de charge.

En CLHP, le liquide vecteur est véhiculé par une pompe et la pression disponible est le facteur limitant puisque la pression augmente avec la longueur de la colonne et surtout elle est inversement proportionnelle au carré du diamètre des particules. Avec 400 bars on ne peut guère envisager que des colonnes de 5 cm de long remplies avec des particules de 1,5 μm . En CEC, le déplacement du fluide vecteur est engendré par le flux électroosmotique. Si l'on considère simplement un tube de silice rempli de particules de silice, ces dernières forment une multitude de canaux capillaires interconnectés mais le potentiel ζ (zeta) est le même.

Le flux osmotique est proportionnel à la quantité de charges accumulées à la surface du capillaire et des particules. Il est indépendant du diamètre de celles-ci, on peut remplir des capillaires avec des particules de 0,5 à 0,8 μm .

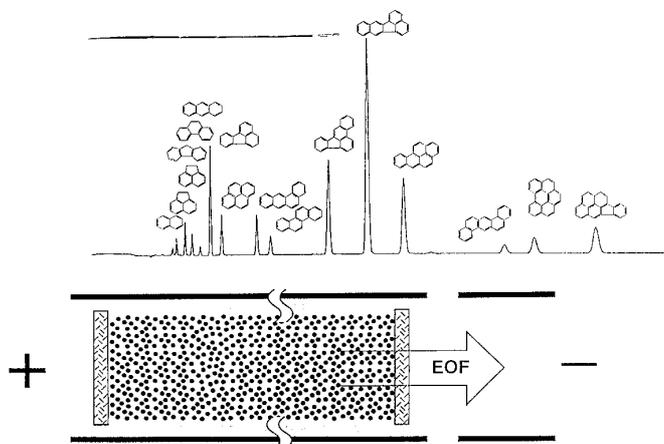


Figure 1. Reproduit avec la permission de Unimicro Technologies, Pleasanton, CA, USA.

De façon simple, l'électrochromatographie capillaire (CEC) est une chromatographie liquide capillaire dans laquelle un champ électrique entraîne la phase mobile et les solutés. Une autre manière de voir les choses est de considérer qu'il s'agit d'une électrophorèse capillaire dans

Le grand avantage de la CEC est le profil plat comparé au profil parabolique inhérent à l'hydrodynamique en CLHP. De toutes les contributions à l'élargissement des zones, seules la diffusion interparticulaire et la diffusion tourbillonnaire dépendent du profil de vitesse ; si les différences en termes de diffusion interparticulaire sont relativement faibles, la différence en terme de diffusion tourbillonnaire est importante. On a pu engendrer 100 000 plateaux en 2 minutes [1] et même plusieurs millions de plateaux par mètre [2].

Avec des capillaires remplis de petites particules (1,5 µm) les efficacités exprimées en hauteur de plateaux réduite ne sont grandes que pour des composés non retenus

On le constate expérimentalement et c'est surtout sensible lorsque les particules sont poreuses. Une différence notable est observée entre les particules poreuses et non poreuses.

La préparation des frittés relève de l'habileté de l'analyste

C'est vrai. Il s'agit d'une étape cruciale qui conditionne la qualité de la séparation et la formation éventuelle de bulles. Plusieurs procédés ont été décrits [3]. En général, les frittés sont fabriqués par agglomération du support par chauffage au moyen d'un filament. Avec la silice hyper pure, on n'arrive pas à faire des frittés corrects car les polysilicates se forment à 550 °C en présence de sodium.

Les frittés mécaniquement stables ne peuvent être réalisés qu'avec des silices contenant beaucoup de sodium. Il faut imprégner la silice par un silicate de sodium ou de

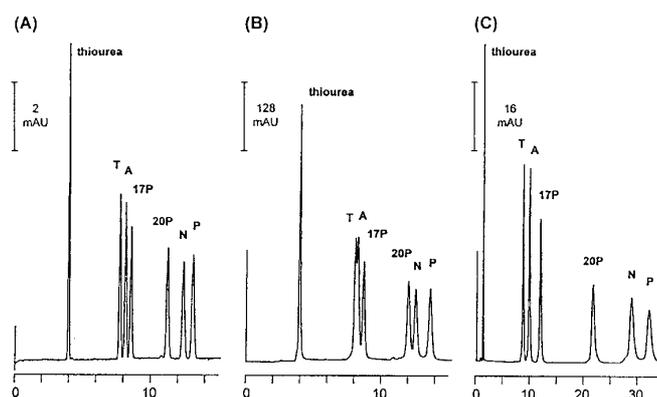


Figure 2. Séparations de progestérone [P] et de ses métabolites 17 α-hydroxyprogestérone [17P], 20 α-hydroxyprogestérone [20P], androsténédione [A] et testostérone [T] plus noréthindrone [N, référence interne standard] et thiourée, obtenues par (A) CEC, (B) CLHP, (C) CLHP avec changement de solvant. Conditions opératoires voir tableau I.

potassium. Les frittés sont testés en remplissant le capillaire d'eau et en montant en pression.

La plupart des colonnes sont préparées par remplissage de capillaires de 20 – 100 µm de diamètre interne. Les particules de silice greffées ont un diamètre nominal de 0,5 à 1,5 µm. Les performances de telles colonnes dépendent de la qualité des frittés. La solution vient des colonnes monolithes comme celles réalisées par Horvath par sinterisation *in situ* [4].

Frechet et al. [5] ont préparé des monolithes par copolymérisation de méthacrylate de butyle, diméthacrylate d'éthylène et d'acide 2-acrylamido-2-méthyl-1 propane sulfonique. On fonde beaucoup d'espoirs sur les monolithes.

Tableau I. Conditions opératoires de la figure 2.

	CEC	HPLC
Dimensions des colonnes remplies	20 cm (35 cm total) × 0.1 mm I. D.	20 cm × 4.6 mm I. D.
Phase Stationnaire	3 µm ODS Hypersil	3 µm ODS Hypersil
Phase Mobile	CH ₃ CN-CH ₃ OH-20 mM Tris. HCl (pH 8) (37.5:37.5:25, v/v/v)	CH ₃ CN-CH ₃ OH-20 mM Tris. HCl (pH 8) (37.5:37.5:25, v/v/v) (A) et (B) 30:20:50 (C)
Débit et vitesse lineaire	5 cm/min (0.83 mm/s) à 15 kV	5 cm/min (0.83 mm/s)

De Stead, D. A.; Reid, R. G.; Taylor, R. B. *J. Chromatogr.* **1998**, *798*, 259. (reproduit avec la permission d'Elsevier).

La formation de bulles gêne la stabilité du courant

C'est vrai, l'effet Joule entraîne un échauffement de la colonne. La quantité de chaleur engendrée dépend du carré du voltage, de la conductibilité de l'électrolyte et de la porosité du remplissage. La formation de bulles se traduit par une chute de courant. L'ajout de SDS (sodium dodécyle sulfate) dans la phase mobile, les évite. Le maintien d'un ampérage faible limite l'effet Joule. Il semble que là aussi on observe une différence entre particules poreuses (peu ou pas de bulles) et particules non poreuses. On peut envisager de travailler sous pression mais on combine un profil de Poiseuille et un profil plat au détriment de l'efficacité.

La CEC se prête-t-elle à la miniaturisation ?

Oui, il n'y a pas de pièces en mouvement en CEC : pas de vanne, pas de pompe. On peut réaliser des microcolonnes par lithographie sur une puce. Une batterie de 8 capillaires remplis de particules C_{18} de 3 μm et utilisés avec des mélanges eau-solvant organique a été présentée par Zare [6]. Ramsey et al. ont publié des séparations effectuées sur des « chips » [7]. La profondeur du canal est de 5 μm ! La détection est effectuée par fluorescence induite au laser. L'emploi des « chips » implique des méthodes de détection beaucoup plus élaborées que celles utilisées couramment avec les capillaires classiques.

Le mécanisme de rétention et par suite la prédiction sont mal connus

C'est vrai car la CEC combine la mobilité électrophorétique et la distribution entre deux phases. Il faut maîtriser plusieurs paramètres et la situation est beaucoup plus compliquée qu'en HPLC.

Inversement, l'augmentation du nombre de paramètres permet de mieux jouer sur la sélectivité pour améliorer la séparation. Le problème le plus difficile à résoudre est apparemment celui de la séparation des molécules neutres. Des séparations de triglycérides ont été publiées par Sandra et al. [8] avec une phase mobile acétonitrile/isopropanol/hexane/tampon acétate d'ammonium. On peut aussi utiliser des micelles.

On reproche à l'électrophorèse capillaire les problèmes de reproductibilité liés à l'injection. Qu'en est-il ?

Le couplage de la FIA (Flow Injection Analysis) et de l'électrophorèse capillaire a permis de résoudre en partie ce pro-

blème [9]. Une partie de l'échantillon est injectée dans un flux de l'électrolyte de l'électrophorèse et dirigé vers l'interface dans lequel une extrémité du capillaire et une électrode de platine ont été insérées. L'autre extrémité du capillaire et une seconde électrode de platine sont placées dans un récipient contenant le même électrolyte.

Le voltage est appliqué entre les deux électrodes de platine et une toute petite fraction de l'échantillon est électrocinétiquement injectée quand l'échantillon passe dans l'ouverture du capillaire. En CEC, les volumes injectés peuvent être plus grands qu'en électrophorèse capillaire.

L'injection est certainement le maillon faible de la technique.

On est passé de la CG à la CLHP en gardant un peu la même philosophie. Faut-il envisager de nouvelles technologies de colonnes ?

Apparemment oui. Les utilisateurs de CEC viennent de la CLHP et de l'EC (électrophorèse capillaire) et ils ont « adapté ». Des progrès certains sont à attendre. Un appareil de CLHP « ressemble » à un appareil de CG mais il s'en démarque. On peut s'attendre à ce qu'un appareil

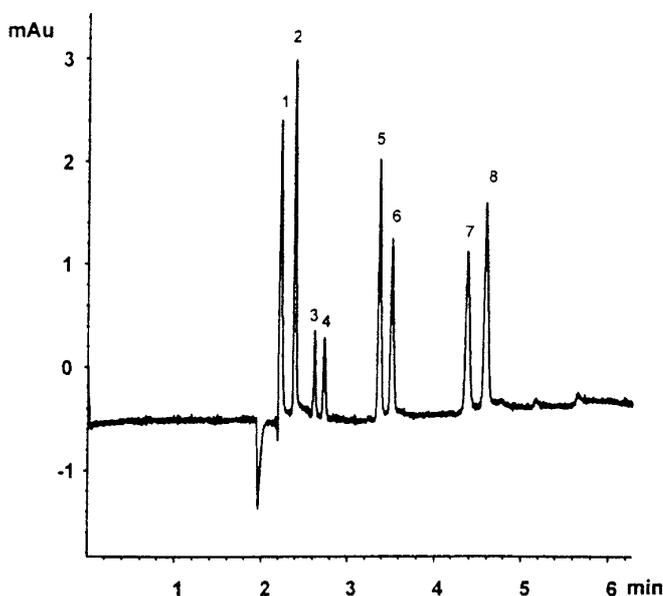


Figure 3. Chromatogramme d'un mélange de stéroïdes. Voltage appliqué 25 kV. Détection UV à 254 nm. Phase mobile : 0,8 mmol L^{-1} de tétraborate de sodium, 80 % acétonitrile, 5 mmol L^{-1} de SDS. Solutés : estriol (1), hydrocortisone (2), estradiol (3), estrone (4), testostérone (5), 17 α -méthyltestostérone (6), 4-pregnen-20 α -ol-3-one (7), progestérone (8). De Seifar, R. M.; Kraak, J. C.; Kok, W. Th., Poppe, H. *J. Chromatogr. A* 1998, 808, 71.

unique utilisable en chromatographie liquide (microbore), en électrophorèse capillaire, en électrochromatographie voit le jour.

On ne peut pas faire de gradient en CEC

Des recherches sont en cours et des résultats ont déjà été publiés. La solution la plus simple consiste à générer un gradient par un appareil de CLHP et d'envoyer le liquide dans des colonnes de CEC par un té. Une solution très élégante a été proposée par l'équipe de Zare à Stanford [10] ; il s'agit de réaliser un gradient de flux électroosmotique par variation de la différence de potentiel.

Sommes-nous dans la même situation que celle qui prévalait en 1976 aux débuts de la CLHP ?

Dans une certaine mesure, oui. Des progrès sont attendus dans le domaine de l'appareillage, de la connaissance des mécanismes de rétention, dans la fabrication des colonnes.

Un aspect positif est le savoir-faire des fabricants de détecteurs de l'électrophorèse capillaire puisque les détecteurs sont adaptables. C'est une différence essentielle avec la situation de la CLHP en 1975. A cette époque la chromatographie gazeuse disposait du FID qui ne pouvait guère être adapté à la CLHP. Il est certain que la fluorescence induite au laser n'est pas un détecteur universel mais elle est très sensible et de nombreux solutés sont détectables par cette technique.

Dans une telle confrontation, le jury est évidemment l'analyste. Auparavant, le Président demande ce que les uns et les autres ont à dire avant le verdict.

L'accusation : l'électrophorèse capillaire n'est pas entrée dans les mœurs car il y a trop de problèmes non résolus et l'électrochromatographie cumule les défauts des deux techniques.

La défense : comme on l'a dit de certaines innovations : cela ne marchera jamais ! Cela marchera car on assemblera les qualités des deux techniques et la technologie progressera.

Nous attendons le verdict des analystes !

Références

1. Dittman, M. M.; Rozing, G. P. *J. Chromatogr. A* **1996**, *744*, 63.
2. Smith, N. W.; Evans, M. B. *Chromatographia* **1995**, *41*, 197.
3. Yan, C.; Dadoo, R.; Zhao, H.; Zare, R. N.; Rakestraw, D. J. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 2026.
4. Asiaie, R.; Huang, X.; Farnan, D.; Horvath, Cs. *J. Chromatogr. A* **1998**, *806*, 251.
5. Peters, E. C.; Petro, M.; Svec, F.; Frechet, J. M. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2288.
6. Zhao, H.; Anex, D. S.; Neyer, D. W.; Rakestraw, D. J.; Zare, R. N. HPLC 98, Saint Louis MO, Poster 412.
7. Kutter, J. P.; Jacobson, S. C.; Matsubara, N.; Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3291.
8. Sandra, P.; Dermaux, A.; Ferraz, V.; Dittman, M. M.; Rozing, P. *J. Microcol. Sep.* **1997**, *9*, 409.
9. Cooper, A.; Jessop, K. M.; Moffat, F. HPLC 98, Saint Louis MO, Poster 409.
10. Dadoo, R.; Chao, Y.; Zare, R. N.; Anex, D. S.; Rakestraw, D. J.; Hux, G. A. *LC-GC* **1997**, *10*, 164.

Autres références utiles

- Knox, J. H.; Grant, I. H. *Chromatographia* **1991**, *32*, 317.
 Seifar, R. M.; Kraak, J. C.; Kok, W. Th.; Poppe, H. *J. Chromatogr. A* **1998**, *806*, 71.
 Kuban, P.; Karlberg, B. *Trends Anal. Chem.* **1998**, *17*, 34.
 Colon, L. A.; Guo, Y.; Fermier, A. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 461A.
 Rathore, A. S.; Horvath, Cs. *J. Chromatogr. A* **1997**, *781*, 185.