

par Daido Ishii  
(Faculty of Engineering, Nagoya University, Japan)

### I. Introduction

La chromatographie liquide est apparue il y a environ 70 ans pour analyser et fractionner les constituants d'un mélange. Utilisant à l'origine des colonnes de verre remplies d'une phase stationnaire (alumine ou gel de silice), la chromatographie a connu de nombreux développements :

- la chromatographie liquide sur papier
- la chromatographie liquide sur couche mince (C.C.M. ou T.L.C.\*\*)
- la chromatographie liquide sur colonne : liquide - solide ou d'adsorption ; liquide - liquide ou de partition ; d'échange d'ions ; de perméation de gel ou d'exclusion stérique (G.P.C.\*\*)
- la chromatographie en phase gazeuse (G.C.\*\*)

Très récemment enfin est apparue la Chromatographie Liquide Haute Performance (H.P.L.C.\*\*).

On demande à la H.P.L.C., comme aux autres techniques chromatographiques, d'être à la fois une méthode analytique et préparative, mais il est illusoire de vouloir réaliser des chromatographes réellement ambivalents. Le tableau 1 résume les qualités propres à chacun de ces buts.

Tableau 1

|                            | H.P.L.C. analytique                  | H.P.L.C. préparative  |
|----------------------------|--------------------------------------|---|
| Oté d'échantillon injectée | Aussi faible que possible            | Aussi grande que possible                                   |
| Sensibilité du détecteur   | Aussi sensible que possible          | Moyenne   |
| Diamètre des colonnes      | Aussi petit que possible             | Aussi grand que possible                                    |
| Longueur des colonnes      | Aussi courte que possible            | Aussi grande que possible                                   |
| Phases stationnaires       | Totalement ou partiellement poreuses | Totalement poreuses et avec une faible résistance au débit. |
| Phase mobile               | Non visqueuse                        | Volatile  |
| Débit d'éluant             | Très faible                          | Très élevé  |
| Volume d'éluant utilisé    | Faible                               | Nécessairement important                                    |

Les chromatographes en phase liquide analytiques habituellement commercialisés utilisent des colonnes de 2 à 4 mm de diamètre intérieur  $\varnothing_i$  et de 25 à 100 cm de long et les débits de phase mobile recommandés varient de 0,5 à 2 cm<sup>3</sup>/mn. Ces appareils sont couplés à un détecteur (U.V., réfractomètre, etc...) équipé de microcellule, de 8  $\mu$ l (ou microl) en général.

Les chiffres cités résultent à la fois de données empiriques et de limitations imposées par la technologie.

De récents développements, concernant les phases stationnaires utilisées pour la H.P.L.C., ont conduit à une diminution de la hauteur du plateau théorique équivalent (H.E.P.T.) qui devient souvent inférieure à 0,1 mm. On dispose donc de plusieurs milliers de plateaux théoriques sur des colonnes de moins de 25 cm de long.

La miniaturisation plus poussée des colonnes pour H.P.L.C. est cependant souhaitable pour les raisons suivantes :

- les composés donnent des pics plus étroits sur les chromato-

\* Traduction effectuée par la Société INSTRULAB, 13 rue d'Artaignan, 13014 Marseille, distributeur exclusif pour la France des chromatographes JASCO.

\*\* Sigles internationaux.

grammes, c'est-à-dire qu'ils sont plus concentrés au moment de la détection.

- la consommation de solvant est fortement réduite.
- la quantité de phase stationnaire est faible, ce qui permet d'utiliser des phases performantes mais coûteuses.
- une très faible pression de pompage est suffisante pour faire circuler la phase mobile.

## II. Réalisation de microcolonnes

Nous avons indiqué que les colonnes actuellement commercialisées pour la H.P.L.C. ont des diamètres supérieurs ou égaux à 2 mm et il est généralement admis que des colonnes de plus petits diamètres conduisent à une diminution du nombre de plateaux théoriques et du pouvoir séparateur.

Dans notre laboratoire, nous avons cependant obtenu des résultats infirmant ces constatations. Nous avons réalisé pour cela des colonnes en tube P.T.F.E. ayant  $0,25 \text{ mm} < \varnothing < 0,5 \text{ mm}$ . Après la mise au point d'une technologie spéciale, les volumes morts en tête et en sortie de colonne ont été réduits au maximum.

Afin de déterminer la quantité d'échantillon que l'on peut injecter sur une colonne ainsi que le volume optimal des cellules, il est nécessaire d'appréhender le volume de phase mobile au-delà duquel un produit déjà séparé va diffuser avant la détection.

### II. 1. Diffusion d'un composé dans une colonne de chromatographie

La chromatographie sépare un mélange en ses constituants en jouant sur les différences de comportement de ceux-ci par rapport à la phase stationnaire et à la phase mobile. Les interactions qui ont lieu résultent de phénomènes d'adsorption  $\rightleftharpoons$  désorption, de partition, d'échange d'ions ou d'exclusion stérique. Pendant le processus de séparation, chaque composé est dilué dans la phase mobile. Du fait de cette dilution, la concentration de chaque composé, au moment de sa détection est généralement inférieure à sa concentration dans le produit de départ. Le degré de dilution peut être mesuré par le volume de phase mobile qui a circulé dans le détecteur pendant que le composé était détecté, autrement dit par la largeur du pic d'un chromatogramme.

L'élargissement  $[V_w(c)]$  du pic dû à la colonne est donné par l'équation (3) :

$$N = 16 \left( \frac{V_R}{V_w(c)} \right)^2 \dots\dots\dots (1)$$

$$V_w(c) = \frac{4 V_R}{\sqrt{N}} \dots\dots\dots (2)$$

$$V_w(c) = \frac{4 V_0 (1+k')}{\sqrt{N}} \dots\dots\dots (3)$$

- N = nombre de plateaux théoriques
- $V_R$  = volume de rétention du composé élué
- $V_0$  = volume de phase mobile dans la colonne (volume interstitiel)
- $k'$  = facteur de capacité

Nous voyons (équation 3) que la diffusion est proportionnelle à  $V_0$ . Or pour un taux de remplissage constant,  $V_0$  est proportionnel à la longueur de la colonne et au carré de son diamètre.

La miniaturisation des colonnes (faibles longueur et diamètre) conduit donc nécessairement à la réduction de  $V_0$  et est un moyen efficace de diminuer l'élargissement des pics.

Le tableau 2 donne les valeurs d'élargissement de pics, calculées

**Tableau 2. Élargissement des pics  $[V_w(c)]$  dû à la colonne pour une colonne  $\varnothing_i = 2 \text{ mm}$  et  $L = 50 \text{ cm}$  (colonne «2»)**

| N      | HETP (mm) | $V_w(c)$ ( $\mu\text{l}$ ) |        |        |         |         |
|--------|-----------|----------------------------|--------|--------|---------|---------|
|        |           | $k'=0$                     | $k'=1$ | $k'=5$ | $k'=10$ | $k'=20$ |
| 10 000 | 0.05      | 25.1                       | 50.2   | 151    | 276     | 528     |
| 5 000  | 0.10      | 35.5                       | 71.1   | 213    | 391     | 746     |
| 1 000  | 0.50      | 79.5                       | 159    | 477    | 874     | 1670    |
| 500    | 1         | 112                        | 224    | 672    | 1238    | 2355    |

● la miniaturisation des colonnes aboutit à la simplification des instruments.

Dans cet article, nous résumerons les recherches que notre groupe a menées pour la réalisation pratique d'un chromatographe liquide à microcolonne et nous donnerons des exemples concrets de séparations effectuées en micro-H.P.L.C.

d'après l'équation 3, pour une colonne H.P.L.C. conventionnelle ( $2 \text{ mm } \varnothing_i \times 50 \text{ cm}$ ) ayant un taux de remplissage de 60 %, c'est-à-dire que  $V_0$  est égal à 40 % du volume total de la colonne.

Les valeurs du tableau 2 montrent que les colonnes commercialisées avec une H.E.P.T. d'environ 0,1 mm, conduisent en général à un élargissement de pics de 50 à 750  $\mu\text{l}$ .

Ces valeurs doivent être prises en considération lorsqu'on réalise un appareil, notamment pour le volume des cellules du détecteur, les volumes morts au niveau des joints, la quantité d'échantillon qui peut être injectée.

Considérons maintenant les changements résultant de la miniaturisation des colonnes.

Les résultats (calculés à partir de l'équation 3) obtenus avec une colonne de  $0,5 \text{ mm } \varnothing_i \times 20 \text{ cm}$  sont résumés dans le tableau 3.

**Tableau 3. Élargissement des pics  $[V_w(c)]$  dû à la colonne pour une microcolonne  $\varnothing = 0,5 \text{ mm}$  ;  $L = 20 \text{ cm}$  (colonne «3»)**

| N      | HETP (mm) | $V_w(c)$ ( $\mu\text{l}$ ) |        |        |         |         |
|--------|-----------|----------------------------|--------|--------|---------|---------|
|        |           | $k'=0$                     | $k'=1$ | $k'=5$ | $k'=10$ | $k'=20$ |
| 10 000 | 0.02      | 0.63                       | 1.26   | 3.77   | 6.91    | 13.2    |
| 5 000  | 0.04      | 0.89                       | 1.78   | 5.33   | 9.77    | 18.6    |
| 4 000  | 0.05      | 0.99                       | 1.99   | 5.96   | 10.9    | 20.9    |
| 2 000  | 0.10      | 1.40                       | 2.81   | 8.42   | 15.4    | 29.5    |
| 1 000  | 0.20      | 1.99                       | 3.97   | 11.9   | 21.8    | 41.7    |
| 500    | 0.40      | 2.81                       | 5.62   | 16.9   | 30.9    | 59.0    |
| 400    | 0.50      | 3.14                       | 6.28   | 18.8   | 34.5    | 65.9    |

La colonne utilisée (colonne «3») ayant un diamètre qui est le 1/4 de celui de la colonne «2» et une longueur qui en est les 2/5, son volume  $V_0$  est 40 fois plus petit que celui de la colonne «2».

Comme on le voit en comparant les tableaux 2 et 3, pour des valeurs identiques de N et  $k'$ , l'élargissement de bande pour la microcolonne (colonne «3») est réduit environ d'un facteur 40 par rapport à la colonne «2» conventionnelle.

Si l'on exprime cet élargissement de bande en volume de phase mobile, on obtient un volume compris entre 2 et 20  $\mu\text{l}$  pour une microcolonne ( $0,5 \text{ mm } \varnothing_i \times 20 \text{ cm}$ ) remplie d'une phase stationnaire donnant une H.E.P.T. de 0,05 mm.

La très faible contribution de la microcolonne à l'élargissement des pics conduit donc nécessairement à repenser totalement les périphériques (injecteur, cellule de détection, tubes de connexion) puisque ceux réalisés pour la H.P.L.C. traditionnelle ont des volumes morts  $> 2 \mu\text{l}$ .

### II. 2. Diffusion des composants d'un mélange dans des tubes fins

De nombreux composés diffusent au cours de l'élution non seulement dans la colonne, mais aussi dans les tubes reliant l'injecteur à la colonne ou celle-ci au détecteur. Même si la phase stationnaire est performante et la H.E.P.T. petite on obtient donc souvent des pics larges sur un chromatogramme.

Lorsqu'on réalise un chromatographe liquide, il est donc indispensable de connaître l'importance de cette diffusion des composants. Une étude théorique et expérimentale a donné l'équation suivante pour cette diffusion :

$$V_w(d) = \sqrt{\frac{0.212S V_t Q}{D}} \dots\dots\dots (4)$$

[ Vw(d) ] = volume de phase mobile dans lequel se produit la diffusion.  
 S = section du tube  
 Q = débit de phase mobile  
 D = coefficient moléculaire de diffusion de l'échantillon dans la phase mobile.

L'équation 4 exprime, en volume de phase mobile, l'élargissement du pic d'une substance mesuré à la sortie d'un tube fin, lorsqu'un microvolume (négligeable devant l'élargissement présumé du pic) de ce soluté est injecté à l'entrée du tube et que le débit Q de la phase mobile est constant à l'intérieur du tube.

Une des différences fondamentales entre la chromatographie liquide et la chromatographie gazeuse réside dans la grandeur du coefficient de diffusion moléculaire D (équation 4). Pour les liquides, ce terme est 10 000 fois plus faible que pour les gaz. Il est donc extrêmement important d'étudier l'effet d'élargissement des pics dans les diverses connexions d'un chromatographe. Des calculs, établis à partir de l'équation (4), ont donné les résultats résumés dans le tableau 4.

**Tableau 4. Élargissement des pics [Vw(d)] dû aux diverses connexions (cas d'un coefficient D = 2.10<sup>-5</sup> cm<sup>2</sup>/sec)**

| Inner diameter (mm) | Length (cm) | Volume (μl) | Peak spread Vw(d) (μl) |             |
|---------------------|-------------|-------------|------------------------|-------------|
|                     |             |             | Q=1 ml/min             | Q=10 μl/min |
| 1                   | 20          | 157         | 467                    | 46.7        |
| 1                   | 10          | 78.5        | 330                    | 33.0        |
| 1                   | 5           | 39.3        | 234                    | 23.4        |
| 0.5                 | 20          | 39.3        | 117                    | 11.7        |
| 0.5                 | 10          | 19.6        | 82.5                   | 8.3         |
| 0.5                 | 5           | 9.8         | 58.5                   | 5.9         |
| 0.5                 | 1           | 2.0         | 26.0                   | 2.6         |
| 0.25                | 20          | 9.8         | 29.3                   | 2.9         |
| 0.25                | 10          | 4.9         | 20.6                   | 2.1         |
| 0.25                | 5           | 2.5         | 14.7                   | 1.5         |
| 0.25                | 1           | 0.5         | 6.5                    | 0.65        |

Dans les conditions opératoires habituelles de la chromatographie liquide, les solutés ont des coefficients de diffusion moléculaire compris entre 1.10<sup>-5</sup> et 4.10<sup>-5</sup> cm<sup>2</sup>/sec. quels que soient les liquides, sauf les polymères ou les liquides de très haute viscosité.

Si nous prenons le cas d'un coefficient D = 2.10<sup>-5</sup> cm<sup>2</sup>/sec., le tableau 4 peut être considéré comme donnant les élargissements standards. On voit également, d'après l'équation 4 que l'effet d'élargissement est dû essentiellement au diamètre du tube. L'élargissement est proportionnel à  $\sqrt{SVt}$  c'est-à-dire à  $S\sqrt{L}$ .

Il est aussi proportionnel à (Q)<sup>1/2</sup> et inversement proportionnel à (D)<sup>1/2</sup>. Considérons maintenant l'importance relative de l'élargissement des pics [Vw(d)] dû aux connexions par rapport à l'élargissement dû au processus chromatographique à l'intérieur de la colonne [Vw(c)].

L'élargissement d'un pic correspond à 4σ et lorsque les 2 composantes de l'élargissement sont significatives, l'élargissement résultant est donné par l'équation 5 qui est la somme des déviations standards et non la somme de chaque élargissement :

$$\sigma = \sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2 + \dots} \quad (5)$$

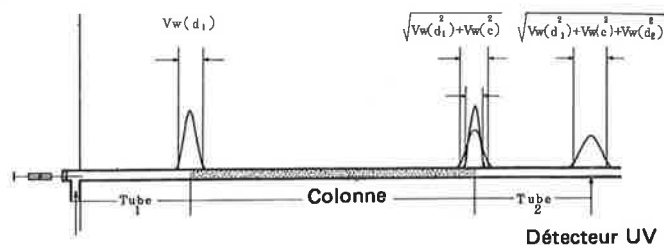
soit

$$V_w = \sqrt{V_w(c)^2 + V_w(d)^2} \quad (6)$$

La signification physique de ce phénomène est illustrée par la figure 1.

L'équation 7 donne le rapport de l'élargissement du pic Vw mesuré sur le chromatogramme, sur l'élargissement du pic [Vw(c)] dans la colonne elle-même.

$$\frac{V_w}{V_w(c)} = \sqrt{1 + \left(\frac{V_w(d)}{V_w(c)}\right)^2} \quad (7)$$



Injection

Figure 1.

On voit donc apparaître une relation importante pour l'élaboration d'un instrument et l'on peut considérer que lorsque l'élargissement « extérieur » est inférieur à 20 % de celui dû au processus chromatographique dans la colonne, l'élargissement résultant sur le chromatogramme est inférieur à 2 %.

La plupart des appareils actuellement commercialisés sont fournis avec des tubes de connexion de 0,25 mm de Ø et de 20 à 40 cm de long, permettant de relier directement la colonne au détecteur ; le débit est en moyenne de quelques ml/mn.

L'élargissement Vw(d) est alors de plusieurs dizaines de μl et la valeur Vw(c) est de quelques centaines de μl (cf. tableau 2 et relation 7).

De telles valeurs sont incompatibles avec l'utilisation d'un micro H.P.L.C.

Si l'on se réfère au tableau 3, il est nécessaire de réduire l'élargissement à moins de 0,5 μl, de façon à pouvoir véritablement utiliser des colonnes de 0,5 mm Ø et de longueur 20 cm présentant une H.E.P.T. de 0,05 mm.

Pour réaliser cette contrainte, il faut donc réduire considérablement les volumes morts à la fois en tête et en sortie de colonne. Par exemple, pour un tube de connexion de 0,5 mm de diamètre, il faut que sa longueur soit inférieure à 1 mm, ce qui nécessite la réalisation d'un système spécial que l'on peut désigner par le terme tube-colonne.

On doit également être attentif au fait que, lorsqu'on accroît les performances d'une phase stationnaire, on accroît de même l'importance relative de la composante extérieure à l'élargissement des pics.

**Tableau 5. Importance de l'élargissement des pics dans les tubes de connexion.**

| $\frac{V_w(d)}{V_w(c)}$ | $\frac{V_w}{V_w(c)}$ |
|-------------------------|----------------------|
| 0                       | 1.000                |
| 0.1                     | 1.005                |
| 0.2                     | 1.020                |
| 0.3                     | 1.044                |
| 0.4                     | 1.077                |
| 0.5                     | 1.118                |
| 1.0                     | 1.414                |
| 1.5                     | 1.803                |

### II. 3. Quantité d'échantillons injectée et volume de la cellule de mesure

Dans les chromatographes liquides actuellement commercialisés, le volume de solution d'échantillon que l'on peut injecter, varie pour les colonnes analytiques de 2 à 20 μl selon le volume de la colonne, la surface spécifique de la phase stationnaire, etc...

La miniaturisation des colonnes entraîne une réduction proportionnelle de la quantité d'échantillon injectée. Par exemple, une micro-colonne de 0,5 mm x 20 cm peut recevoir un échantillon de 0,05 à 0,5 μl.

La concentration optimale du soluté, bien que dépendant de la sensibilité du détecteur, se situe entre 0,01 et 1 %.

Il est important d'établir une méthode spéciale d'injection dans des microcolonnes pour éviter la diffusion au niveau de l'injecteur.

La plupart des cellules désormais utilisées en U.V., réfractométrie ou fluorescence, ont un volume d'environ 8 μl. Comme nous l'avons vu

précédemment, un tel volume est compatible avec un élargissement de pic classique de quelques centaines de  $\mu\text{l}$ , bien qu'il contribue à cet élargissement.

Dans un chromatographe H.P.L.C. classique, cette contribution du détecteur à l'élargissement des pics peut être négligée. Il n'en est plus de même, comme nous l'avons déjà vu, en micro H.P.L.C.

### III. Réalisation d'un chromatographe liquide à microcolonne

La réalisation d'un chromatographe liquide utilisant des microcolonnes comme celles décrites précédemment, nécessite la prise en compte des données techniques ci-dessous :

- mise au point d'une technique de remplissage des colonnes et sélection des phases stationnaires adéquates.
- injecteur adapté à des microquantités.
- réalisation du pompage spécial permettant de très faibles débits.
- adaptation du détecteur et réalisation de microcellules à circulation.
- adaptation d'une méthode de gradient d'élution.

#### III. 1. Remplissage d'une microcolonne avec une phase stationnaire

Nous avons choisi d'utiliser des colonnes en tube téflon ( $\text{Ø}_i = 0,5 \text{ mm}$ ,  $\text{Ø}_e = 1 \text{ mm}$ ). Notre choix a été guidé par le fait que ce matériau est très largement commercialisé, chimiquement stable et facile à travailler. Un tel tube a une section qui est le  $1/15^{\text{e}}$  de celle d'un tube de  $2 \text{ mm}$  de  $\text{Ø}_i$  très couramment utilisé sur les chromatographes liquides H.P.L.C. classiques.

Nos essais ont porté essentiellement sur des colonnes variant entre  $5$  et  $30 \text{ cm}$  de long.

Le remplissage se fait par voie humide. Un tube, dont la longueur est égale à plusieurs fois celle de la colonne désirée, est tout d'abord préparé et la phase stationnaire est mise en suspension dans un solvant. Une seringue de  $250 \mu\text{l}$  est reliée au tube que l'on remplit avec le même solvant que celui utilisé pour la suspension, en prenant garde de ne pas introduire de bulles d'air. Puis l'extrémité inférieure du tube est plongée dans la suspension, la seringue est reliée à un moteur pas à pas et la suspension est aspirée vers la partie supérieure du tube lorsqu'on actionne ce moteur soit manuellement, soit électriquement. L'extrémité inférieure du tube est ensuite bouchée avec un peu de laine de quartz; on repousse légèrement le solvant en continu dans la colonne. On obtient ainsi des colonnes remplies, de façon homogène et compacte, de phase stationnaire avec un taux d'environ  $60\%$ .

On peut d'ailleurs observer les différentes étapes de cette opération à travers le tube de P.T.F.E. qui est translucide. La colonne est ensuite coupée à la longueur désirée et bouchée à sa partie supérieure avec un peu de laine de quartz. On laisse cependant un vide de  $1$  à  $2 \text{ cm}$  en haut de colonne de façon à connecter celle-ci au tube d'arrivée de la phase mobile.

La même méthode peut être utilisée pour remplir des tubes de  $0,25 \text{ mm}$  de diamètre.

Il est couramment admis que lorsque l'on diminue le diamètre d'une colonne en dessous de  $2 \text{ mm}$ , la H.E.P.T. s'accroît et ce phénomène a été décrit comme étant dû à un effet de bord. Cependant, on observe dans notre cas une diminution spectaculaire de ce même effet de bord. Ceci est peut-être dû à ce que le P.T.F.E. a une surface plus douce que les tubes d'acier inoxydable et qu'ainsi, la phase stationnaire sous pression couvre mieux la totalité de la surface de la colonne.

#### III. 2. Système de pompage de la phase mobile à des débits très faibles. Injection de microquantité d'échantillons

La miniaturisation des colonnes nécessite la diminution des débits de phase mobile. On estime que pour une même phase stationnaire, si l'on garde la vitesse linéaire de l'éluant en proportion avec la longueur de la colonne, les temps de rétention restent constants quelle que soit la colonne. Avec une colonne de  $0,5 \text{ mm } \text{Ø}_i \times 20 \text{ cm}$ , nous avons trouvé que des débits de  $10 \mu\text{l}/\text{mn}$  étaient satisfaisants.

Si l'on réalise une chromatographie en  $20 \text{ mn}$  avec un tel débit, la consommation de solvant ne sera donc que de  $200 \mu\text{l}$ . Un si faible volume peut donc être simplement contenu dans une petite seringue.

En micro H.P.L.C. comme en H.P.L.C., il est toujours souhaitable de réaliser des cellules à circulation d'un volume inférieur au  $1/10^{\text{e}}$  de la valeur de l'élargissement de pic  $[V_w(c)]$ .

En conséquence, les microcolonnes ( $0,5 \text{ mm } \text{Ø}_i \times 20 \text{ cm}$ ) nécessitent l'emploi de cellules dont le volume mort soit  $< 1 \mu\text{l}$  et soit de préférence égal à  $0,1 \mu\text{l}$ .

Le diamètre du piston d'une telle seringue étant très petit, une moindre force est nécessaire pour l'actionner et la précision en débit est donc accrue. Nos expériences nous ont montré qu'une seringue de  $50$  à  $250 \mu\text{l}$  pouvait être utilisée comme réservoir de solvant. Le piston est poussé à une vitesse constante par un moteur synchrone pouvant fonctionner à plusieurs vitesses. Ce même système peut être utilisé pour remplir les colonnes avec la phase stationnaire (cf. § III. 1.).

La section du piston d'une seringue de  $200 \mu\text{l}$  est d'environ  $4 \text{ mm}^2$ , aussi une poussée de  $4 \text{ kg}$  fournit une pression de  $100 \text{ bars}$ .

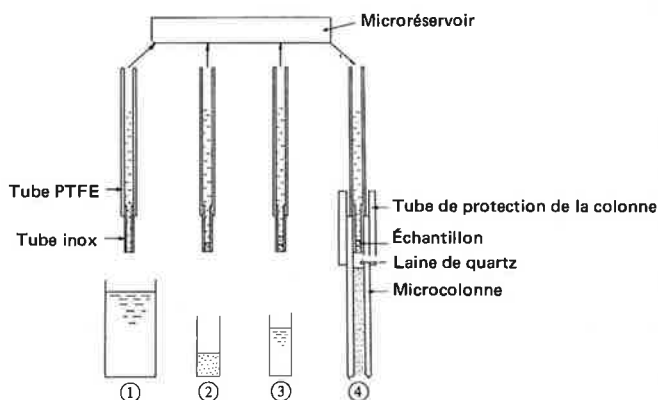
On voit donc que la puissance nécessaire pour actionner la « pompe » de notre micro-H.P.L.C. est incomparablement plus faible que celle requise pour les pompes en H.P.L.C. classique.

Comme nous l'avons indiqué précédemment (§ II. 3.), le volume d'échantillon que l'on injecte est compris entre  $0,05$  et  $0,5 \mu\text{l}$ . L'application pratique de la H.P.L.C. à microcolonne dépend donc seulement de la possibilité d'injecter ce très petit volume exactement en tête de colonne sans perturber les débits de phase mobile.

Après plusieurs essais infructueux en utilisant des microseringues classiques, nous avons adopté une méthode d'injection particulière (Figure 2). L'éluant est tout d'abord aspiré dans un tube d'acier inoxydable ( $0,3 \text{ mm } \text{Ø}_i$ ) en actionnant manuellement le système de pompage précédemment décrit (étape 1, figure 2). L'extrémité inférieure de ce tube est alors plongée dans la solution à chromatographier et la pompe est actionnée lentement de façon à aspirer une microquantité de solution. Cette opération est facilitée par le fait que la commande de la pompe est équipée d'un micromètre (étape 2, figure 2).

L'extrémité du tube inox est immédiatement replongée dans l'éluant pour rincer l'extérieur du tube et pour aspirer à nouveau une microquantité de solvant (étape 3, figure 2). On connecte alors le tube à la microcolonne et le système de pompage, placé en position automatique, est mis en marche (étape 4, figure 2).

L'injection ainsi réalisée est du type « sandwich », mais on peut relier le tube inox à la microcolonne dès la fin de l'étape 2 (Figure 2).



- (1) Aspiration du liquide vecteur
- (2) Échantillonnage
- (3) Aspiration de liquide vecteur
- (4) Injection

Figure 2. Processus d'injection sur une microcolonne

#### III. 3. Réalisation d'une microcellule de détection pour micro H.L.P.C.

Nous avons essentiellement utilisé comme détecteur un colorimètre ou un spectrophotomètre U.V.

Comme nous l'avons indiqué, il est indispensable de réduire considérablement les volumes morts au niveau des microcellules utilisées dans les détecteurs. Dans un premier temps, nous avons réalisé une

telle cellule en forme de Z avec 2 lames de quartz espacées par deux tubes téflon, mais cette solution ne s'est pas avérée satisfaisante. Nous utilisons désormais un tube de quartz de 0,3 à 1 mm Ø i qui est connecté directement à la microcolonne (Figure 3). Le volume mort au niveau du joint est donc réduit au minimum. Cette méthode

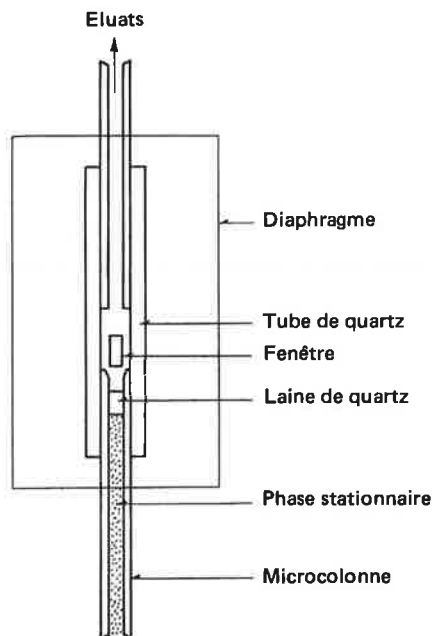


Figure 3. Coupe d'une microcellule

#### IV. Quelques résultats obtenus par micro H.L.P.C.

##### IV. 1. Séparation d'hydrocarbures aromatiques

Des spectres présentant un bon rapport signal/bruit sont obtenus à des longueurs d'onde > 200 nm. Pour obtenir les résultats de la figure 4 nous avons dû remplacer la lampe et le photomultiplicateur du détecteur afin de rendre celui-ci compatible avec notre microcellule.

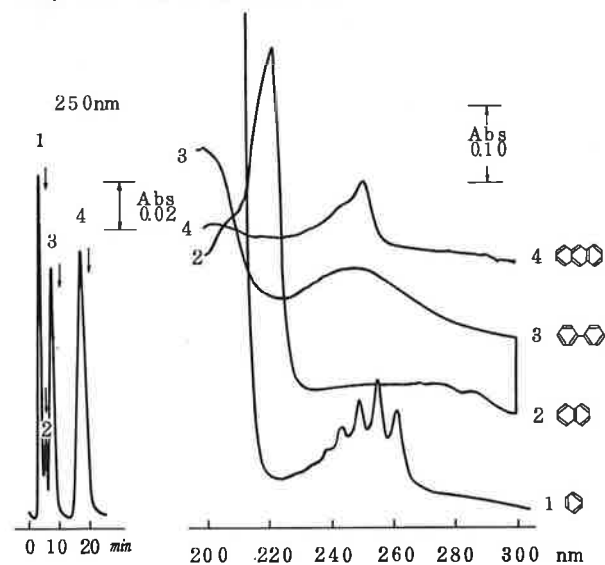


Figure 4. Séparation d'hydrocarbures aromatiques (A) et spectres UV des produits séparés (B).

##### Conditions opératoires

Echantillon : Solution méthanolique contenant 2 % de benzène - 0,02 % de naphthalène - 0,02 % de diphenyle - 0,004 % d'anthracène.  
Quantité injectée : 0,05 µl  
Colonne : Permaphase ODS, Ø i 0,5 mm - L = 15 cm  
Eluant : MeOH-H<sub>2</sub>O (60/40) 8 µl/min  
Température : 15°C

permet de réaliser facilement des cellules de détection de tailles diverses en faisant varier simplement le diamètre du tube de quartz. Cependant, l'utilisation de microcellules conduit parfois à une diminution de l'intensité lumineuse traversant la cellule et donc à une diminution très importante de la sensibilité de détection. Il faut alors modifier les appareils (changement de source, de photomultiplicateur etc...) si l'on veut obtenir des résultats valables. Mais ces modifications sont rarement faciles à réaliser. C'est pourquoi nous avons utilisé un nouveau spectrophotomètre U.V. (JASCO UVIDEK 100) qui a été spécialement mis au point pour une utilisation couplée avec des microcolonnes. Les microcellules que nous avons mises au point sont également adaptées à la détection réfractométrique et fluorimétrique.

#### II. 4. Gradient d'éluion

En H.P.L.C. analytique, le gradient d'éluion est un outil extrêmement important, notamment dans l'analyse des mélanges complexes ou des substances isomères.

Il nous a paru nécessaire que nos microcolonnes puissent être couplées avec un système de gradient, ce qui posait des problèmes techniques puisque nous n'utilisons que quelques centaines de µl d'éluant pour une analyse au lieu de quelques dizaines ou centaines de ml.

Le gradient, préparé avec un appareil classique (Programmeur de gradient JASCO) est envoyé dans un tube de 0,5 mm Ø i et de 1 m de long. La quantité de solvant ainsi emmagasinée est suffisante pour une analyse de plusieurs dizaines de minutes.

Le faible diamètre du tube contenant le gradient de solvant permet de maintenir celui-ci inchangé dans les temps très courts d'une analyse en micro H.P.L.C.

Détecteur : Spectrophotomètre SHIMADZU UV-200 (modifié)

Cellule : microcellule 1 µl

En arrêtant le débit d'éluant au moment opportun, nous avons pu tracer les spectres UV des divers produits séparés (Figure 4).

On voit donc qu'un mélange renfermant 1 µg de benzène, 10 ng de naphthalène, 10 ng de diphenyle et 2 ng d'anthracène peut être fractionné et chaque composé analysé.

La figure 5 montre les résultats obtenus sur un mélange similaire à celui utilisé figure 4, mais en chromatographiant le mélange sur une colonne de plus faible diamètre.

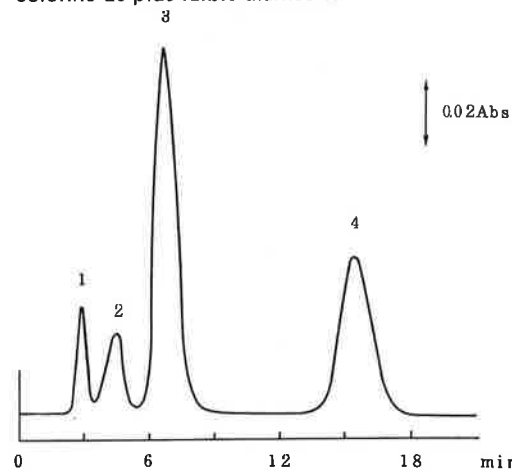


Figure 5. Séparation d'hydrocarbures aromatiques sur une microcolonne de Ø i = 0,25 mm.

##### Conditions opératoires

Echantillon : solution méthanolique à 0,5 % de benzène - 0,02 % de naphthalène - 0,02 % de diphenyle - 0,04 % d'anthracène  
Quantité injectée : 0,06 µl  
Colonne : Permaphase, Ø i = 0,25 mm - L = 20 cm  
Eluant : Méthanol-Eau (50/60) 8 µl/min  
Température : Ambiante  
Détecteur : Spectrophotomètre JASCO UVIDEK-1 λ = 250 nm  
Cellule : microcellule 0,6 µl

Ces séparations obtenues en phase inverse sur Permaphase ODS présentent des variations de reproductibilité lorsque de petits changements interviennent dans la composition de la phase mobile.

La technique de gradient décrite au paragraphe III. 4. a également été appliquée à cette séparation (Figure 6) :

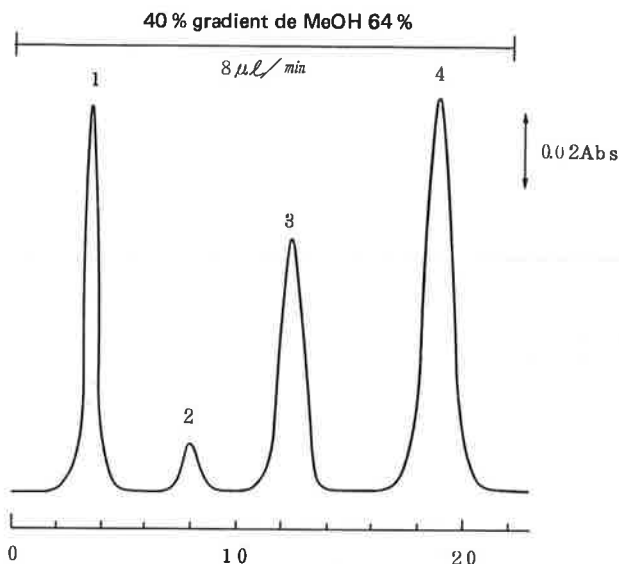


Figure 6. Gradient d'éluion sur une microcolonne

#### Conditions opératoires

Echantillon : identique en composition à celui utilisé figure 4.  
Quantité injectée : 0,05 µl  
Colonne : Permaphase ODS, Ø 0,5 mm - L = 15 cm  
Eluant : Méthanol/Eau. Composition initiale 40/60 - composition finale 64/36 après 21 mn  
DéTECTEUR : SHIMADZU UV-200 (modifié)  
Cellule : microcellule 1 µl

Ces résultats montrent que nos microcolonnes ( $0,25 \text{ mm} \leq \varnothing \leq 0,5 \text{ mm}$  et  $15 \text{ cm} \leq L \leq 20 \text{ cm}$ ) ont pratiquement la même résolution que les colonnes classiques ( $\varnothing \text{ i } 2,1 \text{ mm}$ ,  $L \text{ i } 1 \text{ m}$ ). Cependant avec les phases pelliculaires comme la Permaphase ODS, on ne peut injecter des quantités d'échantillon aussi importantes et nous avons dû limiter les volumes injectés à moins de 0,1 µl.

Au contraire, avec des supports très poreux et fins (par exemple Zorbax), on garde à la fois la même résolution et la même capacité d'injection (Figure 7a) :

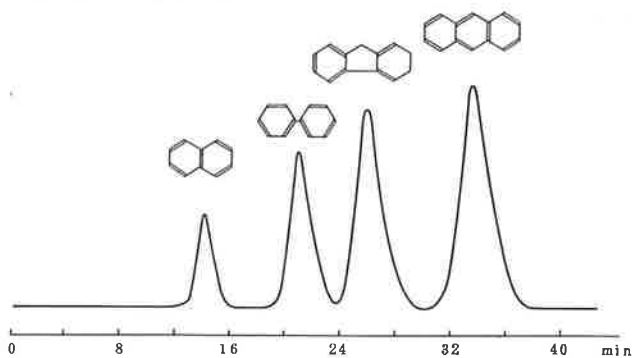


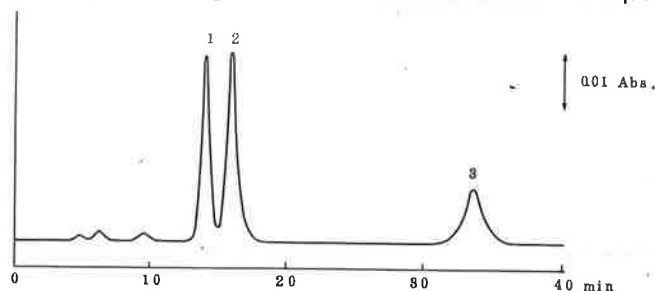
Figure 7a. Séparation d'hydrocarbures aromatiques sur phase poreuse

#### Conditions opératoires

Echantillon : solution méthanolique à 0,033 % de naphtalène, 0,017 % de diphenyle, 0,033 % de fluorène et 0,0033 % d'anthracène  
Quantité injectée : 0,25 µl  
Colonne : Zorbax ODS, Ø 0,5 mm - L = 12 cm  
Eluant : Méthanol/Eau (60/40) 8,3 µl/mn  
Température : 50,5° C  
DéTECTEUR et cellule : identiques à ceux de la figure 6.

## IV. 2. Séparation de stéroïdes

L'utilisation d'un chromatographe à microcolonne trouve ici un terrain privilégié puisque les produits à analyser sont souvent obtenus en très faibles quantités. La figure 7 b montre les résultats obtenus d'un mélange standard de corticostéroïdes adrénaux.



1 Corticostérone, 2 Cortisone, 3 Cortisol

Figure 7 b. Séparation de stéroïdes

#### Conditions opératoires :

Echantillon : solution de dichlorométhane à 0,2 % de corticostérone 0,6 % de cortisone à 0,2 % de cortisol.  
Quantité injectée : 0,06 µl  
Colonne : Zorbax SIL, Ø 0,5 mm - L = 17,3 cm  
Eluant : Dichlorométhane/MeOH (98/2) 8,3 µl/mn  
Température : Ambiante  
DéTECTEUR : SHIMADZU UV-200  $\lambda = 254 \text{ nm}$   
Cellule : microcellule 0,1 µl

## IV. 3. Séparation de chélates

La micro HPLC apporte une solution efficace et rapide à l'analyse simultanée d'éléments métalliques chélatés.

La séparation type que nous présentons est celle de chélates de l'acide diéthylthiocarbamique (Figure 8) :

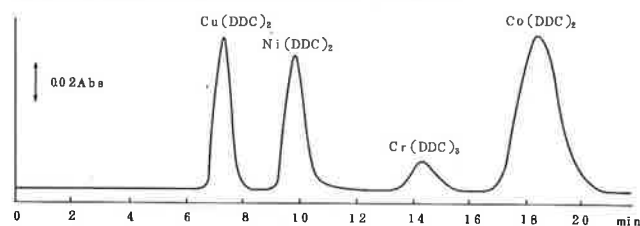


Figure 8. Chromatographie de chélates métalliques de DDC

#### Conditions opératoires

Echantillon : solution toluénique de chélates du DDC avec Cu, Ni, Cr et Co respectivement à 3, 1, 3 et 1 mg/ml  
Quantité injectée : 0,4 µl  
Colonne : Porasil type T, Ø 0,5 mm; L = 21,5 cm  
Eluant : Toluène 8 µl/mn  
Température : Ambiante  
DéTECTEUR : Spectrophotomètre Hirma 6C  
Cellule : 1,4 µl

Avec les nouvelles phases stationnaires actuellement commercialisées on obtient des H.E.P.T. inférieures à 0,1 mm et l'ordre d'éluion observé pour les chélates métalliques du DDC est le suivant : Se (IV), Cu (II), Hg (II), Te (IV), Ni (II), Pb (II), Tl (III), Cr (III), Mn (II), Co (II), Bi (III) ~ Fe (III) ~ V(IV).

## IV. 4. Application des microcolonnes à la perméation du gel

La plupart des colonnes utilisées en GPC ont des diamètres d'environ 8 mm et des longueurs supérieures à 30 cm. Leur volume intérieur est donc relativement important et, les phases employées étant d'un prix élevé, leur utilisation est onéreuse.

La nécessité de travailler avec des colonnes de diamètre important résulte de l'emploi de détecteurs ayant des cellules de quelques dizaines de µl de volume. Avec une microcolonne il faut donc des tubes de connexion et une cellule de détection particulièrement étudiés pour que leur contribution à l'élargissement des pics soit négligeable ou faible.

Avec nos microcolonnes, nous sommes arrivés à obtenir des résultats tout à fait comparables à ceux donnés par une colonne classique de GPC. La figure 9 illustre une séparation d'esters phtaliques :

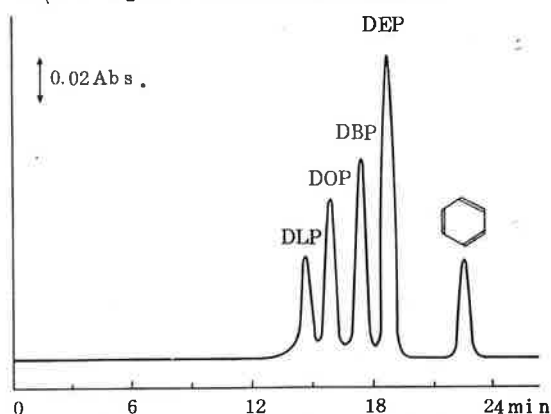


Figure 9. Séparation d'esters phtaliques sur microcolonne ( $\Phi = 0,5$  mm)

**Conditions opératoires :**

Echantillon : solution de THF à 0,81 % de DLP, 0,84 % de DOP, 0,78 % de DBP, 1,01 % de DEP et 1,29 % de benzène  
 Quantité injectée : 0,01  $\mu$ l  
 Colonne : Gel Shodex A-801  $\Phi = 0,5$  mm - L = 25 cm  
 Eluant : THF 1,6  $\mu$ l/mn  
 Température : Ambiante  
 Détecteur : JASCO UVIDEDEC-1  $\lambda = 254$  nm  
 Cellule : microcellule 0,07  $\mu$ l

La microcolonne utilisée pour cette séparation a montré le même pouvoir séparateur qu'une colonne classique et ce malgré un volume environ 500 fois plus faible. Le nombre de plateaux théoriques est voisin de 7 000 (HEPT  $\approx 0,036$  mm). Avec de faibles valeurs de  $k'$  on a donc (cf. tableau 3) un élargissement de pic sur la colonne de l'ordre de 1  $\mu$ l. La seule difficulté est donc la réalisation d'une microcellule dont la contribution à l'élargissement des pics soit négligeable ou faible.

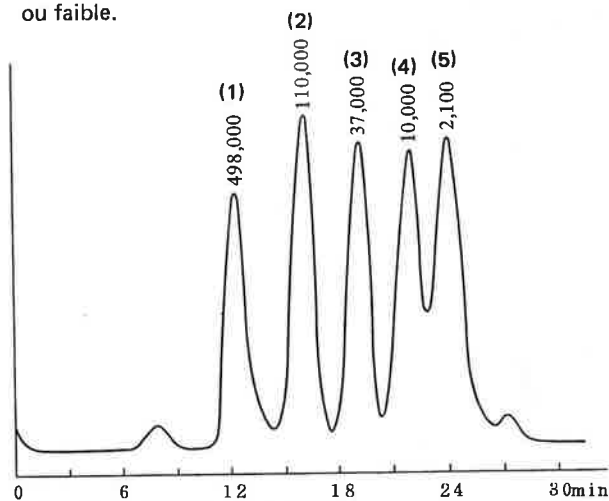


Figure 10. GPC de polystyrènes

**V. Conclusion et bibliographie**

Les quelques exemples que nous venons de décrire montrent clairement que la diminution du diamètre des colonnes n'altère en rien les performances de la chromatographie liquide ; il est seulement indispensable de disposer d'un appareillage spécialement conçu à cet effet dans lequel les volumes morts sont réduits au maximum.

Les avantages de la micro-H.P.L.C. sont essentiellement la moindre consommation de solvants et la faible quantité d'échantillon nécessaire pour mener une analyse.

La micro-H.P.L.C., d'un emploi aussi facile que la chromatographie en couches minces, est donc un outil analytique permettant à la

La figure 10 montre les résultats obtenus dans une chromatographie de divers polystyrènes.

**Conditions opératoires**

Echantillon : solution de THF à 0,91 % de (1), 0,91 % de (2), 0,83 % de (3), 1,00 % de (4) et 1,12 % de (5)  
 Quantité injectée : 0,03  $\mu$ l  
 Colonne : Gel Shodex A-804  $\Phi = 0,5$  mm L = 34 cm  
 Eluant : THF 2  $\mu$ l/mn  
 Température : Ambiante  
 Détecteur : JASCO UVIDEDEC-1  
 Cellule : microcellule de 0,07  $\mu$ l

**IV. 5. Séparation rapide de composés radioactifs par chromatographie d'échange d'ions.**

Les résines échangeuses d'ions, mises au point pour la HPLC, ont donné de très bons résultats notamment dans l'analyse des acides aminés, des acides organiques et des ions minéraux.

Lorsque l'on veut analyser des produits d'irradiation il est très important de séparer rapidement les composés radioactifs, qui ont en général des temps de demi-vie très courts.

De tels produits se forment par exemple avec les halogènes  $^{38}\text{Cl}$  (37,3 mn),  $^{80}\text{Br}$  (17,6 mn) et  $^{128}\text{I}$  (25 mn) ; les nombres entre parenthèses sont les temps de demi-vie.

On voit que dans ces cas il faut réaliser la chromatographie en moins de 20 mn.

Un exemple de séparation de produits chlorés radioactifs est donné ci-dessous (Figure 11) :

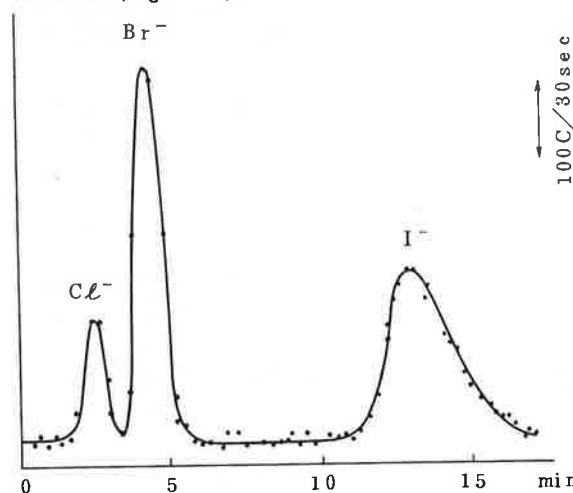


Figure 11. Séparation par échange d'ions de produits halogénés radioactifs

**Conditions opératoires**

Echantillon : solution aqueuse contenant 930  $\mu$ g de  $\text{Cl}^-$ , 84  $\mu$ g de  $\text{Br}^-$  et 132  $\mu$ g de  $\text{I}^-$  soumise à une irradiation neutronique (accélérateur de Van de Graaff)  
 Quantité injectée : 1,6  $\mu$ l  
 Colonne : Résine anionique Hitachi 2632,  $\Phi = 0,5$  mm - L = 7,1 cm  
 Eluant :  $\text{NaNO}_3$  6N/Acétone (50/50) 8  $\mu$ l/mn  
 Détecteur : Compteur Geiger

fois des dosages et la mise au point des conditions opératoires pour des chromatographies liquides semi-préparatives ou préparatives.

La micro-H.P.L.C. ouvre donc la voie à de nouvelles applications de la chromatographie liquide. Un appareil est déjà commercialisé à cet effet (JASCO modèle FAMILIC-100).

Bibliographie citée par le traducteur :  
 F.W. Farasek, Research/Development, 1977, 28-1- (42-46)  
 Daido ISHII et coll., Conférence N° 385, Pittsburgh Conference, Feb.28, 1977.