



**HAL**  
open science

# Développement de phases stationnaires monolithiques polymérisées in situ pour l'électrochromatographie capillaire et les microsystèmes séparatifs

Violaine Augustin

► **To cite this version:**

Violaine Augustin. Développement de phases stationnaires monolithiques polymérisées in situ pour l'électrochromatographie capillaire et les microsystèmes séparatifs. Chimie. ESPCI ParisTECH, 2005. Français. NNT: . pastel-00001628

**HAL Id: pastel-00001628**

**<https://pastel.hal.science/pastel-00001628>**

Submitted on 5 Apr 2006

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# **Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI – Pierre et Marie Curie**

**Ecole doctorale de Chimie Physique et Chimie Analytique de Paris Centre**

Spécialité  
**Chimie Analytique**

présentée par

**Violaine AUGUSTIN**

pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS VI**

**Développement de phases stationnaires monolithiques polymérisées in situ  
pour l'électrochromatographie capillaire et les microsystèmes séparatifs.**

Soutenance prévue le 16 Décembre 2005

Devant le jury composé de :

Mme Myriam Taverna :	Rapporteur
M. Jean-Louis Rocca :	Rapporteur
M. Jean-Louis Viovy :	Examineur
M. Pierre Gareil	
M. Alain Jardy :	Directeur de thèse
Mme Marie-Claire Hennion	

<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>7</b>
<b>CHAPITRE 1. BIBLIOGRAPHIE GENERALE</b>	<b>11</b>
<b>1. Les phases particulières</b>	<b>12</b>
1.1 Description des phases stationnaires particulières	12
1.2 Description des procédés de fabrication	14
1.2.1 Remplissage de la colonne	14
1.2.2 Immobilisation des phases stationnaires : fabrication de frittés	16
1.3 Avantages et inconvénients des phases stationnaires particulières	17
<b>2. Les colonnes non remplies, phases en tube ouvert</b>	<b>18</b>
2.1 Description des procédés de préparation et des chimies de phases stationnaires associées	18
2.1.1 Phases greffées ou physisorbées	18
2.1.2 Phases liées chimiquement	18
2.1.3 Phases à base de polymère inorganique obtenues par le procédé sol-gel	19
2.1.4 Phases à base de polymères organiques	20
2.2 Avantages et inconvénients des colonnes non remplies	21
<b>3. Les phases monolithiques</b>	<b>22</b>
3.1 Origine et description de ce type de phase stationnaire	22
3.1.1 Définition et origine	22
3.1.2 Caractéristiques des phases monolithiques	22
3.2 Description des principaux types de matériaux monolithiques	24
3.2.1 Monolithes inorganiques	24
3.2.1.1- Colonnes monolithiques à base de particules immobilisées	25
3.2.1.2-Colonnes monolithiques obtenues <i>in situ</i> par le procédé sol-gel	27
3.2.2 Monolithes organiques réalisés <i>in situ</i>	31
3.2.2.1-Monolithes obtenues par métathèse et ouverture de cycles	31
3.2.2.2-Phases stationnaires obtenues par polymérisation radicalaire	32
3.3 Phases monolithiques adaptées à l'ECC	37
3.3.1 Les phases utilisant le procédé sol-gel	37
3.3.2 Les phases à base de monomères organiques	38
3.4 Comparaison des technologies de colonne en ECC et choix retenu	38
<b>4. Phases monolithiques organiques photopolymérisées <i>in situ</i></b>	<b>40</b>
4.1 Processus de polymérisation	40
4.2 Influence des divers constituants du mélange sur la structure et les propriétés séparatives du monolithe	41
4.2.1 Concentration en initiateur et conditions d'illumination	41
4.2.2 Influence du rapport des solvants porogènes	42
4.2.3 Influence du rapport entre les monomères et les solvants	43
4.2.4 Influence du pourcentage en agent réticulant	43
4.2.5 Influence du pourcentage en monomère chargé	44
4.3 Fonctionnalités de surface des monolithes	45
4.4 Monolithes développés au laboratoire	46
<b>5. Les microsystèmes séparatifs</b>	<b>46</b>

5.1	Description et intérêts des microsystèmes	46
5.2	Les microsystèmes séparatifs électrophorétiques	48
5.3	Microsystèmes séparatifs électrochromatographiques	51
5.3.1	<i>Structures microfabriquées</i>	52
5.3.2	<i>Canaux remplis de particules</i>	53
5.3.3	<i>Monolithes polymériques poreux formés in situ dans les microcanaux</i>	54
<b>6.</b>	<b>Principes de l'électrochromatographie capillaire</b>	<b>58</b>
6.1	Principe et définition	58
6.2	Flux électroosmotique et électromigration	59
6.2.1	<i>Flux électroosmotique en EC</i>	59
6.2.2	<i>Flux électroosmotique en électrochromatographie capillaire</i>	60
6.2.3	<i>L'électromigration</i>	61
6.3	Rétention en ECC	62
6.4	Efficacité et phénomènes de dispersion	63
<b>7.</b>	<b>Conclusion</b>	<b>65</b>
<b>8.</b>	<b>Références bibliographiques</b>	<b>66</b>
<b>CHAPITRE 2. CONDITIONS DE SYNTHÈSE DE PHASES MONOLITHIQUES PHOTOPOLYMERISÉES A BASE D'ACRYLATES</b>		<b>73</b>
<b>1.</b>	<b>Introduction</b>	<b>73</b>
<b>2.</b>	<b>La réaction de polymérisation</b>	<b>73</b>
2.1	Principes et mécanismes de la polymérisation radicalaire en chaîne	75
2.1.1	<i>Initiation photochimique</i>	75
2.1.2	<i>Phase de propagation</i>	78
2.1.3	<i>Réactions de terminaison</i>	78
2.2	Vitesse globale des réactions de polymérisation en chaîne	79
2.2.1	<i>Cas général</i>	79
2.2.2	<i>Cas des réactions de photopolymérisation</i>	81
2.2.2	<i>Remarques générales sur les facteurs influençant la polymérisation</i>	82
<b>3.</b>	<b>Etat de l'art sur l'influence des paramètres énergie d'irradiation UV et prétraitements du capillaire sur la réaction de polymérisation</b>	<b>83</b>
3.1	Energie d'irradiation UV	83
3.2	Traitement de surface du capillaire	85
3.2.1	<i>Définition et description</i>	85
3.2.1.1	<i>1- Activation des sites sous forme silanol</i>	85
3.2.1.2	<i>2- La réaction de silanisation</i>	85
3.2.2	<i>Polymérisation sans aucun prétraitement</i>	86
3.2.3	<i>Polymérisation utilisant un mélange réactionnel contenant un agent silanisant</i>	87
3.2.4	<i>Description des différents protocoles de prétraitement et de silanisation</i>	87
<b>4.</b>	<b>Influence du prétraitement du capillaire sur les caractéristiques séparatives et optimisation</b>	<b>91</b>
4.1.	Conditions de prétraitement	91
4.2.	Evaluation des performances (méthodologie)	92
4.2.1	<i>Analyses électrochromatographiques</i>	92

4. 2. 2	<i>Images MEB</i>	93
4. 3.	Comparaison des méthodes de prétraitement par les images MEB	93
4. 4.	Comparaison des méthodes de prétraitement par les facteurs de rétention	94
4. 5.	Comparaison des méthodes de prétraitement par les courbes de van Deemter	95
4. 6.	Conclusions	97
<b>5.</b>	<b>Optimisation de l'énergie d'irradiation imposée sur l'obtention d'un matériau analytique</b>	<b>98</b>
5. 1.	Choix et description des protocoles opératoires	98
5. 2.	Evaluation des performances	98
5. 2. 1	<i>Par électrochromatographie</i>	98
5. 2. 2	<i>Par MEB</i>	100
5. 3.	Comparaison des énergies d'irradiation par les images MEB	100
5. 3. 1	<i>Energies inférieures à 3 J/cm<sup>2</sup></i>	101
5. 3. 2	<i>Energies supérieures ou égales à 20 J/cm<sup>2</sup></i>	102
5. 3. 3	<i>Energies comprises entre 3 et 20 J/cm<sup>2</sup></i>	103
5. 4.	Comparaison des énergies d'irradiation par les facteurs de rétention	103
5. 5.	Comparaison des énergies d'irradiation par les courbes de van Deemter	104
5. 3. 1	<i>Monolithes préparés avec des énergies comprises entre 3 et 12 J/cm<sup>2</sup></i>	104
5. 3. 1	<i>Monolithes préparés avec des énergies supérieures à 12 J/cm<sup>2</sup></i>	105
5. 6.	Conclusions sur l'influence du paramètre énergie d'irradiation	106
<b>6.</b>	<b>Répétabilité et reproductibilité des phases monolithiques</b>	<b>106</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusion</b>	<b>109</b>
<b>8.</b>	<b>Annexes</b>	<b>111</b>
<b>9.</b>	<b>Références bibliographiques</b>	<b>115</b>
<b>CHAPITRE 3.</b>	<b>UTILISATIONS DE PHASES MONOLITHIQUES POUR LA SEPARATION</b>	<b>117</b>
<b>1.</b>	<b>Introduction</b>	<b>117</b>
<b>2.</b>	<b>Caractéristiques physico-chimiques et chromatographiques des phases monolithiques étudiées</b>	<b>117</b>
2. 1	Porosité	117
2. 1. 1	<i>Rappels bibliographiques</i>	117
2. 1. 2	<i>Résultats expérimentaux</i>	120
2. 2	Le Flux Electroosmotique (FEO)	124
2. 2. 1	<i>Rappels bibliographiques sur le FEO en ECC</i>	124
2. 2. 2	<i>Résultats expérimentaux</i>	130
2. 3	Conclusion	137
<b>3.</b>	<b>Modes de séparation étudiés</b>	<b>138</b>
3. 1	Performances et comportements séparatifs des diverses colonnes monolithiques	140
3. 1. 1	<i>Phase négativement chargée, effet de la variation de l'hydrophobie du monomère</i>	140
3. 1. 2	<i>Phases négativement chargées, effet de la variation de la nature de la charge</i>	144

3. 1. 3	<i>Phases positivement chargées</i>	146
3. 2	Etude des phénomènes rétentifs	148
3. 2. 1	<i>Influence du pourcentage de solvant de la phase mobile sur les phénomènes rétentifs</i>	150
3. 2. 3	<i>Influence de la force ionique sur les phénomènes de rétention</i>	156
<b>4.</b>	<b>Comparaison avec la chromatographie électrocinétique micellaire capillaire (CEMC)</b>	<b>156</b>
4. 1	Description de la CEMC	156
4. 2	Comparaison des séparations de mélanges tests en CEMC et en ECC	159
4. 2. 1	<i>Présentation des composés des mélanges tests.</i>	159
4. 2. 2	<i>Discussions sur les séparations obtenues</i>	160
4. 3	Comparaison de ces deux techniques analytiques	164
<b>5.</b>	<b>Annexes</b>	<b>166</b>
<b>6.</b>	<b>Références bibliographiques</b>	<b>168</b>
<b>CHAPITRE 4 :</b>	<b>UTILISATION DES PHASES MONOLITHIQUES POUR LA PRECONCENTRATION</b>	<b>169</b>
<b>1.</b>	<b>Introduction</b>	<b>169</b>
<b>2.</b>	<b>Principe de préconcentration</b>	<b>169</b>
2. 1	En électrophorèse capillaire	169
2. 2	Préconcentration couplée en ligne avec la chromatographie en phase liquide	171
2. 3	En électrochromatographie capillaire	173
2. 3. 1	<i>Techniques développées pour la préconcentration</i>	173
2. 3. 2	<i>Evaluation d'un facteur d'enrichissement en signal</i>	174
<b>3.</b>	<b>Méthodes et conditions utilisées pour la préconcentration en ECC</b>	<b>175</b>
<b>4.</b>	<b>Augmentation de la sensibilité en ECC par augmentation du volume injecté</b>	<b>177</b>
<b>5.</b>	<b>Préconcentration des échantillons aqueux</b>	<b>177</b>
5. 1	Calculs théoriques	178
5. 2	Etude de l'élargissement de bande, choix du composé le plus polaire	179
5. 2. 1	<i>Milieu de l'échantillon aqueux</i>	179
5. 2. 2	<i>Milieu de l'échantillon de force ionique égale à la phase mobile</i>	181
5. 2. 3	<i>Conséquences de l'élargissement de bandes lors de la préconcentration sur le FES et sur l'analyse quantitative</i>	182
5. 2. 4	<i>Recherche de la concentration minimale détectable</i>	183
5. 3	Applications aux HAP et à d'autres composés	186
5. 3. 1	<i>Les HAP</i>	186
5. 3. 2	<i>Les pesticides et les acides aminés</i>	187
<b>6.</b>	<b>Conclusion</b>	<b>189</b>
<b>7.</b>	<b>Références bibliographiques</b>	<b>190</b>
<b>CHAPITRE 5 :</b>	<b>ADAPTATION DES TECHNOLOGIES ET METHODES DEVELOPPEES EN CAPILLAIRE AU FORMAT MICROSYSTEME.</b>	<b>191</b>

<b>1. Introduction</b>	<b>191</b>
<b>2. Mise en oeuvre et adaptation du procédé de synthèse</b>	<b>192</b>
2.1    Caractéristiques des microsystèmes	192
2.2    Adaptation des procédures développées en format capillaire au format microsysteme	193
<b>3. Séparations analytiques d'hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP) dans les microsystèmes</b>	<b>196</b>
3.1    Description des composés étudiés	196
3.2    Optimisation des séparations observées	197
3.2.1 <i>Influence du champ électrique sur la séparation</i>	198
3.2.2 <i>Influence de la largeur de la fenêtre de détection sur l'électrophorogramme expérimental</i>	199
3.2.3 <i>Longueur utile</i>	201
3.2.4 <i>Discussion sur l'optimisation de la séparation</i>	205
<b>4. Couplage des étapes : préconcentration et séparation</b>	<b>206</b>
4.1    Mise en œuvre d'une étape de préconcentration dans des microsystèmes	206
4.2    Couplage d'une étape de préconcentration à la séparation	209
4.3    Conclusion - perspectives	212
<b>5. Vers des phases stationnaires spécifiques : développement de monolithes adaptés au greffage d'anticorps</b>	<b>213</b>
5.1    Etude bibliographique de la synthèse des phases monolithiques modifiées	213
5.2    Développement d'une méthode permettant le greffage orienté d'anticorps	216
5.2.1 <i>Synthèse et caractérisation du monolithe contenant des groupements carboxyle</i>	217
5.2.2 <i>Réaction et protocole de greffage d'une diamine sur les groupements carboxyle</i>	218
5.2.3 <i>Caractérisation de la phase greffée présentant des groupements amine</i>	219
5.2.4 <i>Perspectives : greffage d'anticorps</i>	220
<b>6. Annexes</b>	<b>222</b>
6.1    Description du montage et du matériel utilisé pour les microsystèmes	222
6.2    Modes d'injection en microsystèmes	223
6.3    Calcul du champ électrique appliqué dans un microsysteme lors d'une séparation	225
<b>7. Références bibliographiques</b>	<b>227</b>
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>	<b>229</b>



## INTRODUCTION GENERALE

Un des défis des sciences analytiques pour les années à venir reste la conception de systèmes transportables permettant de réaliser des analyses sur site lors de problèmes sanitaires variés afin de pouvoir apporter un diagnostic rapide et fiable. Dans cet esprit, une des voies développées consiste à miniaturiser l'ensemble de la chaîne analytique, du traitement de l'échantillon à la détection. Cette tendance à la miniaturisation trouve ses justifications dans les très faibles volumes d'échantillons disponibles (tissus, cellules), le coût élevé de certains réactifs (anticorps, enzymes), mais également afin de répondre aux demandes d'analyses de plus en plus rapides et donc de pouvoir traiter un grand nombre d'échantillons.

La miniaturisation des techniques séparatives est une problématique récurrente pour les sciences séparatives et chaque développement technologique permet d'apporter une réponse et des avancées dans ce domaine. Ainsi, la chromatographie en phase liquide, CPL, a connu plusieurs formats dont les plus récents atteignent le format capillaire, la nano-CPL. L'électrophorèse, quant à elle, a été transposée au format capillaire au début des années 80 et plus récemment encore, au début des années 90, au format microsystème.

A l'heure actuelle, les technologies liées aux microsystèmes se développent tant dans le domaine de la chimie analytique que dans celui de la chimie combinatoire, des procédés, ou des sciences biologiques. Leur format et leurs modes de fabrication permettent de concevoir des microstructures de géométrie très diversifiée, à façon. Ainsi, il est possible de concevoir et produire des microsystèmes où plusieurs étapes analytiques peuvent être couplées sans aucun volume mort, par exemple des digestions enzymatiques de protéines couplées en ligne avec la séparation des produits de digestion qui sont ensuite détecté par spectrométrie de masse. Ces systèmes permettent aussi la réalisation d'analyses multidimensionnelles de façon plus simple techniquement, permettant ainsi d'obtenir un potentiel séparatif très performant. Afin de l'exploiter, les techniques analytiques électrophorétiques ont été principalement développées. En effet, leurs avantages résident tout d'abord dans leur simplicité de mise en œuvre à ce niveau de miniaturisation comparée aux techniques chromatographiques. Par ailleurs, une des principales caractéristiques de ces techniques est la génération d'un profil de vitesse de l'écoulement de l'électrolyte qui est plan donc très peu dispersif. Ce profil est issu de la génération du flux électroosmotique et donc de l'existence d'un matériau aux parois chargées. Cette caractéristique est essentielle pour l'obtention de systèmes analytiques

efficaces, donc de séparations bien résolues et ainsi profiter pleinement des avantages présentés par le format de ces systèmes.

La recherche de composés cibles dans des matrices biologiques réelles, donc nécessairement complexes, tels que des échantillons urinaires ou sanguins, nécessitent des étapes de traitement de l'échantillon, une extraction sélective par exemple, suivie d'une étape séparative de ces composés. Les microsystèmes présentent une alternative intéressante et prometteuse en vue d'une intégration de toutes les étapes en ligne au moyen de géométries adaptables au système à mettre en œuvre. Afin de pouvoir réaliser des extractions sélectives, le développement de phases stationnaires adaptées et performantes est nécessaire. Nos objectifs correspondent à ce projet : mettre en œuvre des phases stationnaires adaptées aux microsystèmes pour la réalisation d'extraction, de préconcentration puis la séparation de composés cibles d'origine environnementale et biologique.

La mise en œuvre de phases stationnaires dans des microcanaux nécessite que ces phases présentent des caractéristiques séparatives en adéquation avec ce format. Les phases particulières ou en tube ouvert ne sont pas les plus adaptées de par leur difficultés de remplissage ou leur faibles propriétés séparatives, bien que quelques travaux aient été menés avec succès. Les phases stationnaires monolithiques synthétisées *in situ* par photopolymérisation proposent une réelle solution au niveau de la simplicité de mise en œuvre, des possibilités de circonscrire la synthèse sur une longueur définie des microcanaux, et de leurs performances pour les séparations en capillaire. De plus, elles présentent l'avantage de disposer d'une grande modularité de fonctionnalités disponibles de par leur mode de synthèse.

C'est pourquoi ces phases stationnaires semblent réunir toutes les caractéristiques nécessaires à l'obtention de systèmes miniaturisés bien adaptés à l'électrochromatographie. C'est donc ce type de phase stationnaire qui a été développé au cours de ces travaux tout d'abord en capillaire, lors d'études préliminaires à leur insertion dans des microsystèmes. En effet, le format capillaire convient mieux à l'étude et au développement des technologies monolithiques car moins coûteux et plus simple de réalisation. Etant donné qu'il s'agit de pouvoir synthétiser une phase stationnaire *in situ*, les conditions de prétraitements utiles à l'attachement du monolithe aux parois du capillaire, et les conditions de synthèse, telle que l'influence de l'énergie d'irradiation sur le polymère, ont été étudiées. Une fois ces paramètres optimisés, une étude de ces phases en tant que matériau séparatif a été menée tant

sur l'évaluation de leur porosité, sur les valeurs de flux électroosmotique qu'elles peuvent générer, et sur leurs mécanismes de rétention. Par ailleurs, les diverses fonctionnalités de phases stationnaires développées au cours de cette thèse et leurs aptitudes séparatives sont présentées. Une comparaison de la chromatographie électrocinétique micellaire capillaire et de l'électrochromatographie capillaire a ensuite été réalisée afin de déterminer les intérêts de ces techniques. Ensuite l'évaluation de ces monolithes pour la préconcentration en ligne suivie de la séparation des espèces a été effectuée et a permis d'obtenir des facteurs d'augmentation de la sensibilité très élevés sur des composés tests d'intérêt environnemental. Enfin, la synthèse de ces phases monolithiques photopolymérisées ainsi que la transposition des étapes de préconcentration et de séparation développées en capillaire a été entreprise en microsystemes. Par ailleurs, les premières études réalisées sur le développement de phases stationnaires spécifiques, des monolithes adaptés au greffage d'anticorps, ont été menées et ont permis d'établir que la procédure développée permettait de fonctionnaliser la phase comme souhaité et d'obtenir ainsi un monolithe plus sélectif.



## CHAPITRE 1. BIBLIOGRAPHIE GENERALE

Un des défis des sciences séparatives porte sur la miniaturisation de l'ensemble de la chaîne analytique intégrant les trois étapes de l'analyse : traitement de l'échantillon, séparation et détection. Cette évolution actuelle se justifie par les très faibles volumes d'échantillons disponibles (cellules, tissus...), le coût de certains réactifs (anticorps, enzymes...) mais également par la nécessité croissante de gagner en temps d'analyse pour permettre de répondre rapidement à une urgence médicale ou pour traiter un grand nombre d'échantillons. C'est pourquoi la miniaturisation des techniques séparatives est toujours plus importante, notamment en phase liquide, avec le développement de l'électrophorèse capillaire, EC, de l'électrochromatographie capillaire, ECC, de la nano-chromatographie, nano-CPL, et maintenant des microsystèmes analytiques, domaine en pleine émergence.

Par ailleurs, la complexité des matrices étudiées ainsi que la faible concentration des analytes recherchés ont imposé l'intégration d'étapes de traitement de l'échantillon dans le processus analytique global ainsi que l'emploi de phases stationnaires adaptées et performantes au niveau séparatif. Ainsi, la miniaturisation des techniques séparatives chromatographiques engendre aussi l'adaptation des technologies de phases stationnaires disponibles afin de répondre aux exigences de ce format. En effet, les phases particulières ou en tubes ouverts classiques ne sont pas sans poser quelques problèmes tant au niveau de la fabrication de la colonne analytique qu'au niveau de leurs performances séparatives. C'est pourquoi d'autres technologies de phases stationnaires, les phases monolithiques, ont été développées afin de proposer des alternatives aux difficultés de fabrication tout en permettant d'obtenir des performances séparatives intéressantes.

D'autre part, les techniques électrocinétiques ont été développées sur les microsystèmes analytiques afin de profiter au mieux des avantages présentés par la miniaturisation de leurs dimensions. Ainsi, l'électrochromatographie en capillaire (ECC), ou en microcanal, est une technique analytique alliant les avantages spécifiques des formats miniaturisés mais aussi du profil d'écoulement plat du flux électroosmotique permettant d'atteindre de hautes efficacités, à la présence d'une phase stationnaire présentant une certaine sélectivité. Le flux électroosmotique résulte de l'existence de charges de surface sur la paroi interne d'un capillaire en électrophorèse capillaire, EC, et/ou à la surface de la phase stationnaire en ECC. Le développement de phases stationnaires pour l'électrochromatographie capillaire et leur transposition dans des microsystèmes séparatifs nécessitent ainsi de déterminer quelle est la

technologie de phase stationnaire la plus adaptée aux contraintes de ces deux formats, notamment la génération d'un flux électroosmotique, des caractéristiques rétentives, une porosité et une surface développée suffisantes.

Nous présenterons dans une première partie les trois principales technologies de phases stationnaires utilisées en ECC : les phases stationnaires particulaires, tubulaires, et monolithiques. Après avoir discuté des avantages et inconvénients respectifs de ces trois types de phase, notamment en vue de leur transposition au format microsystème, les phases stationnaires monolithiques seront abordées de façon plus approfondie. Enfin les principes généraux de l'ECC et ses développements récents en microsystème analytique seront décrits.

## 1. Les phases particulaires

Elles représentent la première technologie de phases stationnaires développées, utilisées, et étudiées en électrochromatographie capillaire et en nano-CPL. Ces colonnes capillaires comportent deux segments : l'un rempli de particules de phase stationnaire et l'autre vide, chacun présentant sa propre vitesse électroosmotique. La fenêtre de détection se situe idéalement en tout début de partie vide. La Figure 1 illustre l'agencement d'une colonne remplie de phase stationnaire particulaire. L'obtention de performances séparatives stables et reproductibles dépend de la qualité du remplissage et de l'immobilisation des particules.

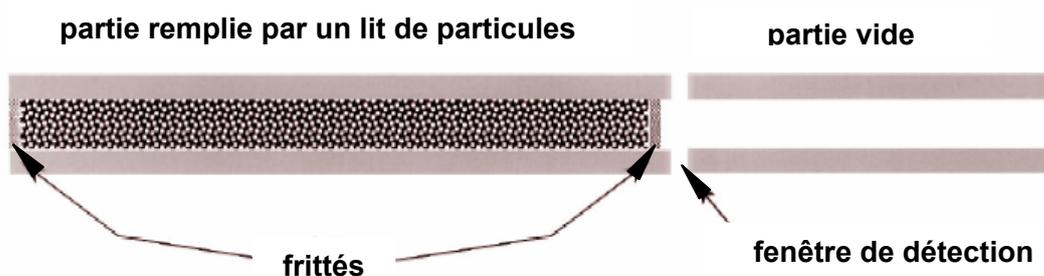


Figure 1: schéma descriptif des divers constituants d'un capillaire rempli par des particules de silice [1].

### 1.1 Description des phases stationnaires particulaires

Les phases stationnaires particulaires utilisés pour les séparations par ECC doivent répondre à certains critères spécifiques tels que la génération d'un flux électroosmotique et la rétention suffisante des composés. Elles doivent aussi présenter une distribution de la taille des particules assez étroite pour obtenir une bonne efficacité. Des phases stationnaires

classiquement employées en chromatographie liquide ont d'abord été utilisées. Un tableau résumant les principales phases particulières employées en ECC et leurs applications a été publié en 1997 par Robson et al [2]. Les phases les plus employées sont apolaires, constituées de particules de silice greffée par des groupements octadécyle mais aussi octyle ou encore en C30 [3], le flux électrosmotique étant généré par les sites silanols résiduels à un pH où il se trouvent ionisés.

L'influence de plusieurs paramètres a été étudiée sur les caractéristiques séparatives des colonnes afin de déterminer les phases stationnaires les plus performantes [4,5]. Une diminution de la taille des particules de 5 à 1,5  $\mu\text{m}$  permet d'augmenter les efficacités. En dessous d'un diamètre de particules d'un micron, le temps d'analyse diminue toujours, cependant des pertes importantes en efficacité se produisent [6]. Il faut aussi noter que le flux électrosmotique (FEO) est indépendant de la taille des particules. Cependant, la taille des pores va jouer un rôle important dans la génération du FEO et des efficacités. En effet, pour qu'un FEO soit généré dans l'ensemble des pores il faut que le diamètre de ceux-ci soit supérieur au phénomène de recouvrement de la double couche électrique, soit 20 nm [7]. La génération d'un FEO dans ces pores est donc plus importante et permet l'amélioration des efficacités par accélération des phénomènes de transfert de masse intra-particulaire, coefficient  $C_s$  de l'équation de van Deemter [8]. Ce flux est souvent désigné sous le nom de flux perfusif. Par ailleurs, les particules de silice comportent des chaînes alkyles greffées, permettant les interactions nécessaires à l'établissement de phénomènes rétectifs avec les solutés, et des groupements silanol résiduels autorisent l'établissement d'un flux électrosmotique. C'est pourquoi les phases n'ayant pas subi de post-silanisation après greffage (non end-cappées) présentent un FEO plus important que celles qui le sont. Cependant, le flux électrosmotique généré reste néanmoins dépendant des conditions d'analyse : pH et force ionique de l'électrolyte ainsi que la nature du solvant organique utilisé.

Des phases échangeuses de cations ou d'anions ont également été utilisées et développées afin de générer un flux électrosmotique indépendant du pH de la phase mobile [9,10] et ce sur une large gamme de pH, permettant ainsi de réaliser des analyses rapides sans se préoccuper de la stabilité du FEO [10-12]. Cependant leurs possibilités séparatives sont limitées à l'analyse de composés chargés. Par ailleurs, des phases mixtes comportant à la fois des chaînes alkyle plus ou moins longues et des groupements chargés leur conférant un mode de rétention mixte ont également été utilisées en ECC [11-13]. Elles permettent de mettre en

œuvre des phénomènes rétentifs de type phase inverse ainsi qu'un FEO stable sur une large gamme de pH. De plus, les efficacités obtenues sont généralement satisfaisantes.

Il existe ainsi une grande diversité de phases stationnaires particulières utilisables en ECC tant au niveau de la taille des particules que des chimies disponibles. Néanmoins, elles doivent répondre à certains impératifs si des efficacités importantes et des analyses rapides et répétables veulent être obtenues.

## **1. 2 Description des procédés de fabrication**

La fabrication d'une colonne remplie comporte deux étapes principales : le remplissage du tube capillaire par la phase stationnaire puis l'immobilisation de cette dernière. Plusieurs revues reviennent en détail sur ces diverses étapes [1,4,5,14-16].

### *1. 2. 1 Remplissage de la colonne*

Trois principales techniques de remplissage de particules dans un capillaire ont été décrites dans la littérature [1,5], le remplissage par force centripète [17], le remplissage électrocinétique [18] et le remplissage hydrodynamique [19,20]. La première technique est anecdotique et la seconde, peu employée, consiste à faire migrer sous champ électrique une suspension de particules dans un capillaire comportant un fritté en fin de colonne [18]. La troisième technique consiste en un remplissage hydrodynamique et est de loin la plus employée. La Figure 2 représente le déroulement de ce type de remplissage qui peut être résumé en quelques étapes décrites dans la légende.

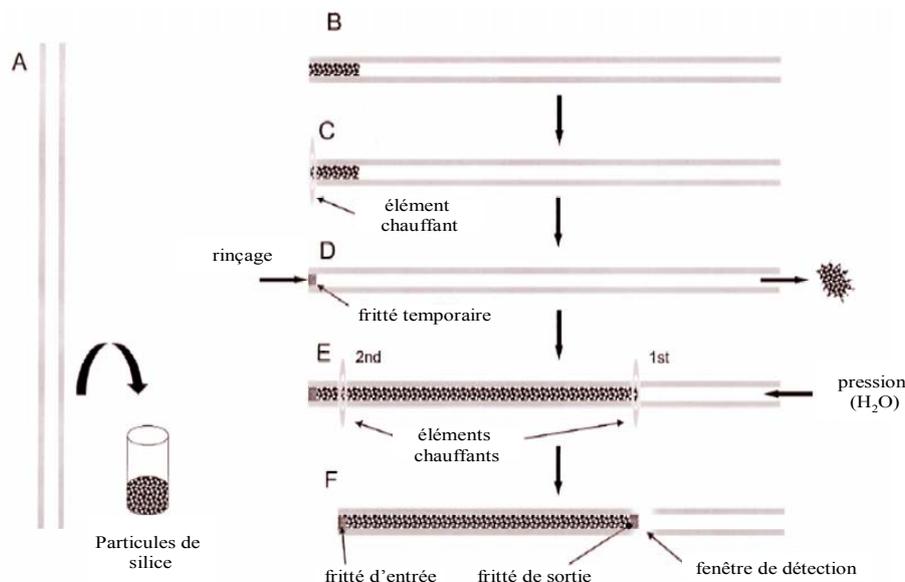


Figure 2 : Schéma de fabrication représentant les différentes étapes conduisant à l'obtention d'une colonne remplie. (A) immersion d'un capillaire dans une solution de particules de silice, (B) solution de particules de silice en place pour réaliser un fritté, (C) formation d'un fritté temporaire par chauffage des particules de silice, (D) élimination de l'excès de silice après formation du fritté temporaire, (E) remplissage du capillaire puis pressurisation sous flux d'eau lors de la formation des frittés par chauffage, (F) réalisation de la fenêtre de détection sur le capillaire rempli [1].

Le remplissage hydrodynamique permet d'obtenir des colonnes homogènes avec un matériel assez simple. Cependant la densité des particules de silice étant généralement plus importante que celle des solvants utilisés au cours des étapes de remplissage, cela peut provoquer une sédimentation de la phase stationnaire. C'est pourquoi il faut optimiser le choix des solvants employés [21] et utiliser les ultrasons lors de la mise en suspension des particules et du remplissage. Une autre limitation de cette méthode est due à la forte pression obtenue en tête de colonne lors du remplissage. Il est donc difficile de remplir de longues colonnes rapidement ou d'utiliser des particules de faibles dimensions sans une pompe permettant d'aller jusqu'à de très hautes pressions.

Le remplissage utilisant du CO<sub>2</sub> supercritique comme fluide de mise en suspension permet d'obtenir des colonnes plus rapidement [19,20]. En effet la viscosité du fluide est plus faible que celle des solvants liquides et donc la vitesse de remplissage est plus importante pour des pressions en tête de colonne équivalentes.

L'obtention d'une colonne remplie de bonne qualité nécessite de choisir une phase stationnaire adéquate, de répartition granulométrique étroite, mais aussi un mode de remplissage et d'immobilisation appropriés à celle-ci. En effet, plus les particules sont serrées

et l'ensemble homogène, moins il y aura de réarrangements de ces particules chargées lors de l'application du champ électrique et donc moins d'espaces vides. L'efficacité des colonnes varie donc beaucoup en fonction du type de remplissage employé. Par ailleurs, il est difficile d'établir des comparaisons entre ces méthodes en utilisant les données de la littérature car les phases, les conditions d'analyse, l'expérience de l'analyste lors de la fabrication de colonne diffèrent d'une étude à l'autre. Néanmoins, Colon et al ont procédé à une comparaison des efficacités selon la méthode de remplissage employée et les premiers résultats semblent indiquer que les méthodes les plus efficaces seraient celles utilisant le CO<sub>2</sub> (160 000 Pl/m pour la thiourée et le pentylbenzène) et les forces centripètes (180 000 Pl/m pour la thiourée et le pentylbenzène) [1]. Cependant, le remplissage hydrodynamique reste le plus employé car les analystes ont pu reprendre, adapter et s'inspirer du matériel et des techniques utilisés lors du remplissage des premières colonnes de CLHP.

### *1. 2. 2 Immobilisation des phases stationnaires : fabrication de frittés*

La fabrication de frittés est la solution la plus employée pour immobiliser la phase stationnaire mais il existe aussi d'autres méthodes comme l'utilisation de capillaire comportant des restricteurs internes ou externes. Les frittés jouent un rôle à la fois sur la stabilité de la colonne, sur les phénomènes de formation de bulles ou encore sur l'élargissement des pics ou la perte de sensibilité due à l'adsorption des solutés. Ils se situent sur la longueur du capillaire en début et fin de colonne. Leur fabrication est une étape cruciale dans l'obtention d'une colonne efficace.

Etant donné le format capillaire des colonnes utilisées en ECC, généralement 50 à 100 µm de diamètre interne, il est difficile et peu avantageux d'utiliser la même configuration de frittés qu'en chromatographie en phase liquide (rondelles d'acier inoxydable). C'est pourquoi ils sont synthétisés *in situ*, ce qui permet de minimiser les effets dispersifs extra-colonne. Les frittés peuvent être réalisés selon différentes techniques : par formation d'un gel de silicate suivi d'un traitement thermique, par formation d'un sol-gel, par formation d'un polymère poreux, ou par agglomération de particules par chauffage. Cette dernière technique est la plus employée de par sa relative simplicité de mise en œuvre, bien qu'elle fragilise le capillaire par destruction de la gaine de polyimide du capillaire. Il faut noter que quelle que soit la technique, celle-ci présente des difficultés de mise en œuvre importantes et que l'obtention de frittés solides et perméables de façon reproductible est laborieuse et délicate.

Un des principaux problèmes rencontrés lors de la fabrication et l'utilisation de colonnes particulières est la formation de bulles à proximité des frittés qui perturbent les analyses [5,14,22,23]. En effet, ces bulles peuvent provoquer des déformations de la ligne de base, des instabilités passagères du courant ou encore une coupure totale de ce dernier. De plus, une fois les bulles formées dans la colonne, il est difficile de les éliminer.

### **1.3 Avantages et inconvénients des phases stationnaires particulières**

Ce type de colonnes présente l'avantage d'avoir une grande surface développée comparée aux colonnes non-remplies (décrites dans le paragraphe 2.), permettant une capacité d'injection plus élevée. De plus, les phases stationnaires utilisées sont essentiellement des produits commerciaux et bénéficient donc d'une large gamme de sélectivité disponible ainsi que d'une bonne reproductibilité des propriétés de ces phases. Par ailleurs, ces colonnes permettent de très bonnes efficacités dont certaines sont exceptionnelles [24], dépassant le million de plateaux/m. Elles ont d'ailleurs été utilisées avec succès lors d'analyses de composés très variés : composés environnementaux (HAP, triazines...), médicamenteux (stéroïdes ou diurétiques), et biomolécules (acides aminés, peptides, oligosaccharides), composés chiraux [16].

Cependant, la mise en œuvre laborieuse du remplissage doublée de la difficulté à obtenir des frittés de bonne qualité et reproductibles limitent le développement de cette technologie. En effet, la présence de frittés peut également engendrer, en plus des bulles, des contaminations. De plus, la gaine de polyimide protégeant le capillaire est éliminée au niveau de la fenêtre de détection mais aussi au niveau des frittés, fragilisant le capillaire. Une colonne remplie est moins résistante à la torsion et la mise en place dans une cassette peut se révéler fatale [25]. Dans la revue de Colon et al [1], une comparaison entre le remplissage des colonnes de CLHP et celui des capillaires de ECC est présentée. En effet, les problèmes rencontrés de nos jours en ECC se sont posés, dans des termes proches en CLHP, il y a quelques années. Ils mettent aussi en avant l'habileté, les compétences et l'entraînement nécessaires à l'électrochromatographe pour obtenir des colonnes de bonne qualité. C'est pourquoi ils considèrent, encore aujourd'hui, la fabrication de colonnes performantes comme un art et une technique longue à acquérir.

## 2. Les colonnes non remplies, phases en tube ouvert

Les colonnes capillaires non-remplies se présentent sous la forme d'un capillaire de faible diamètre dont la paroi interne a été recouverte d'une certaine épaisseur de phase stationnaire. Il existe plusieurs méthodes pour obtenir une phase stationnaire attachée aux parois et chacune présente un grand choix de fonctionnalités disponibles. Ces phases ont été développées en ECC pour permettre de remédier aux problèmes rencontrés avec les phases stationnaires particulières liés à la présence et à la fabrication de frittés.

### 2.1 Description des procédés de préparation et des chimies de phases stationnaires associées

Il existe différentes procédures permettant d'immobiliser une phase stationnaire sur les parois d'un capillaire.

#### 2.1.1 Phases greffées ou physisorbées

Les phases en tube ouvert peuvent être formées par interactions électrostatiques entre des ligands, ou modificateurs, et la surface chargée du capillaire. Si les interactions sont suffisamment fortes énergétiquement alors il s'agit d'adsorption physique permettant un greffage rémanent, sinon ce sont des phénomènes d'adsorption dynamique qui ont lieu. Dans ce dernier cas, il faut donc que le ligand soit ajouté à la phase mobile. Les modificateurs utilisés peuvent être classés en trois grandes catégories : des surfactants cationiques, des surfactants polymériques, des polymères chargés [26]. Par ailleurs, des ligands tels que des biopolymères, des protéines, des polymères fonctionnalisés, peuvent être mis en œuvre permettant ainsi de réaliser des séparations basées sur des phénomènes d'affinité ou de chiralité.

#### 2.1.2 Phases liées chimiquement

L'obtention de ces phases consiste en premier lieu à activer la surface interne du capillaire par une étape dite de gravure. Puis, la deuxième étape consiste à lier chimiquement un composé comportant un groupement organique par des réactions de silanisation et d'hydrosilylation. Ces phases sont liées aux parois et le processus d'activation permet d'augmenter la surface d'interaction. Ce procédé a été adapté pour l'ECC par Pesek et al. [27]. Le réactif d'activation est le bifluorure d'ammonium qui provoque des effets très différents lorsque le protocole et les conditions de silanisation varient. Les réactions mises en jeu sont les suivantes :

Silanisation :  $\text{Si-OH} + (\text{EtO})_3\text{SiH} \rightarrow \text{Si-O-Si-H} + \text{EtOH}$

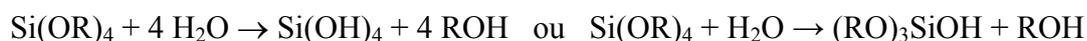
Hydrosilylation :  $\text{Si-O-Si-H} + \text{HCH=CHR} \rightarrow \text{Si-O-Si-CH}_2\text{-CH}_2\text{R}$

De nombreux greffages de phase stationnaire ont été réalisés en utilisant cette méthode par Pesek et Matyska [27-31] : des groupements octadécyle, octyle, diol, des groupements chiraux ou encore des dérivés du cholestérol. Leurs études ont porté sur la caractérisation de ces phases et de leurs performances avec des peptides ou des protéines comme composés tests [27,31].

### *2. 1. 3 Phases à base de polymère inorganique obtenues par le procédé sol-gel*

Dans le but d'augmenter la surface spécifique et donc d'augmenter les interactions soluté – phase stationnaire, des phases stationnaires polymériques inorganiques ont été développées. La réalisation d'un sol-gel sur les parois de capillaires comprend une étape de prétraitement de ces parois (lavage à la soude 0.1 M, par exemple) afin d'augmenter au maximum le nombre de groupements silanol disponibles. L'étape suivante porte sur la formation du sol-gel à partir d'une solution sol optimisée. Cette solution est généralement composée de précurseur(s) (généralement des alcoxysilanes), d'un catalyseur (acide, base, température, lumière...), d'eau et de solvant(s) approprié(s), et d'un agent porogène.

En contrôlant chacun de ces paramètres on obtient un polymère aux propriétés bien définies et qui peuvent être ajustées aux besoins des analystes. La réaction de polymérisation commence par l'hydrolyse catalytique des précurseurs ( $\text{Si(OR)}_4$ ) générant les espèces réactives en solution :



Ces espèces contenant une ou des fonctions silanol vont subir une condensation avec d'autres espèces réactives présentes dans la solution de manière à former un réseau polymérique tridimensionnel de sol-gel. Il existe deux types de réaction de condensation :



Une partie de ce sol-gel se développant près des parois va ainsi se retrouver liée de façon covalente à la surface interne du capillaire. Après avoir laissé un certain temps de

polymérisation (10-20 minutes), le capillaire est rincé sous pression afin d'expulser la partie non liée au capillaire de la solution sol. Ensuite le capillaire est séché puis subit un vieillissement à la soude (Figure 3).



Figure 3 : Image MEB d'un capillaire de silice dont la surface interne a été greffée par une phase stationnaire de type sol-gel.

Ce type de colonne permet d'obtenir des rétentions assez importantes grâce à leur surface développée élevée et présentent une très bonne stabilité. Cependant il est nécessaire d'optimiser les proportions des divers constituants du mélange réactionnel afin d'obtenir une phase performante.

#### *2. 1. 4 Phases à base de polymères organiques*

Une autre technique pour obtenir des colonnes polymériques non-remplies est d'utiliser des monomères organiques [32]. Le procédé d'obtention est similaire à celui décrit dans le paragraphe précédent. La première étape consiste à prétraiter le capillaire à la soude puis à l'acide pour accroître le nombre de fonctions silanol susceptibles de réagir. Le prétraitement se termine par une réaction de silanisation. Ensuite le capillaire est rempli de la solution de monomères comprenant : un ou des monomères (méthacrylate ou polystyrène (PS)), un agent réticulant (à base de méthacrylate ou divinylbenzène (DVB)), un initiateur et des solvants porogènes.

Une fois la réaction de polymérisation réalisée, suit une fonctionnalisation du polymère poreux par un composé basique (N,N-diméthyl dodécylamine) permettant d'ajouter des charges à ce polymère et donc de générer un flux électroosmotique. Ce type de phase a été mis en œuvre pour l'analyse de protéines par ECC et présente une bonne stabilité [32].

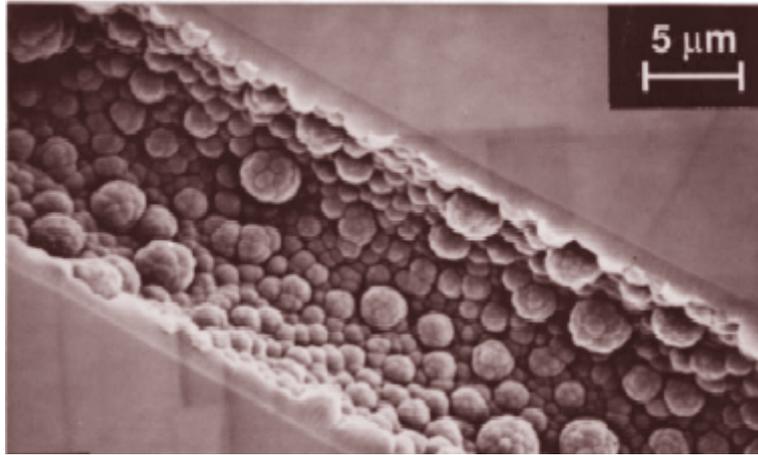


Figure 4 : Images MEB de la paroi interne d'une colonne tubulaire à base de polymère organique : PS-DVB, capillaire de 20  $\mu\text{m}$  de diamètre interne [32].

Ce type de colonne permet d'obtenir des rétentions plus importantes que dans les autres technologies de colonnes tubulaires grâce à leur plus grande surface développée (Figure 4). Cependant le procédé de fabrication de ces phases est plus complexe que celui des phases adsorbées et demande à être optimisé lorsque l'on change un paramètre comme la nature des monomères ou des solvants par exemple.

## 2.2 Avantages et inconvénients des colonnes non remplies

Ces colonnes non-remplies sont de réalisation relativement simple, comparées aux colonnes particulières, et les systèmes séparatifs développés donnent lieu à de très bonnes efficacités. Une grande diversité de groupements fonctionnels de phases stationnaires et de procédés existent et permettent d'adapter la colonne en fonction des analyses à mettre au point. Dans cette technologie de colonnes, les problèmes de bulles ne se posent plus, ni ceux des frittés.

Néanmoins, les diamètres internes des colonnes non-remplies sont de faibles dimensions (10 à 20  $\mu\text{m}$ ) pour permettre un accès suffisant des solutés à la phase stationnaire car les vitesses de diffusion des solutés dans la phase mobile ont de faibles valeurs. De plus, l'utilisation de ces diamètres de capillaires entraîne alors des limitations importantes au niveau de la détectabilité. Ainsi, les phases tubulaires présentent une plus faible surface spécifique comparées aux phases particulières et donc un rapport surface sur volume assez faible. Par conséquent, les volumes injectables sont fortement réduits ainsi que le trajet optique, soit la sensibilité de la détection.

## 3. Les phases monolithiques

### 3.1 Origine et description de ce type de phase stationnaire

#### 3.1.1. Définition et origine

Ces phases stationnaires sont préparées par polymérisation *in situ* dans une colonne ou un capillaire. La phase est liée aux parois internes et ne nécessite donc pas l'utilisation de frittés. La particularité de ce format de colonne est de se présenter d'un seul tenant. Elles ont d'ailleurs eu plusieurs autres dénominations pour rendre compte de leur particularité : « continuous polymer bed » [33,34], « macroporous polymer membranes » [35], « continuous polymer rods » [36], « porous silica rods » [37]. Les termes monolithes, monolithiques permettent de rendre compte des spécificités de ces colonnes. Les origines de ce type de structure datent de la fin des années 60 grâce à des travaux sur un nouveau matériau synthétique obtenu par polymérisation par initiation radicalaire de monomères à base de méthacrylates. Quelques années plus tard, une autre approche a utilisé des mousses de polyuréthane préparées *in situ* dans des colonnes chromatographiques [35]. Dans le protocole expérimental et dans les caractéristiques de ce matériau, les principaux attributs des futures colonnes monolithiques développées en CPL sont déjà présents, à savoir l'utilisation de monomères et d'agents réticulants en présence de solvants porogènes [35,38]. Ensuite, les travaux concernant ce nouveau type de colonne ont connu un nouvel essor à partir de la fin des années 80 et le début des années 90 [33,34,36,39]. Les premières technologies de colonne ont été développées et étudiées en CPL à partir de monomères organiques tels que des styrènes-divinylbenzènes [39], des acrylamides [33,34,40] et des méthacrylates [36,39]. Les monolithes inorganiques utilisant la technologie sol-gel se sont développés plus tard, en CPL dans un premier temps [37].

#### 3.1.2. Caractéristiques des phases monolithiques

Les monolithes présentent des caractéristiques structurales particulières. Ils sont constitués d'une structure poreuse tridimensionnelle composée de nodules interconnectés formant le squelette de la colonne. Les monolithes possèdent généralement un double réseau poreux constitués de macropores (>50 nm) induisant une faible résistance à l'écoulement, donc des pressions en tête de colonne réduites, et de mésopores (2-50 nm) permettant d'augmenter la surface développée de la phase stationnaire. L'ensemble donne lieu à un flux perfusif favorisant des analyses rapides et des transferts de masse rapides entre les solutés, la phase

stationnaire et la phase mobile [41]. La perméabilité de la colonne dépend du nombre et de la distribution de la taille des pores et du rapport macropores/mésopores, contrôlé par la composition du mélange réactionnel. Elle est rarement calculée, cependant elle est estimée à partir des mesures de pression en tête de colonne. Ainsi, les colonnes monolithiques permettent de répondre à certains inconvénients des colonnes particulaires, majoritairement utilisées en CPL, tels qu'un transfert de masse lent ou un volume interparticulaire élevé. Ces problèmes dispersifs liés à cette technologie de phase stationnaire restent très limitants pour des séparations rapides et efficaces de macromolécules. C'est pourquoi les monolithes représentent une alternative intéressante aux phases particulaires de par leurs performances séparatives [33,34,36,39,40,42,43]. De plus, le développement du format micro-colonne en CPL, en réponse aux besoins d'un couplage direct à la spectrométrie de masse, d'analyses à haut débit, de séparations de composés biologiques, a accru l'intérêt des analystes pour les technologies monolithiques, bien adaptées à ces problématiques. La Figure 5 présente la séparation de composés étalons de polystyrène obtenues en CPL avec différents types de colonne, particulaires non-poreuses et poreuses, monolithiques.

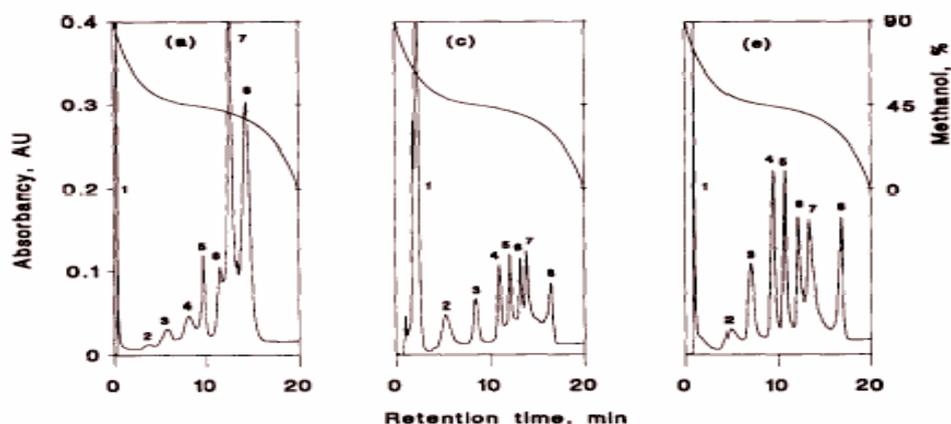


Figure 5 : Chromatogrammes issus de plusieurs types de phase stationnaire utilisée en CPL pour la séparation d'étalons de polystyrène. Colonnes à base polystyrène-divinylbenzène de dimensions 30x4.1 mm de diamètre interne. (a) : particules non poreuses de 4  $\mu\text{m}$ , (c) particules poreuses de 7  $\mu\text{m}$ , (e) monolithe. Gradient de phase mobile : 90 à 0% de méthanol dans du tétrahydrofurane en 20 minutes, profil superposé aux chromatogrammes. Débit de phase mobile : 2mL/min, détection UV à 254 nm. Analytes : polystyrènes de poids moléculaires de 519 (1), 1250 (2) ; 9200 (3), 34 000 (4), 68 000 (5), 170 000 (6), 465 000 (7), 2 950 000 (8), chacun à 3 mg/mL dans le THF, volume injecté 30 $\mu\text{L}$  [44].

Les séparations obtenues avec des colonnes particulaires présentent de moins bonnes performances que celles obtenues avec des colonnes monolithiques. Des analyses ont été réalisées avec des pentes de gradient plus élevées et des débits plus rapides (20 mL/min). Dans ces conditions, les colonnes monolithiques donnent de meilleurs résultats : conservation

des propriétés séparatives (résolution, efficacité) et faibles pression en tête de colonne. Ainsi, les colonnes monolithiques apparaissent bien adaptées aux séparations rapides de par leur structure poreuse en réseau.

Leur développement s'est accéléré ces dernières années, et notamment en ECC. Allier les avantages du FEO, c'est-à-dire un front plat d'écoulement, aux performances structurales des monolithes permet d'obtenir des séparations électrochromatographiques plus performantes et adaptables directement aux microsystèmes. Les premiers travaux développés en ECC avec des phases monolithiques [45-47] ont nécessité d'adapter la composition du mélange de monomères afin que le monolithe produit puisse générer un FEO, c'est-à-dire qu'il comporte une surface chargée. Ce type de phase stationnaire est particulièrement bien adapté à l'ECC, d'ailleurs c'est avec cette technique que les monolithes produisent leurs meilleures performances séparatives, donnant des hauteurs de plateaux minimales de moitié par rapport à leur utilisation en CPL, comme illustré Figure 6.

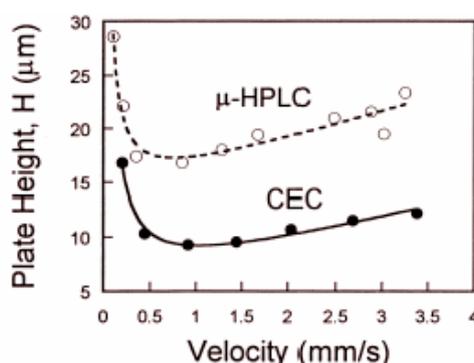


Figure 6 : Courbes de van Deemter pour l'alcool benzylique. Les données ont été obtenues à partir de la même colonne : 75  $\mu\text{m}$  x23/33 cm, particules de Zorbax-ODS 6  $\mu\text{m}$ , 80 Å. En ECC, injection 5kV, 1sec. En micro-CPL, injection 5 $\mu\text{L}$ . Phase mobile acétonitrile- tampon borate 10 mM, pH=8 (80:20 (v/v) Détection à 214 nm [48].

### 3. 2 Description des principaux types de matériaux monolithiques

Les colonnes monolithiques peuvent être fabriquées selon plusieurs modes de synthèse et différents groupements fonctionnels peuvent être employés. Il est possible de différencier les colonnes monolithiques inorganiques des colonnes organiques, chacune pouvant être réalisée par plusieurs méthodes.

#### 3. 2. 1 Monolithes inorganiques

Les colonnes monolithiques à base de phases particulières de silice présentent l'avantage d'utiliser une grande diversité de phases stationnaires bien caractérisées avec un bon choix de fonctionnalités disponibles. De plus, les procédures de modification de surface et de

fonctionnalisation des ces phases après remplissage sont directement issues des protocoles décrits pour des colonnes particulières [35].

### 3. 2. 1. 1- Colonnes monolithiques à base de particules immobilisées

L'immobilisation de particules dans un capillaire par diverses méthodes permet de combiner les avantages des phases particulières au niveau séparatif : une distribution poreuse bien définie, une proportion importante de phase, de hautes efficacités, tout en évitant l'étape aléatoire de la fabrication de frittés et donc un risque moins important de formation de bulles. Plusieurs méthodes ont été utilisées pour réaliser ces colonnes.

#### (i) Immobilisation thermique de particules :

Cette technique consiste en un remplissage du capillaire de particules, en plusieurs rinçages successifs, par une solution d'hydrogénocarbonate de soude puis par de l'eau et enfin de l'acétone. Une étape de séchage a lieu afin d'éliminer l'eau liée aux particules puis la température est fortement augmentée pour pouvoir effectuer la réaction de fusion. Ainsi, l'hydrogénocarbonate et l'eau résiduelle dissolvent partiellement la silice et l'agglomération se poursuivra à haute température en créant des liens entre les particules de phases stationnaires et avec la paroi comme présenté sur la Figure 7 [48].

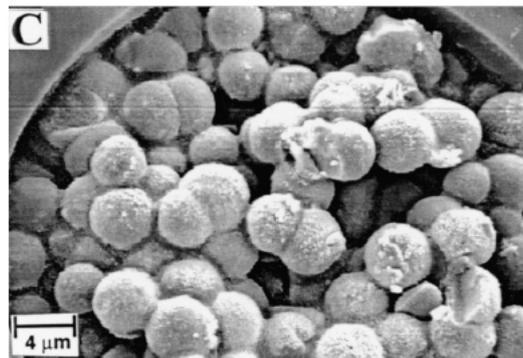


Figure 7 : Images MEB de monolithes à base de particules fondues à 360 °C avec du bicarbonate de soude [48].

Cette méthode permet donc d'obtenir une structure monolithique à partir de particules. Cependant, la température doit être bien contrôlée afin de permettre l'agglomération de la silice tout en évitant de perdre ses caractéristiques poreuses. La nature de la phase stationnaire a une influence au niveau de la quantité d'eau résiduelle qu'elle peut contenir, provoquant des ruptures du monolithe en formation par dégagement brusque de vapeur, lors de l'étape de fusion. Ces colonnes présentent donc de plus faibles stabilités et reproductibilités de leurs

caractéristiques rétentives. De plus, les greffons de la phase stationnaire sont partiellement détruits lors de la réaction de fusion ce qui implique de réaliser des désactivations et des fonctionnalisations post-réactionnelles. C'est pourquoi cette technologie de phase stationnaire ne semble pas encore suffisamment performante et nécessite quelques améliorations pratiques afin d'être intéressante.

Une autre méthode développée sur les mêmes principes consiste à immobiliser les particules par un traitement hydrothermique via un anneau chauffant [49]. Plus précisément, une fois le capillaire rempli, il est soumis sur toute sa longueur et en présence d'eau à l'action d'un anneau chauffant. Une fois la réaction finie, les particules non soudées sont éliminées. Le processus met en jeu des réactions de fusion partielle de la silice, avec des températures imposées comprises entre 300 et 400 °C. Cette méthode nécessite l'optimisation de la vitesse de déplacement de l'anneau, de sa température ainsi que du nombre de fois où l'opération est répétée. Les colonnes obtenues de cette manière présentent une grande stabilité et de bonnes performances chromatographiques et le processus de fabrication semble moins problématique que celui décrit précédemment.

#### (ii) Immobilisation des particules par formation de liaisons (nano-glue) ou piégeage

Plusieurs procédés ont été développés permettant d'obtenir des phases stationnaires monolithiques à base de particules et de matrice poreuse maintenant ces particules dans la colonne par immobilisation ou piégeage [50-52]. Les étapes de cette méthode comprennent, tout d'abord, un remplissage classique d'un capillaire par des particules de silice, suivi d'un séchage, auquel fait suite le remplissage du capillaire par une solution de piégeage. Puis la réaction de polymérisation de la matrice est initiée, lorsque cette réaction est terminée une étape de séchage lent est effectuée. Divers types de matrice ont été développés, à base de silicates, d'alkylsilanes ou de méthacrylates. Les particules de silice sont liées par le polymère tout en laissant la majeure partie des greffons de la phase stationnaire intacte. C'est pourquoi on parle aussi de nano-glue, il s'agit donc d'une méthode d'immobilisation douce de particules par une matrice. Ce type de phase stationnaire monolithique donne généralement le même niveau d'efficacité que des phases stationnaires particulières possédant les mêmes fonctionnalités, tout en évitant les problèmes liés à la présence et à la fabrication de frittés. Néanmoins, le principal inconvénient de ces phases réside dans leur long temps de préparation, dû principalement à l'étape de séchage après synthèse. C'est l'étape cruciale car c'est à ce moment que des forces de tension peuvent intervenir et provoquer des fissures de la

structure monolithique. La Figure 8 présente la séparation de HAP sur une colonne remplie de particules immobilisées par des frittés (A) ou par une matrice (B) en ECC. Les performances de ces deux types de phases stationnaires sont assez similaires, bien que la phase immobilisée présente une légère coélution entre les pics 4 et 5 et de moindres efficacités.

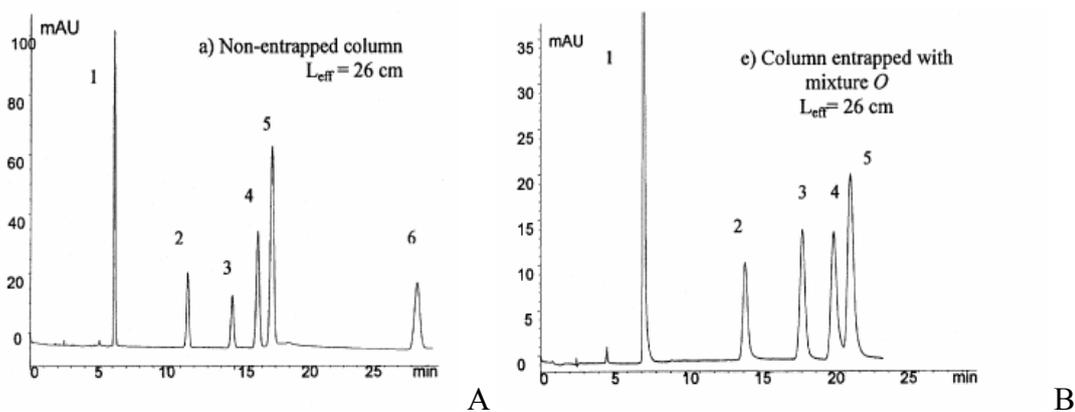


Figure 8 : Séparations d'un mélange de HAP obtenu en ECC sur une colonne remplie de particules (A) et sur une colonne remplie de particules immobilisées (B). Phase mobile : acétonitrile –tampon acétate, 10 mM, pH = 3 (80:20, v/v). Composés : (1) acétone, (2) naphthalène, (3) fluorène, (4) phénanthrène, (5) anthracène, (6) chrysène [51].

Il est aussi possible de procéder au remplissage du capillaire par une suspension de particules dans une solution sol [53]. Leur immobilisation est soit physique, par piégeage dans la matrice, soit chimique, par liaisons entre les fonctions silanol de la matrice sol-gel et celles des particules, ou celles des parois du capillaire. Cette approche présente l'intérêt d'obtenir un monolithe tout en gardant les performances séparatives de la phase stationnaire utilisée, comme dans le cas précédent. Néanmoins, les performances obtenues sur ces colonnes sont assez faibles car elles présentent souvent des craquelures entre les particules et la matrice de sol-gel, ou car l'inclusion des particules dans cette matrice est trop importante pour pouvoir participer aux mécanismes séparatifs.

### 3. 2. 1. 2-Colonnes monolithiques obtenues *in situ* par le procédé sol-gel

#### (i) Description et principe

La synthèse d'un sol-gel à l'intérieur d'un capillaire de silice comporte une première étape de prétraitement de la surface du capillaire afin d'attacher par la suite le monolithe aux parois. Ce prétraitement a pour but d'augmenter le nombre de groupements silanol à la surface du capillaire et donc les possibilités de liaisons entre les fonctions situées sur la paroi et le monolithe en formation. Le procédé sol-gel consiste à préparer une solution sol qui va subir

une polycondensation hydrolytique entraînant la formation d'un gel, c'est-à-dire d'un réseau continu et poreux. Les précurseurs de cette synthèse sont généralement des alcoxysilanes car ils sont très réactifs en présence d'eau, et les plus utilisés sont des alcoxysilanes tels que le tétraméthoxysilane (TMOS) ou le tétraéthoxysilane (TEOS). Une solution sol typique [54,55] se compose d'un précurseur (un alcoxysilane) d'un mélange de solvants porogènes (oxyde de poly(éthylène) PEO ou poly(éthylène) glycol (PEG) dans de l'eau) et d'un catalyseur adapté, comme un acide. La réaction de gelation a ensuite lieu à une température et pendant un temps donnés. Puis la colonne est traitée à une température plus élevée, 120°C, pour achever la formation des mésopores grâce à l'ammoniac libérée par l'hydrolyse de l'urée. Ensuite, après évaporation et séchage du monolithe, un traitement à chaud (300°C) est réalisé. Toutes ces étapes de traitement post-synthèse de la colonne sont incluses sous la dénomination étape de vieillissement du sol-gel. Elles procèdent par des réactions de dissolution-précipitation d'une partie des composés, stabilisant et rigidifiant ainsi la structure obtenue [56]. Ces colonnes sont disponibles commercialement, elles sont développées et produites par Merck sous le nom de Chromolith pour la CPL. Leurs performances sont très intéressantes en micro/nano-chromatographie

#### (ii) Processus réactionnels et paramètres influant sur la structure du sol-gel

Les principales réactions impliquées dans cette synthèse ont été décrites dans la partie 2. 1. 3. Brièvement, après l'hydrolyse de précurseurs, des réactions de polycondensation alcoolique et aqueuse de ces précurseurs hydrolysés se produisent. Ces réactions de polycondensation et d'hydrolyse ont lieu en parallèle dans l'ensemble de la solution et forment des oligomères. Ces oligomères croissent jusqu'à qu'ils se rencontrent et se lient ensemble. Le point de gelation est atteint lorsqu'un seul groupe se développe dans toute la solution sol. Ensuite les autres groupements de polymères encore en solution peuvent se combiner au réseau en formation [57,58]. Les propriétés structurales d'un sol-gel peuvent être modifiées par un grand nombre de facteurs : pH, température et durée de la réaction, concentration et rapport des précurseurs et des solvants, nature du catalyseur. En contrôlant l'ensemble de ces facteurs, il est possible d'adapter les propriétés du monolithe, notamment la distribution de la taille des pores, mais aussi de maîtriser la cinétique des réactions de polycondensation et donc de maîtriser le point de gelation. Il est également possible d'incorporer des additifs dans la solution sol afin d'influer sur le processus de gelation, par exemple des polymères solubles dans l'eau ou des surfactants vont fournir une séparation de phase plus précoce et des pores de

taille plus importantes [56,59]. La Figure 9 illustre le réseau tridimensionnel typique d'un monolithe obtenu en capillaire par le procédé sol-gel.

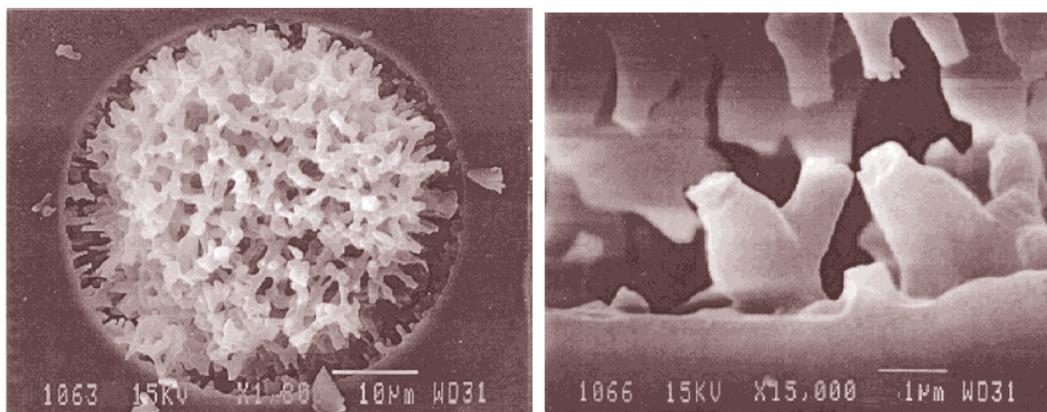


Figure 9 : Images MEB d'un monolithe de silice préparé par la méthode de sol-gel à deux grossissements [60].

(iii) Diversité des groupements fonctionnels des précurseurs, modification des fonctionnalités de surface

Il existe deux alternatives pour obtenir des fonctionnalités de phases stationnaires adaptées aux analyses. La première est de réaliser des fonctionnalisations post-synthèse, la seconde consiste à modifier la composition du mélange de précurseurs, modifiant ainsi la fonctionnalité du monolithe résultant. Ainsi, d'autres précurseurs ont été associés au TMOS dans la solution sol, comme le C<sub>18</sub>-TMS (chlorure de N-octadécyldiméthyl[3-(triméthoxysilyl)propyl] ammonium) [60]. Ce précurseur présente deux spécificités : une chaîne octadécyle et un groupement chargé positivement. Lorsque plusieurs précurseurs interviennent dans une solution sol, les réactions de polycondensation ont lieu de manière aléatoire entre tous les précurseurs. Les monolithes fabriqués à partir de ce mélange vont ainsi présenter un flux électroosmotique anodique ainsi que des interactions chromatographiques de type hydrophobe plus marquées. Un autre composé intervient ensuite dans l'inversion du flux en désactivant les fonctions silanol du réseau : le phényldiméthylsilane. La Figure 10 présente les performances séparatives de composés tests, des dérivés benzéniques, sur des colonnes monolithiques obtenues par procédé sol-gel. La séparation est réalisée en ECC en moins de 20 minutes, et les efficacités sont de l'ordre de 160 000 plateaux/m.

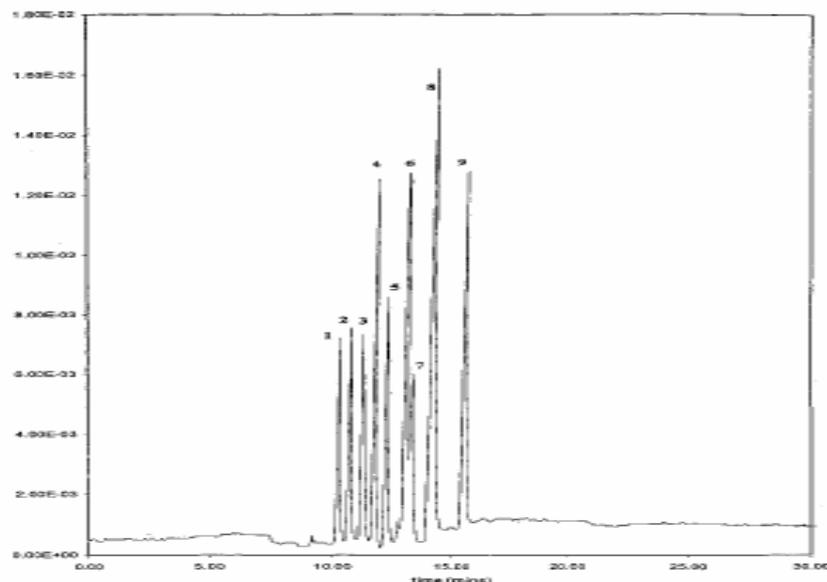


Figure 10 : Séparation d'un mélange de dérivés benzéniques sur une colonne monolithique contenant des groupements octadécyle, en moins de 20 minutes. Dimension de la colonne : 50 cm x 50  $\mu$ m de diamètre interne, longueur effective : 46,1 cm. Injection : -12kV, 6sec. Analyse à -15 kV. Phase mobile : acétonitrile - tampon Tris-HCl à 5mM, pH = 2,34 (75:25, v/v). Composés : (1) thiourée, (2) benzaldéhyde, (3) benzène, (4) toluène, (5) éthylbenène, (6) propylbenzène, (7) biphényle, (8) butylbenzène, (9) pentylbenzène [60].

Allen et al. ont étudié deux procédures de modification de la surface des monolithes par des réactions post-synthèse [61] permettant de greffer à la surface du monolithe des groupements cyanure ou hydroxyle. La phase stationnaire présente ainsi une certaine hydrophilie permettant d'augmenter la rétention de composés polaires et de réaliser ainsi de meilleures séparations en mode phase normale, comme par exemple la séparation du toluène, du diméthylformamide, du formamide et de la thiourée en moins de deux minutes avec des efficacités de 200 000 plateaux/m. La mise en œuvre de ce type de monolithe a aussi permis la séparation de composés en ECC tels que des acides nucléiques, des dérivés monosaccharidiques... Chen et al. procèdent aussi par modification chimique de la surface du monolithe pour obtenir une phase comportant des groupements L-phénylalaninamide permettant de séparer des énantiomères d'acides aminés [62]. Une autre approche porte sur l'encapsulation de protéines par réalisation d'un monolithe utilisant les procédés sol-gel. Le gel à base précurseur du TMOS encapsule les protéines chirales en imposant des processus et des conditions réactionnels moins dénaturants [63].

#### (iv) Sol-gel photopolymérisables

Le procédé sol-gel est thermosensible, la température étant un paramètre qui influe sur la structure du monolithe obtenu. Néanmoins une nouvelle approche a été mise au point dont le

mécanisme repose sur la photopolymérisation [64]. La solution sol consiste en une solution acide de méthacryloxypropyltriméthoxysilane (MPTMS) à laquelle on rajoute un photoinitiateur et du toluène. Ensuite le capillaire rempli est exposé aux radiations UV à 365 nm. Ces monolithes présentent de bonnes caractéristiques séparatives dont les efficacités de composés tests, des HAPs, sont en moyenne de 100 000 plateaux/m. Ces monolithes ont été utilisées pour de la préconcentration en ligne de composés tests (des HAPs, des cétones alkylées ou phénylées), suivie de leur séparation. Des facteurs de préconcentration compris entre 100 et 1000 ont été obtenus [65,66]. Il faut néanmoins noter que la dénomination sol-gel n'est pas très appropriée dans ce cas. En effet, les monomères comportent des groupements silane et méthacrylates mais le processus de polymérisation met en jeu les groupements fonctionnels méthacrylate et non les groupements fonctionnels silane, qui restent disponibles pour réaliser des interactions avec les solutés. Il s'agit alors d'un matériau hybride, inorganique et organique.

### *3. 2. 2 Monolithes organiques réalisés in situ*

Les monolithes organiques présentent une grande diversité de fonctionnalités de phase stationnaire dû à la large gamme de monomères disponibles. Le monolithe est créé à partir d'un mélange à polymériser constitué de trois principaux constituants : des monomères dont un agent réticulant, des solvants porogènes et un initiateur de la polymérisation. La méthode de polymérisation la plus employée utilise le processus de polymérisation radicalaire, mais un autre processus de polymérisation peut également être mis en oeuvre : la polymérisation par métathèse et ouverture de cycles.

#### 3. 2. 2. 1-Monolithes obtenues par métathèse et ouverture de cycles

Cette méthode de polymérisation est basée sur l'utilisation d'initiateurs à base de métaux de transition permettant de catalyser et de maîtriser la réaction de polymérisation [67-69]. Ce type de polymérisation dite « vivante » est en plein essor, grâce à la maîtrise grandissante de systèmes catalytiques actifs et sélectifs. Il est ainsi possible de maîtriser la cinétique, la structure et les propriétés du polymère. Les types d'initiateurs les plus utilisés sont les catalyseurs de Grubbs, à base de ruthénium et dont la formule générale est la suivante :  $\text{Cl}_2(\text{PR}_3)_2\text{Ru}(\text{=CHPhényl})$ . Le choix de la chimie de l'initiateur est crucial pour l'obtention d'un système de polymérisation bien défini, c'est-à-dire contrôlant l'avancement de l'étape d'initiation et de l'étape de propagation. Les monomères classiquement employés dans ce type de synthèse sont du type norborène, norbordiène et dicyclopentadiène. On trouve

d'autres monomères disponibles permettant de varier les propriétés rétentives des colonnes synthétisées. Ce type de polymère poreux peut d'ailleurs être fonctionnalisé. Des solvants porogènes sont aussi nécessaires, le 2-propanol et le toluène étant les plus employés. La variation d'un paramètre ayant trait au mélange à polymériser va se traduire par des variations de la structure du monolithe, comme pour tous les autres types phases stationnaires monolithiques. Une des particularités de ces monolithes est leur teneur en métaux due au type d'initiateur employé. Pour éviter des interactions non souhaitées entre les solutés et la phase stationnaire, les métaux doivent être éliminés ou masqués. Le moyen adopté consiste à masquer les métaux de transition par de l'éther éthylvinyle.

Etant donné que la majeure partie de l'initiateur se situe à la surface du monolithe en fin de polymérisation, un rinçage prolongé de la colonne avec le monomère fonctionnel permet de le greffer directement et simplement à sa surface. L'importance de la réaction de greffage dépend de la réactivité du monomère à greffer avec l'initiateur choisi lors du processus de polymérisation par métathèse et ouverture de cycle. Des applications ont été développées sur des composés biologiques [70,71], ainsi que sur composés chiraux [72]. Ce type de polymérisation permettrait d'obtenir un meilleur contrôle des processus de polymérisation, comparé à la polymérisation radicalaire. Cependant l'utilisation de ce processus et de cette chimie reste plus confidentielle car plus récente et plus complexe, donc moins étudiée. Par ailleurs cette technologie de colonne a été plus développée en CPL qu'en ECC, où la fonctionnalisation du polymère devient alors nécessaire pour obtenir une surface chargée capable de générer un FEO.

### 3. 2. 2. 2-Phases stationnaires obtenues par polymérisation radicalaire

Cette forme de polymérisation est la plus développée et comporte plusieurs types de monomères disponibles et modes de synthèse, chacun ayant ses spécificités, ses avantages et ses limitations.

#### (i) Colonnes monolithiques à base de polystyrène-divinylbenzène (PS-DVB)

La fabrication de ces colonnes monolithiques est simple et bien décrite. Leur synthèse peut avoir lieu dans des colonnes de taille très variée. Le mélange à polymériser contient comme monomères le styrène et le divinylbenzène, des solvants porogènes tels que le toluène et l'AIBN (2,2'-azo-bis-isobutyronitrile) comme initiateur. La réaction de polymérisation est thermiquement induite et elle a lieu généralement à 70°C pendant 24 h (Figure 11).

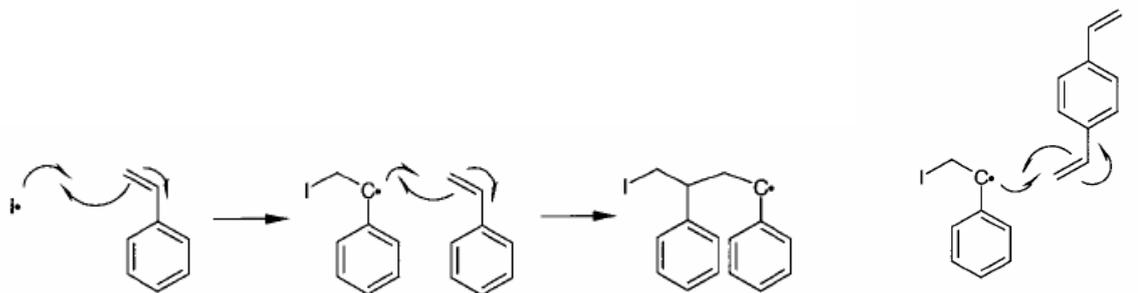


Figure 11 : Schéma réactionnel des différentes étapes de la réaction de polymérisation entre les monomères de styrène et de divinylbenzène : réaction du radical  $I\cdot$  fourni par l'initiateur, propagation en chaîne et réticulation [58].

Pour ce type de phase stationnaire, la synthèse est simple de mise en œuvre et produit de bonnes performances séparatives associées à une bonne stabilité sur une large gamme de pH mais elle ne permet pas de localiser la zone de polymérisation car celle-ci se produit selon un mécanisme d'initiation thermique. Après quelques développements [33,73,74], cette classe de monolithe a été utilisée au format capillaire et des applications ont été développées en micro ou nano-CPL [75-77] ou en ECC [78,79]. Leurs performances sont intéressantes et la Figure 12 en donne une illustration.

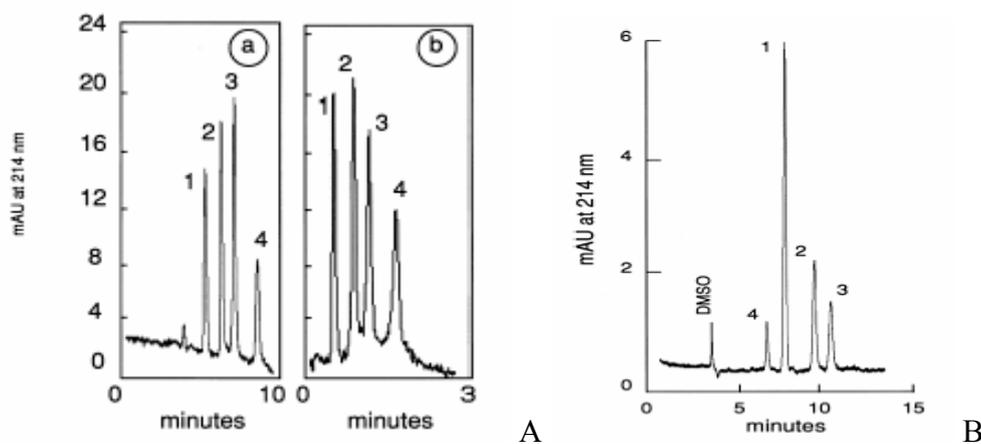


Figure 12 : (A) Chromatogrammes obtenus en micro-CPL sur une colonne monolithique de PS-DVB de dimension  $75\ \mu\text{m} \times 27/38\text{cm}$ . Phase mobile : gradient linéaire de 20 à 75% d'acétonitrile dans l'eau contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique. Echantillon : (1) ribonucléase, (2) cytochrome c, (3) lysosyme, (4)  $\beta$ -lactoglobuline B chacune à 1 mg/mL dans le tampon. (a) débit :  $0,34\ \mu\text{L/s}$  ; (b) débit :  $1,5\ \mu\text{L/s}$ . (B) électrochromatogramme de polypeptides acides et basiques. Même conditions qu'en (A) pour la phase mobile. Tension : -15 kV. Echantillon : (1) angiotensin II, (2) angiotensin I, (3)  $[\text{Sar}^1\text{-Ala}^8]$ -angiotensin II et (4) insuline, chacun à 4mg/mL dans le tampon [78].

Ces phases stationnaires monolithiques sont commercialisées au format capillaire pour la nano-CPL par LC-Packing. Ce type de monolithe a aussi été utilisé en ECC. Pour cela, le monolithe doit pouvoir générer un FEO ; des modifications du mélange réactionnel ont donc

été menées dans ce but et des phases chargées négativement et positivement ont pu être développées[78,80].

### (ii) Colonnes monolithiques à base de polyacrylamide

Ces monolithes sont obtenus par polymérisation d'une solution comprenant : des monomères, (acrylamide, piperazine diacrylamide), un agent réticulant (N,N'-méthylènebis(acrylamide)) et l'acide vinylsulfonique pour générer un FEO. Un monomère plus hydrophobe peut aussi être ajouté au mélange, le butylméthacrylate par exemple. La polymérisation de ce type de mélange est initiée par un système de catalyseur composé de persulfate d'ammonium et de TEMED (N,N,N',N'-tétraméthylènediamine). Brièvement le TEMED dissocie le persulfate d'ammonium et produit deux radicaux persulfate par des réactions rédox. Une fois le mélange à polymériser introduit dans le capillaire, la réaction de polymérisation symbolisée Figure 13 a lieu à température ambiante pendant la nuit.

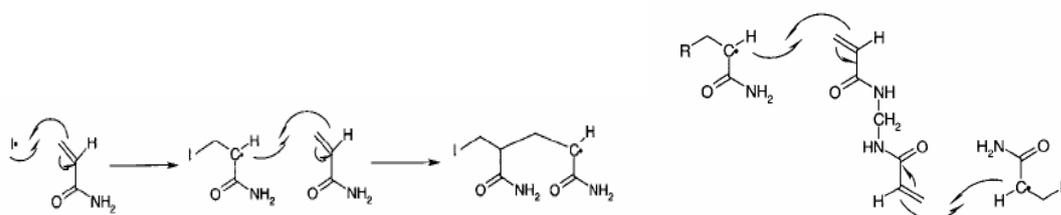


Figure 13 : Schéma réactionnel des différentes étapes de la réaction de polymérisation entre les monomères d'acrylamide et de N,N'-méthylènebis(acrylamide) : réaction de l'initiateur, propagation en chaîne et réticulation [58].

De nombreuses applications ont été développées avec des fonctionnalités de phases variées. En effet, de nombreux monomères sont incorporables dans le mélange à polymériser et peuvent ainsi modifier les caractéristiques rétentes du monolithe résultant. Des colonnes présentant des interactions hydrophobes de type à polarité de phases inversée, d'échange d'ions, de type normal/partage, ou encore des interactions chirales ont ainsi été réalisées [74,81,82]. Les divers constituants du mélange à polymériser et les conditions de polymérisation influent sur la structure du monolithe résultant [83]. Ainsi, une augmentation de la température conduit à des tailles de pores plus importantes. Cette étude permet d'estimer l'importance des paramètres réactionnels. Des fonctionnalisations post-synthèse ont aussi été effectuées permettant notamment d'obtenir une phase stationnaire présentant à sa surface un groupement chiral [84]. Les principales applications développées sur ce type de phases stationnaires concernent des séparations de protéines et de peptides [73,85]. La Figure 14

présente une séparation très rapide, d'une durée inférieure à 100 secondes, de cinq protéines sur ce type de colonne monolithique, obtenue en micro-CPL. La phase a été dérivée après synthèse afin d'obtenir une surface plus hydrophobe.

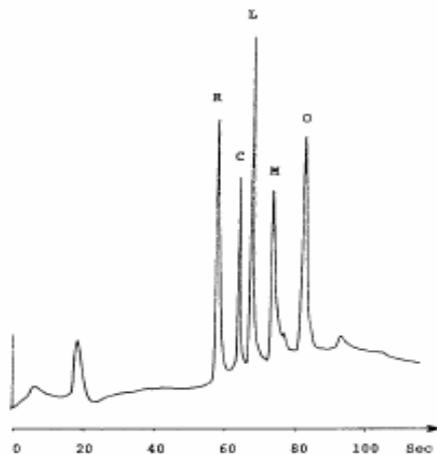


Figure 14 : Séparation de 5 protéines standard par micro-CPL sur une colonne monolithique à base de polyacrylamide (0,32 mm x 106 mm). Phase mobile : gradient de 10 à 70% d'acétonitrile dans l'eau contenant 0,1% de TFA. Débit de 100  $\mu$ L/min, pression en tête de colonne de 36 bars. Echantillon : (R) ribonucléase, (C) cytochrome c, (L) lysosyme, (M) myoglobine, (O) ovalbumine [73]

Par ailleurs, des monolithes à base de polyacrylamide adaptés à l'analyse de petites molécules aromatiques ont aussi été préparés avec des efficacités obtenues comprises entre 120 000 et 150 000 plateaux/m [73,82]. D'autres équipes ont obtenu avec ces mêmes phases des efficacités très élevées, de l'ordre de 300 000 plateaux/m, pour des alkylphénones [86].

### (iii) Phases monolithiques à base de (méth)acrylates

Cette technologie de colonne a été introduite par Svec et Fréchet au début des années 1990 [36]. Leur réalisation est très simple de mise en œuvre. Tout d'abord, une étape de prétraitement du capillaire peut intervenir mais elle n'est pas réalisée systématiquement. Ce point sera abordé plus précisément dans le chapitre suivant. Ensuite, le mélange à polymériser est préparé et comprend un mélange de monomères d'esters (méth)acryliques (le glycidylméthacrylate par exemple), un agent réticulant (l'éthylène diméthacrylate classiquement) et un mélange de solvants porogènes. Les solvants les plus utilisés sont : du cyclohexanol, dodécanol, propanol, méthanol ou acétonitrile. L'initiateur radicalaire est généralement l'AIBN ou une benzophénone, et est aussi inclus dans le mélange à polymériser. Une fois le capillaire rempli par le mélange, deux modes d'initiation sont donc possibles : soit une photopolymérisation, soit une polymérisation initiée thermiquement, en

fonction du type d'initiateur choisi. Les réactions de polymérisations décrites dans la Figure 15 n'en sont pas affectées.

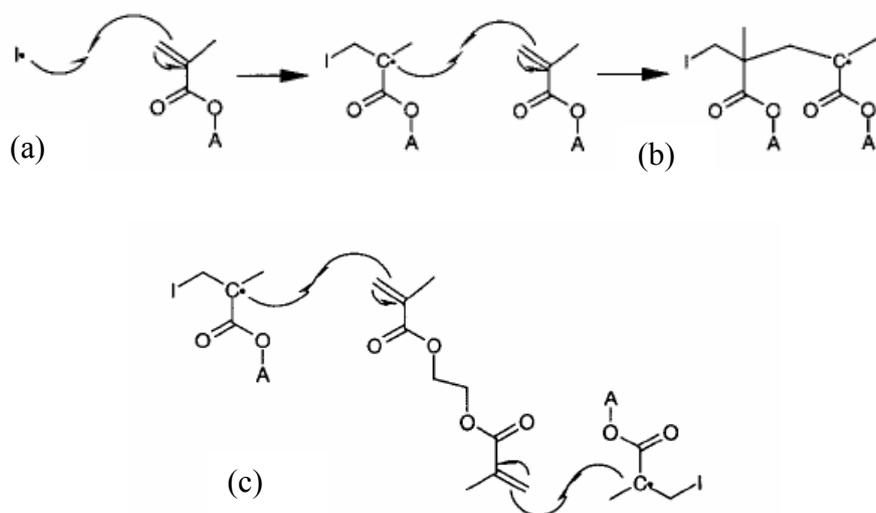


Figure 15 : Schéma réactionnel des différentes étapes de la réaction de polymérisation entre les monomères de méthacrylates et d'éthylène diméthacrylate, réaction de l'initiateur (a), propagation en chaîne (b) et réticulation (c) [58].

Le monomère glycidylméthacrylate est souvent utilisé du fait de sa fonction époxyde réactive qui permet de fonctionnaliser le monolithe après sa synthèse. D'autres monomères possèdent aussi des fonctions très réactives (azlactones) permettant de modifier les groupements fonctionnels du monolithe. La synthèse de ces phases ne présente pas d'étape de séchage ou de vieillissement contrairement aux phases obtenues par le procédé sol-gel. Le monolithe ne présente donc pas de fissures et semble moins fragile. L'intérêt majeur de cette technologie de colonne est de présenter un mode d'initiation photochimique, qui permet de localiser le polymère dans une partie choisie d'un capillaire ou d'un canal.

Cette technologie de phase stationnaire monolithique est en plein essor et de nombreux groupes de recherche, dont celui de Svec et Fréchet, se sont intéressés à son développement tant au niveau de la diversité des fonctionnalités de phases disponibles qu'au niveau des performances analytiques [36,39,41,43,80,83,87-116]. La Figure 16 présente les performances d'une séparation type d'un mélange test, obtenue sur une colonne monolithique à base de méthacrylates (EDMA-BMA) en ECC.

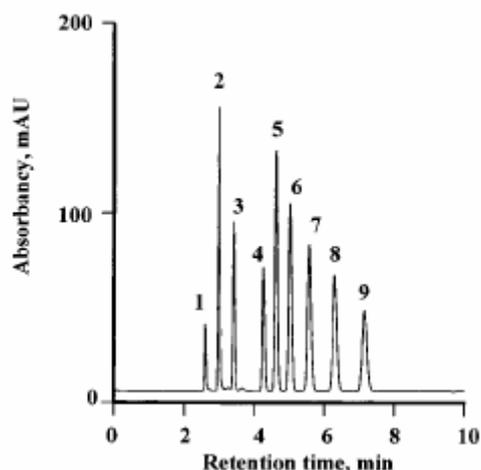


Figure 16 : Electrochromatogramme d'un mélange de dérivés benzéniques sur colonne monolithique. Colonne de 100  $\mu\text{m}$  x 25cm de longueur utile. Phase mobile : acétonitrile-tampon phosphate 5mM, pH = 7 (80:20, v/v). Tension : 25 kV. Injection 5 kV, 3 sec. Détection UV à 215 nm. Composé à 2mg/mL chacun : (1) thiourée, (2) alcool benzylique, (3) benzaldéhyde, (4) toluène, (5) éthylbenzène, (6) propylbenzène, (7) butylbenzène, (8) pentylbenzène [91].

Ces phases sont commercialisées pour la CPL sous forme de colonne ou sous forme de disques par la société Bia separations. Cependant, le format capillaire n'est pas disponible.

### 3.3 Phases monolithiques adaptées à l'ECC

Les divers types de monolithes décrits dans le paragraphe précédent peuvent être employées en ECC, moyennant parfois quelques modifications des procédés de fabrication. Cependant certaines technologies sont plus largement utilisées car plus performantes ou plus simples de mise en œuvre. Ainsi, les phases monolithiques inorganiques à base de particules immobilisées ne présentent pas d'avantages suffisants pour permettre leur développement en ECC au regard de leurs inconvénients. Les deux types de phases les plus employées sont les phases stationnaires monolithiques à base de sol-gel et celles à base de monomères organiques.

#### 3.3.1. Les phases utilisant le procédé sol-gel

Les monolithes inorganiques à base de sol-gel présentent des performances séparatives très intéressantes : rapidité des analyses, efficacités élevées, possibilités de modifier les fonctionnalités du monolithe après synthèse [57]. Par ailleurs, le FEO est directement généré par les groupements silanol résiduels de la phase stationnaire. De nombreux travaux ont été menés sur ces phases utilisées en électrochromatographie [57]. Des sol-gels apolaires ont ainsi été mis au point par greffage d'octadécylsilane après la synthèse du monolithe [60,117].

L'inversion du flux électroosmotique est réalisable par greffage d'un silane possédant un groupement cationique [60].

### *3. 3. 2. Les phases à base de monomères organiques*

Les monolithes organiques possèdent tous des propriétés de perméabilité modulables et des efficacités très élevées, ce qui les rend très attractifs. Les monolithes organiques à base d'acrylamides ou de (méth)acrylates peuvent être obtenus en incorporant un monomère chargé dans le mélange réactionnel de manière à générer un FEO lors de l'application d'un champ électrique, ce qui permet de les adapter à l'ECC aisément. Cependant il n'en va pas de même pour les monolithes à base de PS-DVB. En effet, il faut remplacer un des monomères constitutifs du mélange, le polystyrène, par le chlorure de vinylbenzène (VBC). Le monolithe obtenu est ensuite fonctionnalisé par une amine tertiaire afin d'obtenir un ammonium quaternaire donnant une structure dont la surface est chargée positivement quel que soit le pH de la phase mobile [78]. Ce protocole de synthèse possède des inconvénients sérieux : deux étapes sont nécessaires à l'obtention d'une colonne analytique et la modification du protocole de base nécessitant d'optimiser les rapports de chacun des constituants du mélange réactionnel. C'est pourquoi ce type de monolithe organique est très peu utilisé en ECC.

Les deux autres types de monomères, cités précédemment, sont couramment employés en ECC, et de nombreuses adaptations des fonctions des monolithes ont été envisagées pour cette technique permettant de diversifier les types d'interactions mis en jeu, ainsi que des applications sur des composés très divers.

## **3. 4 Comparaison des technologies de colonne en ECC et choix retenu**

Chacune des technologies de phases stationnaires décrites précédemment pour l'ECC ne sont pas équivalentes. Ainsi, certaines présentent de réelles difficultés de mise en œuvre comme les phases particulières qui demandent une grande expérience, un savoir-faire certain et manquent de fiabilité et de reproductibilité, les résultats étant soumis à la qualité du remplissage des colonnes. Cette technologie déjà délicate à mettre en place en capillaire, est très difficile à transposer aux microsystèmes. Les technologies de phases en tube ouvert présentent peu de difficultés de synthèse mais ont des inconvénients analytiques majeurs, comme les faibles volumes de phase stationnaires comparés aux volumes de phase mobile ne permettant pas d'établir des échanges suffisants entre les solutés et la phase stationnaire. Les inconvénients, inhérents à cette technologie, sont identiques pour le format microsystème.

Les monolithes à base de particules immobilisées présentent les mêmes inconvénients de préparation et de séparation que les phases particulières. Leur processus d'obtention en capillaire n'est donc pas facilement transposable au format microsysteme et leurs performances séparatives ne sont pas suffisantes pour les préférer. La technologie des phases monolithiques sol-gel et polymériques présente des avantages importants au niveau de leur mise en œuvre ou de leur performances analytiques. Par ailleurs, elles disposent d'une grande diversité de types de monomères. Leur structure en forme de réseau tridimensionnel à perméabilité élevée, contribue à l'obtention de séparations rapides et efficaces. Ce format de phase stationnaire présente aussi une très bonne stabilité et ne nécessite pas l'utilisation de frittés, la procédure de remplissage se faisant en une seule étape.

Les phases monolithiques utilisant le procédé sol-gel sont simples de mise en œuvre et performantes analytiquement mais peuvent comporter des fissures dues aux processus de vieillissement des colonnes. Les monolithes à base de silice photopolymérisés semblent plus intéressants, du fait de leur mode de synthèse, car il est possible de contrôler l'emplacement et la longueur de la colonne dans un capillaire ou un microcanal. De plus ce procédé ne nécessite aucun traitement thermique à des températures élevées, ce qui limite le risque de fissure pour le matériau séparatif.

Les monolithes organiques présentent l'avantage d'être simples à réaliser et de disposer de plusieurs types de monomères, PS-DVB, acrylamide, (méth)acrylates. Il est aussi possible de fonctionnaliser la surface des monolithes et d'obtenir des colonnes spécifiques. Pour les deux premiers types de monolithes cités, la polymérisation a lieu dans l'ensemble du volume de la solution à polymériser, en d'autres termes il n'est pas possible de limiter cette réaction à une partie choisie de la solution en raison du mode d'initiation, thermique et rédox. Il n'y a donc pas de localisation de la synthèse possible pour ces deux modes contrairement aux monolithes à base de méthacrylates.

Les objectifs des travaux entrepris lors de cette thèse ont d'abord été le choix et la mise en place d'une technologie de phase stationnaire pour l'électrochromatographie et pour le développement d'analyses de composés environnementaux ou biologiques en capillaire en premier lieu, puis dans des microsystemes. La simplicité de mise en place d'une phase stationnaire ainsi que la possibilité de la localiser dans une partie du capillaire ou du canal ont été des éléments importants qui nous ont permis d'orienter nos choix. C'est pourquoi la technologie monolithique a été retenue et parmi toutes les chimies disponibles celles des

(méth)acrylates a été préférée. En effet le mode d'initiation par photopolymérisation ainsi que la stabilité des phases semblent tout à fait appropriés à nos exigences. Par ailleurs, les nombreuses fonctionnalités disponibles des monomères et les possibilités de modifier efficacement les fonctions de surface des monolithes obtenus, ont été déterminantes. Dans le paragraphe suivant nous détaillons les propriétés et caractéristiques de ces phases.

## 4. Phases monolithiques organiques photopolymérisées *in situ*

Les polymères macroporeux à base de méth(acrylates) sont obtenus par un processus de polymérisation initié thermiquement ou photochimiquement. Svec et ses collaborateurs ont d'abord développé et étudié l'initiation thermique en soulignant l'importance des proportions de chacun des constituants du mélange réactionnel sur les caractéristiques poreuses et les performances séparatives [36,87-90]. Lorsque l'initiation photochimique a été développée, le même type d'étude a été entrepris [90]. Les réactions de polymérisation photochimique sont beaucoup plus rapides que celles initiées thermiquement : moins d'une heure est nécessaire photochimiquement comparé à 6 voire 24h pour une initiation thermique.

### 4.1 Processus de polymérisation

Des polymères macroporeux ont été développés dans les années 50 en tant que matrice polymérique pour des résines échangeuses d'ions dans le but d'obtenir des billes présentant un bon compromis entre une bonne résistance mécanique et une accessibilité aisée des solutés aux sites actifs, condition nécessaire à des échanges rapides et donc à une efficacité élevée par rapport aux matériaux alors utilisés. Ces particules étaient obtenues par un processus de polymérisation en suspension qui a donné lieu à de nombreuses applications. En revanche, jusqu'au début des années 90, peu de travaux ont porté sur les polymères monolithiques macroporeux, obtenus par polymérisation dans un moule [87]. Ce dernier processus peut être assimilé à un mécanisme de formation de pores lors d'une polymérisation en présence d'un agent précipitant. D'une manière plus précise, la phase organique est constituée de monomères monovinyls ou divinyls, d'un initiateur et de solvants porogènes. L'initiateur de polymérisation radicalaire se décompose sous certaines conditions soit de température soit de longueur d'onde, en fonction du type d'initiation choisi. Les radicaux formés initient alors le processus de polymérisation en solution. Lorsque les polymères en croissance deviennent insolubles en solution, ceux-ci précipitent. Cette précipitation est provoquée par la réticulation des polymères en croissance et dépend fortement du choix des solvants porogènes en présence. Dans ce système, les polymères doivent être de meilleurs

agents solubilisants pour les monomères restants que les solvants. Ainsi, les espèces insolubles précipitées, les nuclei, se saturent en monomères qui se trouvent toujours dans la phase liquide environnante. Par conséquent la polymérisation se poursuit en solution et dans les nuclei. C'est cette dernière polymérisation qui est favorisée cinétiquement, de par la concentration plus importante des monomères dans ces nuclei. Néanmoins, les molécules de polymères plus ou moins réticulées formées en solution sont capturées par les nuclei en croissance augmentant la taille de ces derniers. Le caractère réticulé des nuclei les empêche de s'interpénétrer et permet au contraire d'augmenter leur taille par poursuite de la polymérisation jusqu'à se rassembler en petits groupes et à se relier par des chaînes de polymère lors de réactions de réticulation. Ces groupes restent dispersés dans la phase liquide alors riche en solvant inerte jusqu'à ce que leur taille soit suffisante pour qu'ils se rejoignent et se relient formant une matrice interconnectée comme un échafaudage polymérique. Cette architecture polymérique se renforce ensuite par réticulation entre les globules et par addition des chaînes polymériques en croissance dans la phase liquide conduisant enfin à la structure poreuse finale. La partie creuse du polymère est alors proche de la fraction volumique initiale en solvants porogènes du mélange à polymériser. Ces solvants restent prisonniers du polymère réticulé. L'état actuel des connaissances sur le mécanisme de formation des pores, dans ce type de polymérisation, ne permet pas de prévoir leur taille. Les moyens actuels de contrôler la taille des pores sont par conséquent principalement empiriques. Les caractérisations généralement mises en œuvre pour rendre compte des propriétés structurales du monolithe sont la porosimétrie au mercure, la microscopie électronique à balayage (MEB) et plus rarement les mesures de surface spécifique par BET.

## **4. 2 Influence des divers constituants du mélange sur la structure et les propriétés séparatives du monolithe**

De nombreuses études ont été menées sur l'importance des ratios de chaque constituant du mélange à polymériser sur les caractéristiques poreuses et sur les performances séparatives des monolithes obtenus [90,91,95,96,118].

### *4. 2. 1 Concentration en initiateur et conditions d'illumination*

La concentration en initiateur doit être optimisée pour obtenir un monolithe de structure suffisamment homogène. Ainsi pour des concentrations d'AIBN rapportées aux monomères inférieures à 0,5 % (g/g) par rapport aux monomères, les structures globulaires deviennent coalescentes et il arrive que la polymérisation n'ait pas lieu. Par ailleurs, à partir de 3 à 4 %

(g/g) des fissures sont observées dans la structure monolithique. La concentration optimale semble être aux alentours de 1,5 % (g/g) par rapport aux monomères. Les conditions d'illumination doivent être, elles aussi, adaptées au type d'initiateur choisi. Il faut ainsi adapter l'intensité lumineuse et la longueur d'onde d'illumination pour permettre un clivage photolytique optimal de l'initiateur [99].

#### *4. 2. 2 Influence du rapport des solvants porogènes*

Les effets des variations des proportions mutuelles en solvants porogènes ont été étudiés [47]. Prenons l'exemple de l'isooctane et du toluène [90]. L'isooctane joue ici le rôle de « mauvais diluant » pour le polymère en croissance, tandis que le toluène est un « bon solvant » pour le polymère. Il est ainsi possible de modifier la cinétique de précipitation des nuclei et donc la cinétique générale de la polymérisation en faisant varier le rapport de ces deux solvants. Ces modifications ont pour effet de modifier la structure des monolithes. Ainsi, une augmentation du pourcentage de toluène par rapport à celui de l'isooctane provoque une augmentation de la surface spécifique du polymère. De plus, une augmentation du pourcentage en « bon solvant » retarde la séparation des phases, il y a alors compétition entre la solubilité des monomères dans le solvant et dans les nuclei. La concentration en monomères dans ces nucléi est ainsi plus faible, et par conséquent leur augmentation de taille et le rassemblement des nucléi sont plus restreints. Il en résulte alors un plus grand nombre de petits globules et la distribution poreuse se déplace vers les plus faibles valeurs de taille de pores. L'augmentation du pourcentage en mauvais solvant provoque l'effet inverse, une taille de pore plus importante. Il est ainsi possible de contrôler la distribution poreuse d'un monolithe par modification du rapport des solvants porogènes. Ce contrôle de la taille des pores permet alors de jouer sur les caractéristiques du flux de phase mobile. La Figure 17 présente les distributions de la taille des pores déterminés par porosimétrie au mercure. Le maximum de la distribution augmente lorsque le pourcentage en 1-propanol diminue, celui-ci joue donc le rôle de bon solvant pour le polymère en croissance. Il est ainsi possible de choisir la porosité du monolithe et donc la vitesse linéaire de la phase mobile pour un même mélange de monomères en ajustant les proportions des solvants [95].

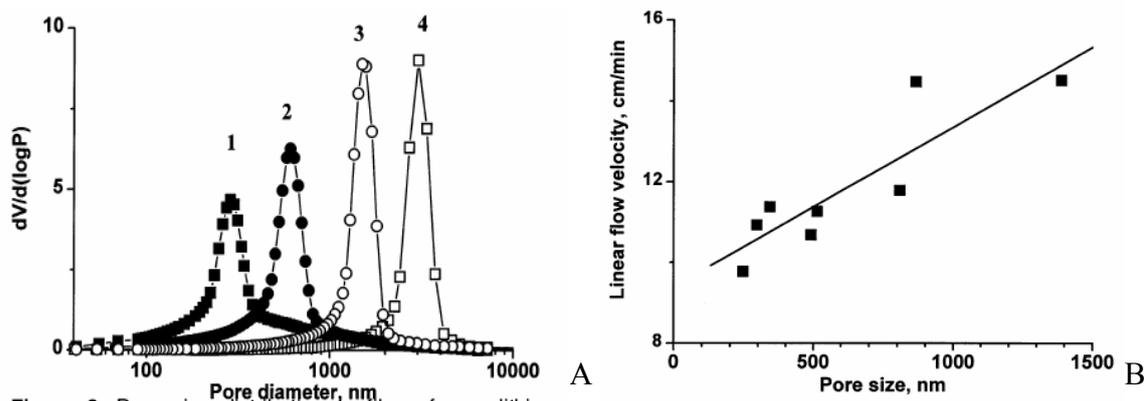


Figure 17 : (A) Profils de distribution de la taille des pores obtenus sur des colonnes monolithiques photopolymérisées à base de butylméthacrylate et d'éthylènediméthacrylate en fonction de la composition en solvants dans le mélange réactionnel. Les solvants porogènes utilisés sont le 1-propanol et le 1,4-butanediol. Pourcentage en 1-propanol : (1) : 80%, (2) 78%, (3) 76%, (4) 74%. (B) Effet du diamètre moyen des pores sur la vitesse linéaire de la phase mobile au travers des colonnes monolithiques capillaires en ECC, 100 $\mu$ m de diamètre interne x 28 cm. Phase mobile acétonitrile-tampon phosphate 5 mM, pH = 7, (75:25, v/v), pour une même tension. Marqueur de flux : thiourée [95].

#### 4. 2. 3 Influence du rapport entre les monomères et les solvants

Le pourcentage total en solvant porogène dans le mélange de polymérisation constitue aussi un paramètre nécessitant un ajustement car il détermine les caractéristiques du réseau poreux, c'est-à-dire la taille et le volume des pores. Ainsi, une diminution du pourcentage total en solvants porogènes du système provoque une diminution du volume poreux total et un déplacement du maximum de la distribution de la taille des pores vers des valeurs plus faibles. Une conséquence directe de cette diminution de la taille des pores consiste en une forte augmentation de la résistance à l'écoulement.

#### 4. 2. 4 Influence du pourcentage en agent réticulant

Les variations du pourcentage d'agent réticulant par rapport aux monomères provoquent en plus d'effets sur la porosité des effets sur la proportion des fonctionnalités chimiques du polymère [89]. En effet, ces deux types de monomères ne possèdent habituellement pas les mêmes types de fonctionnalités. Une augmentation du pourcentage en agent réticulant dans le mélange à polymériser conduit généralement à une séparation de phase plus précoce du polymère formé et à des pores plus larges. Néanmoins, des nuclei sont alors plus réticulés et présentent un moindre nombre de fonctions vinyloxy disponibles, si bien que leur augmentation en taille par inclusion de solvant ou de monomères est plus limitée. C'est pourquoi la taille finale des globules interconnectés reste relativement faible. De plus, comme les nuclei possèdent moins de fonctions vinyloxy disponibles, leur tendance à s'aggréger est moindre,

limitant alors l'élargissement supplémentaire des globules. Pour de fortes concentrations en agent réticulant dans le mélange à polymériser, l'influence des variations de pourcentage total en solvants apparaît moins forte sur le maximum de distribution poreuse. Cela vient du fait qu'un plus haut degré de réticulation restreint la formation de canaux et de pores de diamètres importants.

#### 4. 2. 5 Influence du pourcentage en monomère chargé

Etant donné que le FEO est directement proportionnel au potentiel zéta, lui-même dépendant de la densité de charge de surface, le FEO généré sur ces monolithes organiques dépend du nombre de groupements chargés à la surface de ceux-ci. Ainsi, des monolithes présentant des pourcentages croissants en monomère chargé ont été réalisés dans le but d'augmenter le FEO et donc réduire le temps d'analyse [91]. Le FEO est plus élevé pour des valeurs plus fortes du pourcentage en monomère chargé. Cependant, les performances séparatives des analyses se détériorent pour les fortes concentrations en monomère chargé, plus de 2%. L'augmentation du pourcentage en monomère chargé provoque une augmentation du FEO mais aussi une augmentation du diamètre des pores : on obtient alors un double effet de ce monomère sur l'importance du flux. Il faut donc ajuster ce paramètre pour obtenir un matériau séparatif optimal (environ 0,5% en masse du mélange total). Il est néanmoins possible de synthétiser des monolithes possédant des valeurs de FEO importantes en conservant des valeurs élevées de monomères chargés (au-delà de 2% en masse), il faut alors réadapter les pourcentages en solvants porogènes. Néanmoins, au-delà de 3 % en masse, il apparaît que le FEO n'augmente plus de façon linéaire, probablement en raison d'un gonflement du monolithe à l'état solvate. Il existe donc une concentration-seuil au-delà de laquelle le FEO n'augmente plus et les conditions séparatives se dégradent. La Figure 18 illustre ces conclusions.

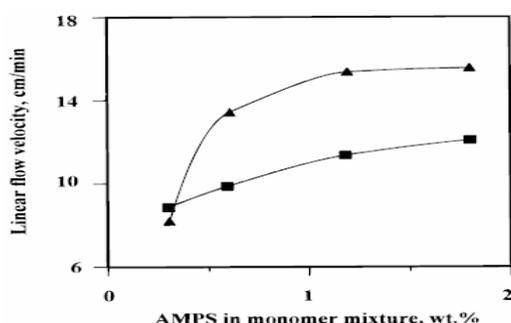


Figure 18 : Vitesse du flux électroosmotique, obtenues sur des monolithes en capillaire, en fonction du pourcentage en masse d'AMPS dans le mélange de monomères. Les triangles représentent des colonnes obtenues par des variations du % d'AMPS (acide 2-acrylamidopropanesulfonique) uniquement, les caractéristiques poreuses des colonnes variant. Les carrés représentent des colonnes dont les caractéristiques poreuses sont constantes par ajustement du pourcentage en solvant.

En conclusion, la conception d'une colonne monolithique permettant d'obtenir de bonnes performances séparatives en terme d'efficacité et de rapidité d'analyse requiert une mise au point minutieuse de la composition du mélange réactionnel. En conséquence, le remplacement d'un monomère par un autre possédant une fonctionnalité différente risque de perturber très fortement la composition équilibrée du mélange réactionnel. Dans ce cas, il est nécessaire de réoptimiser le mélange réactionnel.

### **4.3 Fonctionnalités de surface des monolithes**

Les monomères à base de (méth)acrylates présentent une grande diversité de fonctions disponibles qui permettent de moduler les propriétés fonctionnelles du monolithe en fonction du type d'interaction désirée. Les plus couramment utilisés sont le butyl(méth)acrylate (BMA), l'hexylacrylate (HA), l'hydroxyéthylméthacrylate (HEMA), le glycidyl méthacrylate (GMA), le butanedioldiacrylate (BDDA), le triméthylolpropane triméthacrylate (TRIM), l'éthylènediméthacrylate (EDMA). Il existe aussi des monomères chargés soit positivement, généralement des ammoniums quaternaires, soit négativement, le plus souvent des acides sulfoniques. Il existe d'autres monomères disponibles commercialement et qui permettent la sélection de chaînes alkyles plus ou moins longues ou de fonctions polaires variées. L'incorporation de monomères dont la fonctionnalité a été sélectionnée dans le même mélange à polymériser reste le moyen le plus simple pour obtenir des phases stationnaires plus spécifiques. Cependant il n'est pas toujours possible de trouver le groupement fonctionnel désiré, c'est pourquoi des méthodes de greffage post-synthèse ont été mises au point à partir de monomères modifiables par réaction avec d'autres molécules. Deux monomères se partagent l'ensemble des applications développées : un époxyde (glycidyl méthacrylate) et un azlactone (2-vinyl-4,4-diméthylazlactone). A partir de ces fonctions, il est possible de lier des composés très divers par ouverture de cycle. Par exemple, des diamines afin de réaliser une phase échangeuse d'ions ou une fonction thiol pour la dériver ensuite afin d'obtenir une colonne monolithique chirale [93,119]. Des greffages de biomolécules ont aussi été réalisés avec des mannanes [108] et des enzymes [101,103].

Un autre procédé permettant fonctionnaliser la surface du monolithe une fonctionnalité a été développé ces dernières années sous le nom de « photografting » ou greffage photoinduit. Il s'agit d'introduire un mélange constitué du monomère à greffer et d'un agent photosensible qui permettra la photopolymérisation entre le monomère et les fonctions vinyliques libres de la colonne monolithique [102,103,105,107]. Cette technique présente l'avantage de pouvoir localiser la fonctionnalisation à une partie utile de la colonne. Plus le temps d'irradiation est

important plus le greffage sera important (Figure 19). En réalisant des greffages successifs, il est possible de réaliser des gradients de greffage sur la longueur de la colonne en masquant au fur et à mesure une partie de la colonne aux rayonnements [105].



Figure 19: Représentation schématique des chaînes de polymère en croissance lors d'une réaction de greffage photoinduit et dont le temps d'irradiation augmente de la gauche vers la droite [102].

Il existe ainsi une très large gamme de méthodes permettant d'adapter le groupement fonctionnel de la future colonne lors de la synthèse ou par des réactions de dérivation plus ou moins sélectives. Ce point est essentiel lorsqu'il s'agit de rendre une phase spécifique pour la rétention de composés cibles.

#### 4.4 Monolithes développés au laboratoire

Les monolithes développés au cours de ces travaux de thèse utilisent des monomères à base d'acrylates et des solvants porogènes tels que l'acétonitrile, l'éthanol et du tampon phosphate. Ce type de mélange a été étudié et mis au point par Ngola et al. [115]. Ce mélange est intéressant de par la faible viscosité des solvants porogènes, par rapport à ceux habituellement utilisés, ce qui permet une introduction et un rinçage aisés des capillaires ou microcanaux sans nécessiter l'utilisation de fortes pressions. De plus les efficacités présentées par ces monolithes sont du même ordre de grandeur que celles obtenues avec les monolithes à base de méthacrylates et de solvants plus visqueux, soit environ 200 000 plateaux/m, pour des séparations de mélanges tests. Comme pour les méthacrylates, les acrylates présentent une grande gamme de fonctionnalités disponibles permettant de varier les groupements fonctionnels des monolithes et donc le type d'interactions mis en jeu entre les solutés et la phase stationnaire. Par ailleurs, ces phases sont performantes tant au format capillaire qu'au format microsystèmes [112,114,116].

## 5. Les microsystèmes séparatifs

### 5.1 Description et intérêts des microsystèmes

Les microsystèmes analytiques s'imposent, actuellement, comme une alternative de choix face à certains défis des sciences analytiques. Ces systèmes analytiques miniaturisés visent à intégrer les différentes étapes de la chaîne analytique : le prétraitement et/ou la

préconcentration de l'échantillon, la séparation des composés d'intérêt dans une ou plusieurs dimensions et la détection et/ou la quantification des constituants organiques ou inorganiques de matrices complexes. Ces microsystèmes permettent le couplage de techniques séparatives efficaces avec des systèmes de détection performants. Ils ont par ailleurs été conçus pour permettre des analyses plus rapides, consommant moins d'échantillons et de solvants. Dans ces conditions, il est alors possible d'effectuer des analyses à haut débit et donc de multiplier les essais de mise au point ainsi que de multiplier les résultats. Les volumes injectés étant de l'ordre du nanolitre, ces microsystèmes ne nécessitent que de faibles volumes d'échantillons, et présentent alors un intérêt majeur pour l'analyse d'échantillons rares, notamment dans le cadre d'analyse de fluides biologiques. Ces nouveaux formats portent les noms de microsytème séparatif, de laboratoire sur puce (lab on chip) ou encore de microsytème analytique intégré pour l'analyse totale (micro total analysis system :  $\mu$ TAS) [120].

Les microsystèmes présentent un format dont les dimensions sont similaires à celles d'une carte de crédit. En effet, la largeur est souvent inférieure à 5 cm, la longueur comprise entre 5 et 10 cm et leur épaisseur est faible. Les dimensions des microcanaux sont assez variables en longueur : de quelques centimètres à quelques dizaines de centimètres. Leur largeur est classiquement comprise entre 20 et 70  $\mu$ m, et leur hauteur comprise entre 5 et 30  $\mu$ m. Par ailleurs, différentes géométries de canaux ont été étudiées, serpentins, structure en T, canal en spirale.

En ce qui concerne les matériaux utilisés pour la fabrication de ces microstructures, différents types de matériaux et de technologies ont été étudiés. Les premiers microcanaux décrits dans la littérature ont été réalisés par photolithographie sur verre, mais actuellement, d'autres matériaux sont à l'essai. En effet le verre et le quartz donnent de bons résultats et sont intéressants du fait de leur transparence en UV, cependant leur réalisation s'avère difficile et le coût de fabrication de ces microcanaux est élevé. Des travaux plus récents montrent l'essor de microcanaux en polymères tels que les polyamides, les polycarbonates, les polyacrylates (PMMA : poly(méthylméthacrylate)) ou encore le polydiméthylsiloxane (PDMS)... En effet, ces polymères permettent d'obtenir des microcanaux par moulage soit une production de masse ainsi qu'une diminution des coûts de production sont alors envisageables. Les diverses techniques de fabrication permettent d'imaginer puis de concevoir des microsystèmes originaux adaptés aux diverses problématiques analytiques rencontrées [121,122]. Des utilisations très diverses ont été développées sur ce format dans des domaines variés : chimie combinatoire [123], extraction liquide-liquide [124,125], immunodosage, digestion

protéolytique, séparations bidimensionnelles [126,127], culture cellulaire, amplification de fragments d'ADN [128].

Concernant les techniques séparatives développées sur ces formats, les principales mettent en œuvre des principes électrocinétiques (électrophorétiques ou électrochromatographiques) car elles sont plus aisées à mettre en œuvre à ce niveau de miniaturisation par rapport aux techniques hydrodynamiques [121,129].

## 5.2 Les microsystèmes séparatifs électrophorétiques

Les premiers microsystèmes séparatifs ont été une transposition des techniques électrophorétiques, les dimensions des microcanaux étant similaires et la génération d'un flux électroosmotique dans un matériau comme le verre étant possible. La longueur des premiers microcanaux était assez importante afin d'avoir le nombre de plateaux suffisants pour permettre la séparation des composés. Des séparations en mode électrophorèse de zone libre ou micellaire ont ainsi été effectuées et ont donné de très bons résultats, par exemple, la séparation de 19 acides aminés en moins de 165 secondes avec une résolution supérieure à 1,2 et une efficacité moyenne de 280 000 plateaux/m pour l'ensemble des pics [122]. Dans ce cas, le canal séparatif se présente sous forme de spirale afin de réduire les phénomènes dispersifs tout en conservant des longueurs de canaux importantes. Ce microsystème est représenté sur la Figure 20 B. Des analyses très performantes, atteignant le million de plateaux ont été réalisées pour la dichlorofluoresceine en moins de 46 secondes à 22,2 cm de la zone d'injection.

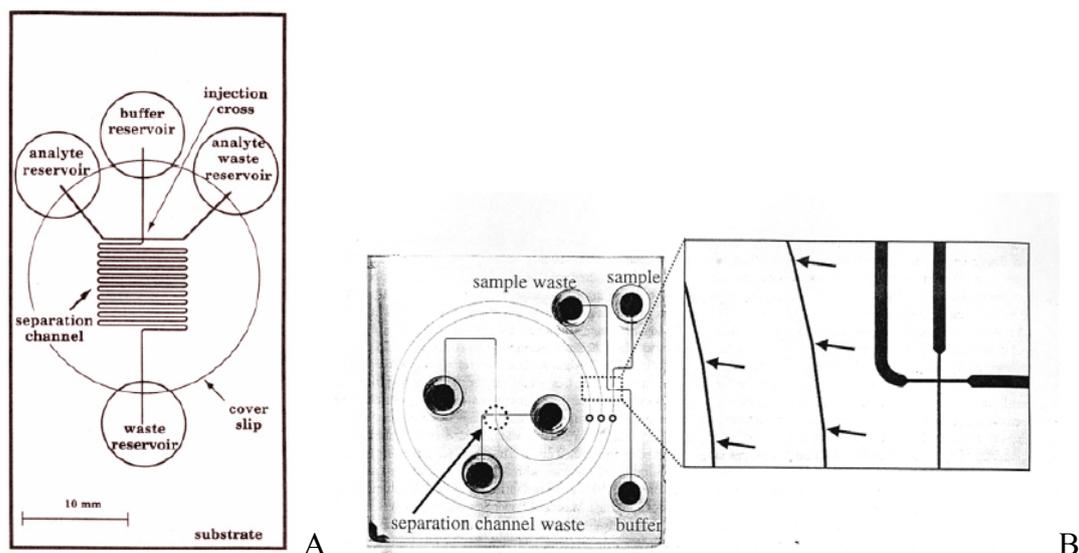


Figure 20 : Schéma de microsystèmes séparatifs électrophorétiques. Les puits sont désignés selon leur utilisation et sont reliés par des microcanaux. (A) [121]. (B) [122]

Cependant, avec des longueurs de canaux plus courtes, environ 5 cm, des séparations performantes en terme d'efficacité ont été obtenues avec des hauteurs de plateau de 4  $\mu\text{m}$  pour des vitesses linéaires de 0.8 mm/s [121], et sont présentés sur la Figure 21.

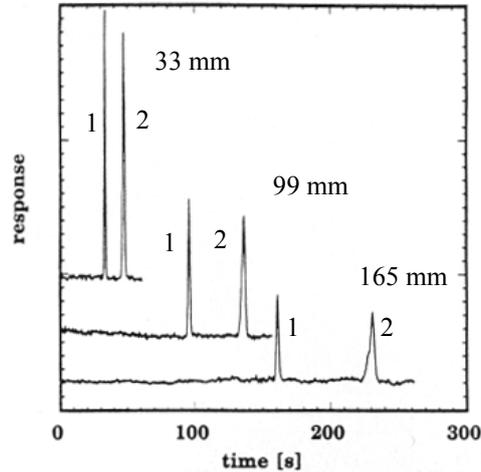


Figure 21 : Electrophorégrammes obtenus à 33, 99 et 165 mm de la zone d'injection, pour la rhodamine B (1) et la sulforhodamine (2).  $E = 170\text{V/cm}$ , injection de type pincé [121].

Dans ce type de système séparatif, l'écoulement des fluides est assuré par la génération d'un flux électroosmotique. Ce type de flux présente l'avantage majeur d'être caractérisé par un profil de vitesse plat minimisant l'élargissement des pics lié au profil de vitesse, condition nécessaire à l'obtention de séparation satisfaisante dans les microcanaux. Cet écoulement électroosmotique allie ainsi la rapidité des séparations à des efficacités élevées, dues à cet élargissement de bande limité, contrairement à un écoulement laminaire, plus dispersif. La Figure 22 représente le profil des vitesses produit par la génération d'un FEO dans un microcanal en PDMS, dans un capillaire de silice vierge ainsi qu'un flux laminaire obtenu dans un microcanal en PMMA. Le FEO obtenu dans les deux formats et matériaux cités possède bien un profil d'écoulement plan, tandis que le flux laminaire produit une dispersion très importante de la bande de l'échantillon.

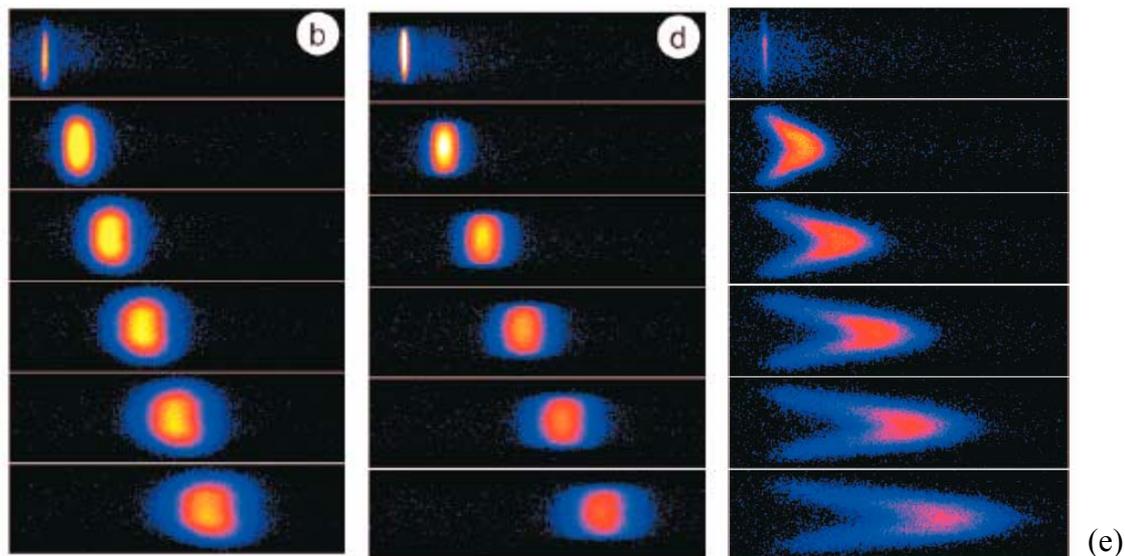


Figure 22 : Images du flux électroosmotique dans un microcanal en PDMS (b), dans un capillaire de silice vierge (d). Image d'un flux hydrodynamique dans un microcanal en acrylate (e). La dimension de chaque image est de 300  $\mu\text{m}$  sur 80  $\mu\text{m}$  et l'intervalle de temps entre chaque image est de 50 ms [130].

Les quantités injectées étant très faibles (quelques dizaines ou centaines de picolitres) la détection reste un des problèmes majeurs des microsystèmes. Plusieurs solutions peuvent donc être envisagées : l'utilisation de détecteurs plus sensibles associée à une taille plus importante des canaux, sans pour autant produire d'effets Joule trop important. On peut aussi envisager d'associer au dispositif analytique une étape de préconcentration avant l'étape séparative.

Des séparations bidimensionnelles (2D) ont également été réalisées sur microsystèmes [127,131], des géométries de microcanaux ont été conçues afin de séparer des espèces tout d'abord en mode micellaire puis ensuite en mode zone. La Figure 23 présente le schéma d'un microsystème permettant de réaliser des analyses 2D et les séparations d'un mélange peptidique obtenu après digestion trypsique du cytochrome c et marquage fluorescent par le 5,6-TAMRA [127]. Le temps d'analyse total des produits de digestion est de 10 minutes et la capacité de pics de la deuxième dimension est estimée entre 500 et 1000.

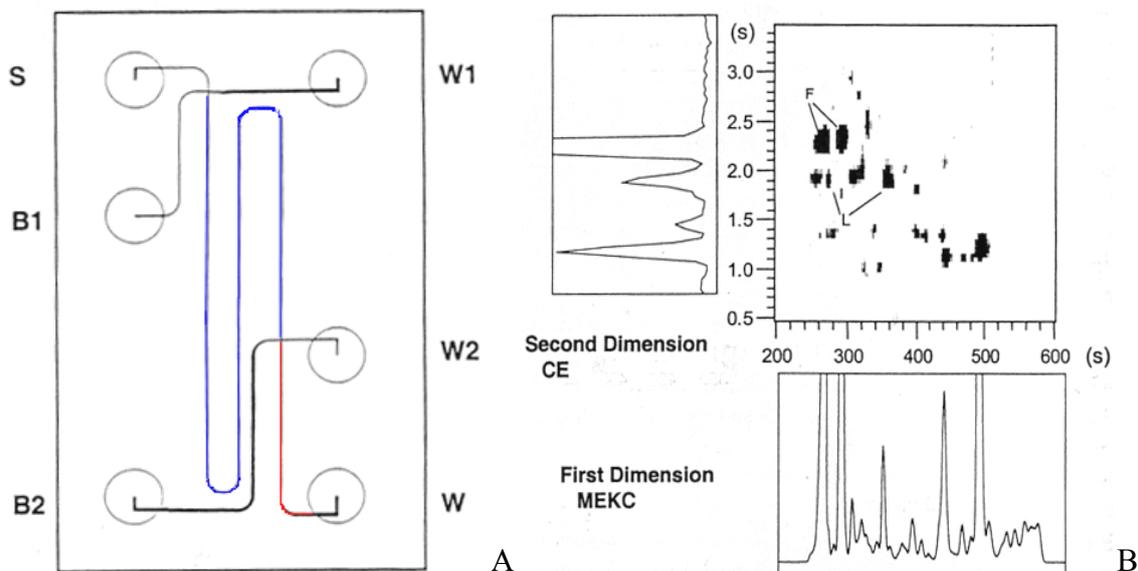


Figure 23 : (A) Schéma du microsysteme utilisé pour réaliser des séparations bidimensionnelles. Le premier canal mesure 69 mm et le deuxième 10 mm. (B) Séparations 1D et 2D de peptides issu d'une digestion trypsique de cytochrome C. Les injections dans la deuxième dimension réalisées toutes les 3s.

De nombreuses applications dans des domaines très variés ont ainsi été menées sur ces formats miniaturisés et ont démontré leurs performances et leurs possibilités séparatives [132,133]. Cependant peu d'échantillons réels ont été analysés.

### 5.3 Microsystemes séparatifs électrochromatographiques

La modification de surface des parois des canaux est l'approche qui a été la première envisagée pour les microsystemes. Assurer une fonctionnalisation des parois selon les techniques de greffage issus de l'ECC ou de l'EC permet de modifier les propriétés de surface des parois et créer des phénomènes de rétention, offrant ainsi un mécanisme séparatif supplémentaire. De plus, la présence d'une phase stationnaire permet de séparer des composés non chargés. Dans l'exemple présenté par la Figure 24 la séparation de trois composés neutres a été réalisée en moins de 200 secondes sur un canal greffé par des groupements octadécylsilane. Cependant, l'élargissement des pics est remarquable, réduisant l'efficacité du système, et provient de la forme en serpentin de la colonne et de sa section trapézoïdale. De plus, cette technique rencontre les mêmes limitations que celles observées en ECC en tube ouvert : faible rapport surface /volume, limitant les interactions entre les solutés et la phase stationnaire.

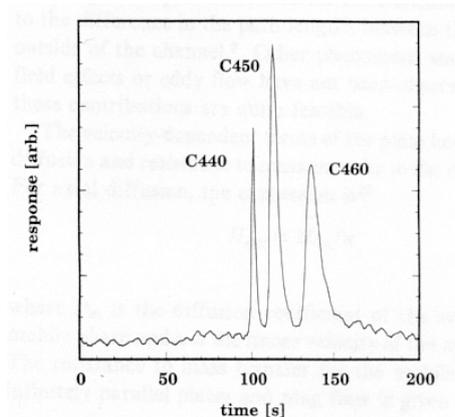


Figure 24 : Electrochromatogramme d'une séparation de 3 coumarines neutres à la vitesse linéaire de 0.65 mm/s. Microsystèmes en verre greffé par des groupements octadécylesilane. Phase mobile : acétonitrile-tampon tétraborate de sodium 10mM, pH=9.2 (25:75, v/v). Injection pincée . Champ électrique imposé : 138 V/cm [129]

Des améliorations de cette même séparation ont été réalisées grâce à un gradient d'élution et à des modifications des dimensions des microcanaux [134].

L'utilisation de phases stationnaires en électrochromatographie en microcanal permet de remédier à ces limitations, d'apporter de la sélectivité, tout en conservant les avantages de rapidité des analyses des systèmes miniaturisés. Plusieurs technologies ont été adaptées au format des microsystèmes séparatifs : les structures microfabriquées ou COMOSS (collocated monolith support structure), des canaux remplis par des particules ou encore des monolithes polymériques poreux.

### 5. 3. 1 Structures microfabriquées

Grâce aux techniques de photolithographie, il est possible de réaliser des microstructures très régulières mimant des particules, et créant ainsi un nouveau type de phase stationnaire chromatographique. Ces phases ont l'allure d'un ensemble de plots ordonnés de façon étroite (Figure 25). La taille et la distribution de ces plots et des canaux les séparant peuvent être choisies et modulées [135]. Ces structures microfabriquées peuvent aussi subir des modifications chimiques de leurs parois dans le but de leur donner une sélectivité désirée [136]. Des systèmes séparatifs très efficaces ont été mis au point sur ces colonnes COMOSS qu'elles soient en verre ou en PDMS, pouvant atteindre les 700 000 plateaux/m pour des composés tels que la rhodamine ou des peptides marqués. Les applications récentes concernent des colonnes modifiées permettant de réaliser des digestions enzymatiques et de la chromatographie d'affinité par l'immobilisation de métaux (IMAC : immobilization metal affinity chromatography) [137].

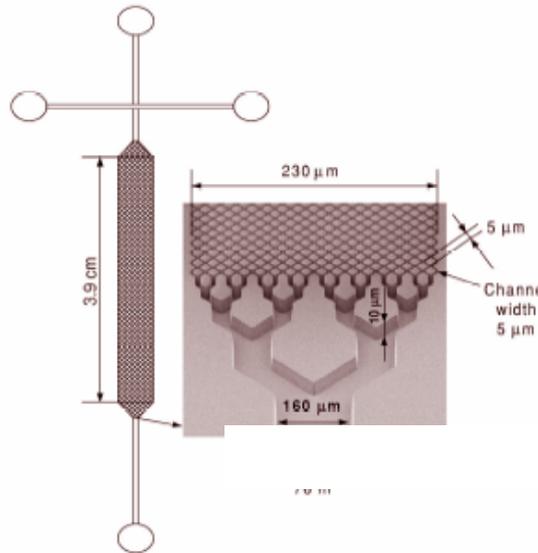


Figure 25 : Représentation schématique et image MEB d'une colonne COMOSS comportant les dimensions des canaux [138].

Un des inconvénients de cette technologie de phases stationnaires est le coût très élevé de leur fabrication. Par conséquent, d'autres matériaux ont été utilisés pour réaliser ces structures, notamment le PDMS qui représente des coûts de fabrication beaucoup plus faibles. Les procédures de fabrication ont été décrites tant sur quartz [136] que sur PDMS [135,137-139]. Par ailleurs, les COMOSS présentent une surface spécifique 2 à 3 fois supérieure comparées aux microsystemes comprenant des canaux recouverts de phase stationnaire, cependant le facteur limitant est identique à celui des phases en canaux ouverts, un trop grand espacement entre les plots conduisant à un rapport surface développée/volume trop faible pour obtenir des performances séparatives intéressantes.

### 5. 3. 2 Canaux remplis de particules

Les phases particulières sont également utilisées dans les microsystemes séparatifs et présentent les mêmes avantages et inconvénients qu'au format capillaire. Cependant le remplissage homogène et reproductible des canaux ainsi que l'immobilisation des particules par la formation de frittés, ou d'autres structures tels que des restricteurs, représentent un véritable défi technologique. Malgré ces limitations importantes des microsystemes ont été développés comprenant des parties plus ou moins importantes de canal remplies par une phase particulière selon divers moyens d'immobilisation déjà décrits en ECC [140], utilisation d'une immobilisation physique des particules par un gel polymérique par exemple ou de parois permettant de réaliser une chambre réactionnelle [141].

Un autre moyen est d'utiliser un canal comportant un restricteur, permettant d'immobiliser les particules qui subissent ensuite un traitement thermique pérennisant cet effet bouchon par agglomération et fusion de particules entre elles et les parois du microsysteme, représenté sur la figure 26 A[142]. Ce type de colonne est alors quasi monolithique. Des efficacités comprises entre 120 et 290 000 plateaux/m ont été obtenues pour des séparations de petites molécules comme le méthanol et le benzaldéhyde, illustré par la Figure 26 B.

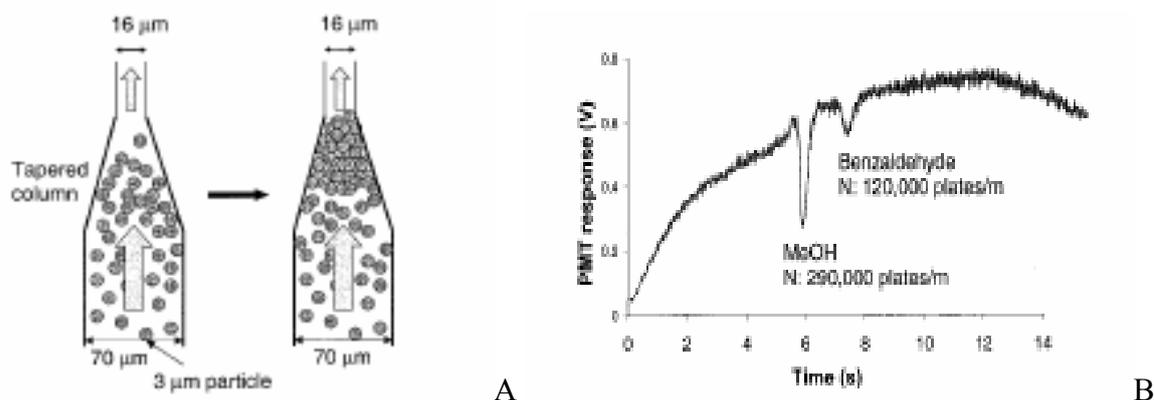


Figure 26 : **(A)** schéma de l'immobilisation de particules selon un effet clé de voûte ou « keystone ». Des particules en suspension sont dirigées d'un réservoir vers le restricteur, où la densité de particules augmente et celles-ci s'agrègent en l'absence de barrière physique. Les premières particules bloquent les autres et permettent de remplir le segment de canal. **(B)** séparation électrochromatographique de méthanol et de benzaldéhyde dans un microcanal rempli de dimensions : 5 cm de longueur totale, 1.7 cm de longueur efficace. Phase stationnaire : particules de silice greffée C18, Nucléosil, 3 µm. Phase mobile : acétonitrile- tampon phosphate 5 mM, pH = 7 (80:20, v/v) avec 1 mM de fluoresceine.

### 5. 3. 3 Monolithes polymériques poreux formés *in situ* dans les microcanaux

Les premières phases stationnaires monolithiques polymérisées ont été réalisées dans des microsystemes en quartz. Afin d'assurer l'attachement du monolithe aux parois, des procédures de silanisation, similaires à celles menées en capillaire, sont réalisées dans les microcanaux, les méthodes de synthèse des monolithes sont également similaires à celles décrites dans le paragraphe 3.

Les premiers monolithes synthétisés en microsysteme sont à base de monomères de type acrylamide [143], illustré sur la Figure 27. Il n'y a donc pas de localisation simple de la phase stationnaire dans le microcanal. Néanmoins, il est possible de circonscrire la polymérisation aux endroits souhaités du microcanal par injection de la solution à polymériser entre des zones de solution de polyéthylène glycol (PEG), permettant ainsi de localiser de façon nette la zone de phase stationnaire dans le microcanal [143]. Les performances séparatives de ces

phases stationnaires sont intéressantes, 350 000 plateaux/m pour des composés tests alkylphénones, et sont illustrées sur la Figure 27, toutefois cette solution n'est pas commode et ne conviendra pas pour des géométries de canaux complexes.

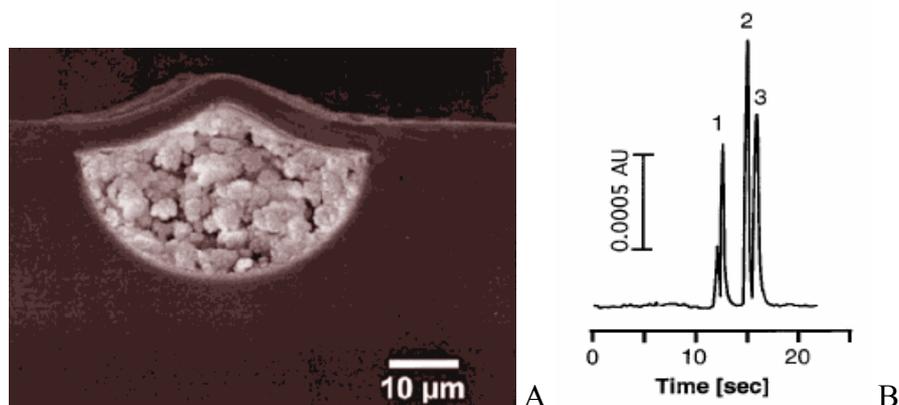


Figure 27 : (A) Image MEB d'un polymère poreux à base de polyacrylamide, synthétisé *in situ* dans le microcanal. (B) Séparation électrochromatographique sur microsystème. Colonne rectiligne de 18 mm de long x 40 µm de diamètre interne. Phase mobile : acétonitrile, tampon phosphate 5 mM, pH=7,4 (15:85, v/v). Tension de 2,4 kV (soit 500 V/cm), vitesse linéaire 2,1mm/s. Injection électrocinétique 100V, 2 s. Détection UV à 254 nm. Composés : (1) : uracile, (2) phénol, (3) : alcool benzylique ; d'après [143]

A la suite de l'introduction des mécanismes de photopolymérisation, de nouvelles possibilités peuvent être envisagées pour l'introduction et la polymérisation localisée de phases monolithiques dans les microcanaux [90,95]. Il est en effet possible de définir la position et la taille de la zone où se situera le monolithe dans les microcanaux grâce à l'utilisation d'un masque. Ce mode d'initiation a été établi pour des monomères de type (méth)acrylate et des précurseurs de sol-gel [144].

Les premiers microsystèmes utilisant ces phases ont été développés dans des microcanaux en verre ou quartz avec des monomères à base d'acrylates [145]. Leur microsystème comporte de la phase stationnaire uniquement dans les canaux séparatifs, les canaux d'injection sont libres de toute phase grâce à l'application d'un masque empêchant l'irradiation de la zone protégée par les UV. La Figure 28 A présente le résultat de l'application de ce masque, les zones polymérisées sont visibles en noir et les canaux d'injection sont bien vides de tout polymère. Par ailleurs, la Figure 28 B présente l'interface très nette entre la partie du canal rempli par le monolithe et la partie vide. La localisation de la zone polymérisée est donc réalisable de façon précise grâce à l'utilisation d'un masque. De plus la Figure 28 C présente l'image MEB d'une coupe transversale d'un microcanal contenant une phase monolithique à base de butyl-laurylacrylate.

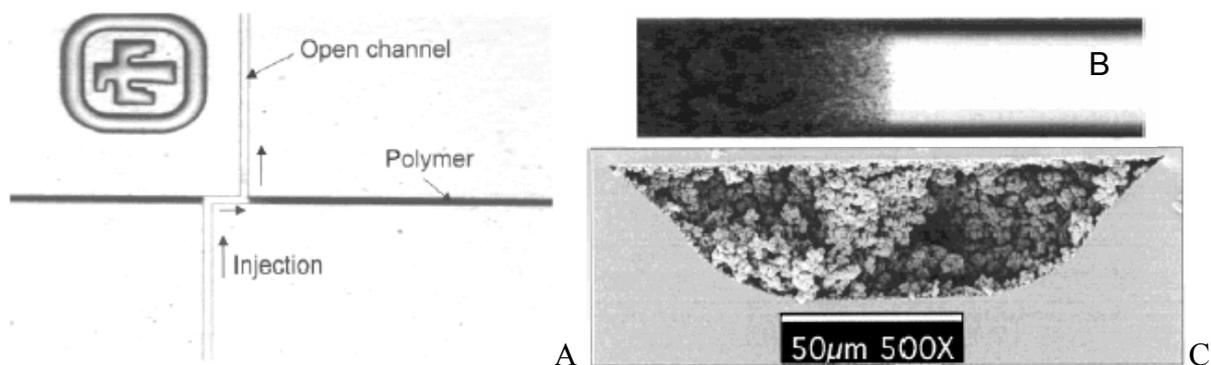


Figure 28 : **(A)** photo vue de dessus d'un microsysteme en verre dont les canaux d'injection ont été protégés des radiations UV par application d'un masque, afin de ne pas subir la polymérisation. **(B)** : Image vue de dessus de la fin de colonne monolithique à base de butyl-laurylacrylate dans le canal. **(C)** : Image MEB d'une coupe transversale d'un microcanal rempli de phase polymérique à base d'acrylates [145].

Des monolithes à base de butyl ou d'hexylacrylate comportant un monomère chargé positivement ou négativement ont également été synthétisés à la fois en capillaires et en microcanaux [115]. Un mélange de HAP a ainsi été séparé en capillaire avec des efficacités moyennes de 150 000 plateaux/m sur une phase à base de butylacrylate. La séparation en microsysteme présente des efficacités moyennes de 200 000 plateaux/m sur une phase à base de butylacrylate également, ces deux séparations sont illustrées sur la Figure 29. Les premiers résultats de la transposition de ces phases du format capillaire au format microsystemes sont donc très encourageants de par les performances séparatives équivalentes au format capillaire.

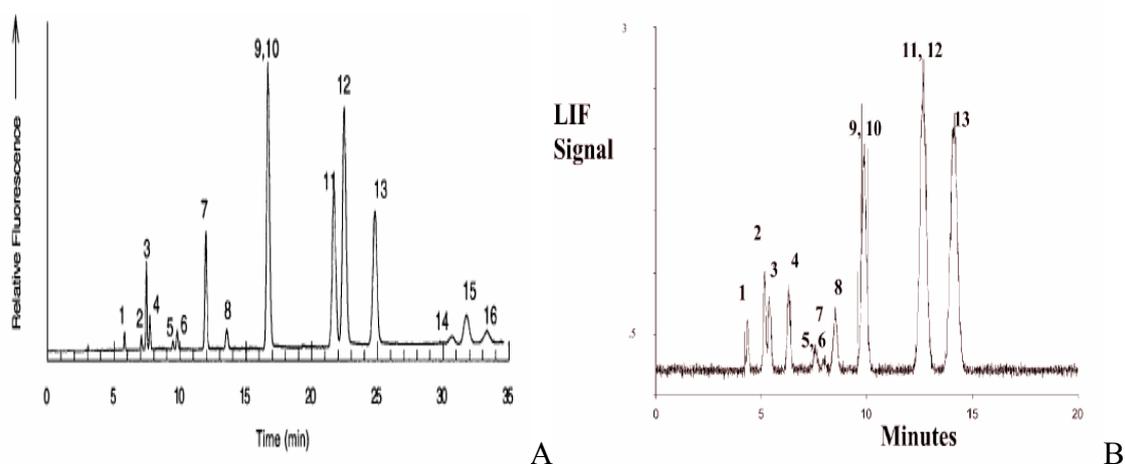


Figure 29 : **(A)** Séparation réalisée en ECC en capillaire de 16 HAP sur une phase à base de butylacrylate. Phase mobile : acétonitrile – tampon tris 5 mM, pH= 8 (75:25, v/v). Champ électrique : 833 V/cm [115]. Capillaire de 75 µm de diamètre interne. **(B)** Séparation réalisée en ECC en microsysteme de 13 HAP sur une phase à base de butyl-laurylacrylate. Détection réalisée à 7 cm de zones d'injections. Tension de séparation 2 kV. Injection 2kV, 5 s. Phase mobile : acétonitrile, tampon tris 20 mM, pH=8.5 (80:20, v/v) [114].

La transposition de plusieurs fonctionnalités de polymères a ainsi été étudiée et les systèmes séparatifs présentent des efficacités équivalentes de 100 à 300 000 plateaux/m pour des mélanges de peptides en capillaire ou en microsysteme [116] [145], comme illustré sur la Figure 30. La fenêtre de détection a été obtenue par dépolymérisation localisée grâce à l'action d'un laser à argon faisant partie du système de détection. Plusieurs tensions ont été testées en format microsysteme, afin de déterminer celles permettant d'obtenir les meilleures performances séparatives. Il s'avère que c'est à 2 kV que l'on obtient les efficacités les plus importantes : jusqu'à 600 000 plateaux/m tout en maintenant la résolution, cependant à 5 kV le retour à la ligne de base est presque obtenu et la séparation a alors lieu en 45 sec.

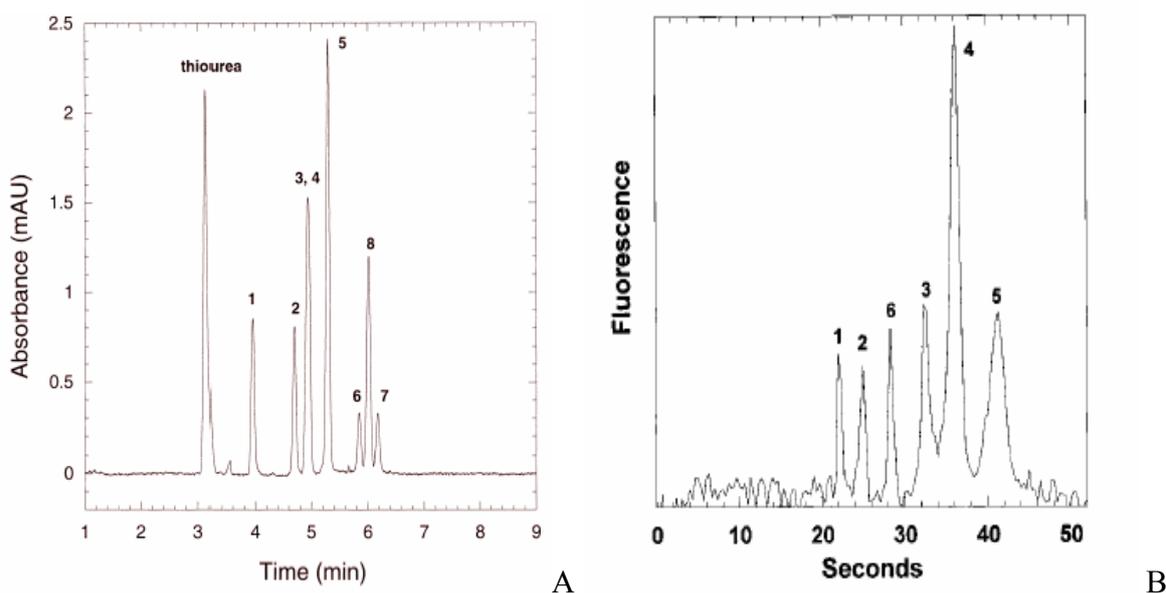


Figure 30 : **(A)** Séparation électrochromatographique de 8 peptides sur une phase stationnaire positivement chargée comprenant 1% de monomère chargé et 1 % d'ester de cellulose. Phase mobile : acétonitrile – tampon phosphate 12.5 mM, pH=2.8 (30:70, v/v). Détection UV à 214 nm. Champ électrique : 200V/cm. Composés : (1) Leu–Enkephalin–Lys, (2) Met–Enkephalin–Arg–Phe, (3) a-Casein, (4) Met–Enkephalin–Lys, (5) b-Lipotropin, (6) Thymopentin, (7) Splenopentin, (8) Kyotorphin [116]. **(B)** Séparation électrochromatographique de peptides en microsysteme sur une phase à base de laurylacrylate, négativement chargée. Les peptides sont dérivés avec de la NDA (naphtalene-2,3-dicarboxaldéhyde) pour pouvoir être détectés par fluorescence. Champ électrique de 770 V/cm (5kV), phase mobile : ACN-tampon borate à 25 mM, pH = 8,2 contenant 10 mM d'octane sulfonate (30 :70, v/v). Solutés : (1) inhibiteur de la papaïne, (2) proctoline, (3) peptide opioïde ; (4) Ile-angiotensine III, (5) angiotensine III, (6) GGG [145].

D'un point de vue pratique, il est possible d'éliminer totalement la phase stationnaire à base d'acrylate, un protocole a été mis au point qui permet de revenir à l'état initial du microsysteme [145]. En effet ces formats sont assez coûteux et la stabilité ainsi que la longévité des phases n'égalent pas celle du support. C'est pourquoi il est très attractif de

pouvoir éliminer une phase détériorée pour obtenir à nouveau le dispositif séparatif initial. Cependant, cette méthode n'a été décrite qu'une fois et semble peu employée.

Ces matériaux monolithiques en tant que phase stationnaire ont été développés récemment en microsystèmes et peu de travaux sont disponibles, néanmoins, Karger et son équipe ont mis en place des monolithes à base de méthacrylates dans des microsystèmes couplés à la spectrométrie de masse pour l'analyse de produits de digestion protéolytique d'un mélange de protéines [146]. Ces monolithes ont aussi trouvé d'autres applications non séparatives, par exemple la réalisation d'un mélangeur monolithique à base de méthacrylate [99], ou encore un microsystème pour l'extraction sur phase solide et la préconcentration a été mis au point avec le même type de phase que dans l'exemple précédent, des facteurs de préconcentration de 1000 ayant été obtenus pour une protéine fluorescente [98].

## 6. Principes de l'électrochromatographie capillaire

L'électrochromatographie capillaire a été appliquée à ce format par Jorgenson et al [147] puis par Knox et al [148] dans les années 80, mais son développement réel date du début des années 90. Elle a été développée afin de combiner les avantages de l'EC, profil d'écoulement plat du FEO, format miniaturisé, et de la CPL, interactions des solutés avec une phase stationnaire plus ou moins spécifique. Des efficacités exceptionnelles ont été obtenues, plus d'un million de plateaux/m [24], démontrant son potentiel. De nombreux travaux ont alors été publiés sur le développement de cette technique analytique au niveau théorique et au niveau technologique. Dans les premiers temps, l'électrochromatographie capillaire était considérée comme une simple superposition des phénomènes séparatifs de l'EC et de la CPL. Cependant, du point de vue séparatif, il ne s'agit pas d'une simple additivité des phénomènes de rétention chromatographiques et de la migration électrophorétique des composés.

### 6.1 Principe et définition

L'électrochromatographie capillaire est une technique séparative électrocinétique : un champ électrique est appliqué sur un capillaire comportant une phase stationnaire. La présence d'une phase stationnaire fournit des interactions entre les solutés et cette phase et produit donc des phénomènes de rétention et une certaine sélectivité. L'application d'un champ électrique permet le déplacement de la phase mobile par la présence d'un flux électroosmotique dont le front d'écoulement est plat, dû aux charges à la surface de la phase stationnaire. Grâce à ce dernier une forte diminution des phénomènes dispersifs par rapport à la CPL est obtenue,

conduisant à de meilleures efficacités. Dans cette partie nous nous intéresserons à la description des paramètres séparatifs caractéristiques de la CEC en ne considérant que le cas des colonnes monolithiques.

## 6. 2 Flux électroosmotique et électromigration

### 6. 2. 1 Flux électroosmotique en EC

En électrophorèse capillaire la paroi interne d'un capillaire de silice vierge est chargée négativement en présence d'un électrolyte de pH supérieur ou égal à deux. Ceci est dû à la présence des groupements silanol qui se trouvent sous forme dissociée (pKa de l'ordre de 5-6). Lorsque le capillaire est rempli d'un électrolyte, les cations le constituant sont attirés vers les charges négatives de la paroi du capillaire, formant alors une double couche électrique. Celle-ci se décompose en une première couche de cations dite compacte car ces derniers sont complètement adsorbés le long de la paroi négative du capillaire (couche de Helmholtz ou de Stern). La deuxième couche est dite diffuse et se compose essentiellement de cations mobiles (couche de Gouy-Chapman). Le potentiel mesuré au niveau de la double couche d'épaisseur  $\delta$  (potentiel zêta  $\zeta$ ) est proportionnel à la densité de charge surfacique ( $\sigma$ ) :

$$\zeta = \frac{\sigma\delta}{\varepsilon_r\varepsilon_0} \quad (1)$$

où  $\varepsilon_r$  est la constante diélectrique du milieu et  $\varepsilon_0$  la permittivité du vide. Lors de l'application d'un champ électrique tangentiel, les charges excédentaires de la couche diffuse migrent en direction de l'électrode de signe opposé (la cathode) entraînant avec elles l'ensemble des molécules de solvant et créant ainsi un écoulement de toutes les espèces présentes dans le capillaire, appelé flux électroosmotique (FEO). Ce dernier est caractérisé par une vitesse linéaire,  $v_{eo}$ , donnée par la relation de Helmholtz-Smoluchowski :

$$v_{eo} = -\frac{\varepsilon_r\varepsilon_0\zeta}{\eta}E = m_{eo}E \quad (2)$$

Donc

$$m_{eo} = \frac{\varepsilon_r\varepsilon_0\zeta}{\eta} = \frac{\delta\sigma}{\eta} \quad (3)$$

où  $m_{eo}$  est la mobilité électroosmotique et  $\eta$  la viscosité de l'électrolyte. La mobilité électroosmotique dépend notamment de paramètres expérimentaux tels que le pH et la force ionique de l'électrolyte. Ces paramètres influencent non seulement le taux d'ionisation des groupements silanol, donc la densité de charge surfacique, mais aussi l'épaisseur de la double

couche. D'autre part la présence de solvant organique dans l'électrolyte modifie aussi le flux électroosmotique en raison de son influence sur le potentiel zêta, sur la viscosité et sur la constante diélectrique du milieu. Le flux électroosmotique présente l'avantage de générer un profil d'écoulement plat, contrairement au profil parabolique du flux hydrodynamique rencontré en CPL. Dans le cas de l'écoulement électroosmotique, la vitesse est uniforme et indépendante du diamètre interne du capillaire lorsque ce dernier est largement supérieur à l'épaisseur de la double couche. Expérimentalement, la mobilité électroosmotique est donnée par :

$$m_{eo} = \frac{Ll}{Vt_{eo}} \quad (4)$$

où  $l$  est la longueur utile,  $L$  la longueur totale du capillaire,  $V$  la tension appliquée et  $t_{eo}$  le temps de migration de l'espèce neutre utilisée comme marqueur de flux.

### 6. 2. 2 Flux électroosmotique en électrochromatographie capillaire

En électrochromatographie capillaire, le flux électroosmotique peut être généré à la fois par les parois du capillaire et par la phase stationnaire si celle-ci comporte des groupements chargés. Une double couche se crée donc au niveau de toutes les parois chargées et la phase mobile circulera à travers les canaux du monolithe. Concernant les colonnes monolithiques, le FEO dépendra du pourcentage relatif en monomère chargé du mélange réactionnel et de la nature de la charge. Cependant, les modèles et équations décrits pour l'EC se sont révélés inadéquats pour l'ECC de par la présence d'une phase stationnaire chargée influant sur la longueur réelle parcourue par un marqueur neutre, sur le champ électrique appliqué en présence d'une phase stationnaire entre autres. C'est pour répondre aux particularités de l'ECC que de nouveaux modèles ont été développés décrivant le FEO sur des colonnes particulières, ceux-ci pouvant être appliqués aux colonnes monolithiques [23,149-152].

La mobilité électroosmotique est généralement exprimée comme en électrophorèse capillaire par la relation de Smoluchowski, on parle alors de mobilité électroosmotique apparente :

$$m_{eo_{app}} = \frac{\epsilon_r \epsilon_0 \zeta}{\eta} = \frac{\delta\sigma}{\eta} \quad (5)$$

et

$$m_{eo_{app}} = \frac{Ll}{Vt_{eo}} \quad (\text{expérimentalement}) \quad (6)$$

où  $\zeta$  ne représente plus seulement le potentiel de la paroi du capillaire mais celui de la paroi si elle est encore accessible et celui de la phase stationnaire. La mobilité électroosmotique apparente ne prend pas en compte le remplissage partiel ou complet de la colonne. En effet, dans le cas d'une colonne remplie jusqu'à la fenêtre de détection, on observe une variation importante du champ électrique et donc de la vitesse du flux électroosmotique entre les parties remplies et creuses de la colonne. Cependant, le calcul de la mobilité apparente fait intervenir le potentiel appliqué à la totalité de la colonne et non pas le potentiel de chacune des deux parties. C'est pourquoi le flux moyen d'une colonne partiellement remplie, comme c'est généralement le cas, peut être exprimé selon l'expression :

$$m_{eo,app} = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta \cdot f}{\eta} \quad (7)$$

où  $f$  est un facteur correctif tenant compte des conductivités d'un capillaire rempli ( $\sigma_{rempli}$ ) et d'un capillaire vide ( $\sigma_{vide}$ ). Pour Overbeek et al [153] :  $f = (\sigma_{rempli} / \sigma_{vide})$ . Le même type d'équation a été décrit par Dearie et al mais en faisant intervenir des paramètres géométriques et non plus des conductivités [152], ces modèles sont décrits plus précisément dans le chapitre 3. Il faut noter qu'aucun modèle décrivant le flux dans des structures monolithiques n'a été décrit précisément et que les mesures sont menées en utilisant la forme expérimentale correspondant à la relation de Smoluchowski.

### 6. 2. 3 L'électromigration

Comme en électrophorèse de zone, en ECC les solutés chargés soumis à un champ électrique  $E$  vont se déplacer avec une vitesse dite électrophorétique dans le sens du champ imposé selon la nature de leur charge. Cette vitesse est donnée par la relation :

$$v_{epi} = m_{epi} E \quad (8)$$

Où  $m_{epi}$  est la mobilité électrophorétique effective du composé  $i$ . Elle lui est propre dans un milieu donné. A dilution infinie, il est possible de déterminer la mobilité électrophorétique absolue :

$$m_{epi}^{\infty} = \frac{q_i}{6\pi\eta r_i} \quad (9)$$

Où  $q_i$  est la charge du soluté,  $r_i$  son rayon hydrodynamique et  $\eta$  la viscosité de la solution.

### 6.3 Rétention en ECC

En électrochromatographie, la séparation des solutés est basée sur leurs différences de mobilité électrophorétique et de distribution entre la phase stationnaire et la phase mobile. Du fait de l'électromigration, la prédiction des phénomènes rétentifs est difficile car elle suppose de dissocier les phénomènes d'électromigration des phénomènes chromatographiques. L'expression du facteur de rétention servant à quantifier la rétention et utilisé en CPL, ne peut pas être employé en ECC dans le cas de composés chargés. Différents modèles ont alors été proposés pour définir un paramètre indicateur de la rétention des composés chargés en électrochromatographie [25,154-156].

Cependant, la mobilité électrophorétique d'un composé neutre étant nulle, la séparation de tels analytes se fait uniquement par leur différence de rétention vis-à-vis de la phase stationnaire et ils sont élués par la phase mobile dont le débit est donné par le flux électroosmotique. Dans ce cas, il est possible de définir le même facteur de rétention que celui utilisé en CPL :

$$k = \frac{t_r - t_{eo}}{t_{eo}} \quad (10)$$

où  $t_r$  est le temps de rétention du composé neutre et  $t_{eo}$  le temps de rétention du marqueur de flux électroosmotique, composé non retenu.

Pour les composés chargés, nous nous limiterons à la description du modèle le plus utilisé [155,156]. Cette équation générale provient de la CPL, la vitesse de la phase mobile ayant été remplacée par la vitesse réelle de l'analyte en solution,  $v_i$ , qui est la résultante de la vitesse électroosmotique  $v_{eo}$  et de la vitesse électrophorétique  $v_{epi}$  :

$$v_i = \frac{v_{eo} + v_{epi}}{1 + k_{cec}} \quad (11)$$

L'annexe 1 précise l'expression du  $k_{cec}$  à partir des paramètres expérimentaux. Il en ressort qu'en ECC l'estimation du facteur de rétention des composés chargés n'est pas simple à mettre en oeuvre et que les modèles adoptés ne rendent pas compte de toutes les situations expérimentales rencontrées [25]. Le modèle décrit par Rathore et al. [157] représente une autre alternative tenant compte des parties remplies et vides d'un capillaire tout en nécessitant

également des mesures de mobilités électrophorétiques par électrophorèse capillaire de zone (ECZ).

#### 6.4 Efficacité et phénomènes de dispersion

L'efficacité des colonnes en ECC est déterminée de la même façon qu'en CPL [158]. Elle est donc mesurée pour chaque composé par le nombre de plateaux théoriques,  $N$ , « contenu » dans la colonne mesurant ainsi l'étalement relatif des pics. Ce nombre de plateaux est calculé à partir de l'électrophorégramme :

$$N = 16 \left( \frac{t_r}{\omega} \right)^2 = 5,54 \left( \frac{t_r}{\delta} \right)^2 \quad (12)$$

Où  $\omega$  est la largeur de pic à la base et  $\delta$  la largeur de pic à mi-hauteur. Afin de pouvoir comparer entre elles des colonnes de différentes longueurs, deux paramètres ont été définis, le nombre de plateaux par mètre de colonne ( $N/m$ ) et la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT ou  $H$ ). Le nombre de plateaux par mètre est simplement défini comme le rapport du nombre de plateaux  $N$  sur la longueur de la colonne en mètre, et la grandeur  $H$  est définie ainsi :  $H = L / N$  (avec  $L$  longueur de la colonne). Cette dernière grandeur ne peut pas être réduite comme toutes les autres grandeurs chromatographiques obtenues avec des phases stationnaires monolithiques. En effet, il n'y a pas encore de modèle permettant d'évaluer quel paramètre issu de la phase stationnaire conviendrait le mieux.

Afin d'obtenir des efficacités importantes lors d'analyses il faut optimiser les conditions expérimentales afin d'obtenir une hauteur de plateau,  $H$ , minimale. Il existe plusieurs équations permettant de modéliser la hauteur de plateau en fonction de la vitesse de la phase mobile,  $v_{eo}$  en EC mais qui équivaut à la notation  $u$ , issu de la CPL. Pour des colonnes monolithiques c'est l'équation de Van Deemter qui est la plus utilisée [78,85,112,118]:

$$H = A + \frac{B}{u} + C_m u + C_s u \quad (13)$$

soit 
$$H = A + \frac{B}{u} + C u \quad (14)$$

avec :  $C = C_s + C_m$

Les coefficients A, B et C correspondent aux différents phénomènes intervenant lors de l'avancement d'une bande de soluté dans la colonne. Trois principaux phénomènes sont à prendre en compte :

- l'anisotropie d'écoulement : coefficient A
- la dispersion des molécules par diffusion longitudinale : coefficient B
- la résistance au transfert de masse en la phase mobile : coefficient  $C_m$ , et en phase solide : coefficient  $C_s$

Les courbes de van Deemter caractéristiques présentent des valeurs faibles de A et de C comparées à la CPL [78,113,159]. En effet du fait du front d'élution plat, le coefficient A présente des valeurs plus faibles. Le coefficient C, lié à la structure macroporeuse, présente lui aussi des valeurs faibles, ce qui explique qu'aux fortes vitesses les hauteurs de plateau restent minimales. La dispersion due aux transferts de masse est donc limitée en ECC, c'est un des avantages principaux de cette technique permettant ainsi d'obtenir des systèmes séparatifs très efficaces pour des vitesses élevées de phase mobile.

## 7. Conclusion

L'électrochromatographie en format capillaire ou en format microsystèmes est une technique analytique dont les performances séparatives dépendent fortement du type de phase stationnaire employé. Chacun de ces types de phases stationnaires présente des avantages et des inconvénients au niveau de la mise en œuvre, de l'utilisation ou des performances séparatives.

Le projet qui a été défini au début de ce travail consistait à mettre en œuvre une technologie de phase stationnaire polymérique qui soit de mise en œuvre aisée et fiable en capillaire et en microsysteme. Ce type de phase stationnaire devait aussi permettre de délimiter la polymérisation à une zone déterminée du capillaire ou du microcanal et présenter des groupements de surface permettant de réaliser des fonctionnalisations. C'est pourquoi la technologie adoptée a été celle des phases stationnaires polymériques organiques photopolymérisées à base d'acrylate. En effet, celles-ci remplissaient les conditions nécessaires à la réalisation du projet. Ainsi la synthèse de ces phases polymériques a été mise en œuvre, optimisée dans le but de produire de meilleures performances analytiques. Etant donné que cette technologie de phase est récente, leur comportement séparatif et les grandeurs analytiques associées ne sont pas encore bien comprises et modélisées. Nous nous sommes donc intéressés à les caractériser au niveau physique et chromatographique. Enfin, nous avons étudié leurs capacités à réaliser des préconcentrations et séparations en ligne de composés environnementaux, d'abord au format capillaire, puis au format microsysteme après avoir transféré et optimisé les procédés de synthèse.

## 8. Références bibliographiques

- [1] L.A. Colon, T.D. Maloney, A.M. Fermier, *Journal of Chromatography A* 887 (2000) 43-53.
- [2] M.M. Robson, M.G. Cikalo, P. Myers, M.R. Euerby, K.D. Bartle, *Journal of Microcolumn Separations* 9 (1997) 357-372.
- [3] L.C. Sander, M. Pursch, B. Märker, S.A. Wise, *Analytical Chemistry* 71 (1999) 3477-3483.
- [4] M. Pursch, L.C. Sanders, *Journal of Chromatography A* 887 (2000) 313-326.
- [5] Q. Tang, M.L. Lee, *Trends in analytical chemistry* 19 (2000) 648-663.
- [6] K.K. Unger, D. Kumar, M. Grun, G. Buchel, S. Ludtke, T. Adam, K. Schumacher, S. Renker, *Journal of Chromatography A* 892 (2000) 47-55.
- [7] J.H. Knox, I.H. Grant, *Chromatographia* 32 (1987) 317.
- [8] D. Li, V.T. Remcho, *Journal of Microcolumn Separations* 9 (1996) 389-397.
- [9] N. Smith, M.B. Evans, *Journal of Chromatography A* 832 (1999) 41-54.
- [10] M.G. Cikalo, K.D. Bartle, P. Myers, *Analytical Chemistry* 71 (1999) 1820-1825.
- [11] M. Zhang, Z.E. Rassi, *Electrophoresis* 19 (1998) 2068-2072.
- [12] M. Zhang, Z.E. Rassi, *Electrophoresis* 20 (1999) 31-36.
- [13] F. Progent, M. Taverna, *Journal of Chromatography A* 1052 (2004) 181-189.
- [14] U. Pyell, *Journal of Chromatography A* 892 (2000) 257-278.
- [15] L.A. Colon, G. Burgos, T.D. Maloney, J.M. Cintron, R.L. Rodriguez, *Electrophoresis* 21 (2000) 3965-3993.
- [16] M.G. Cikalo, K.D. Bartle, M.M. Robson, P. Myers, M.R. Euerby, *The Analyst* 123 (1998) 87R-102R.
- [17] A.M. Fermier, L.A. Colon, *Journal of Microcolumn Separations* 10 (1997) 439-447.
- [18] M.T. Dulay, C. Yan, D.J. Rakestraw, R.N. Zare, *Journal of Chromatography A* 725 (1996) 361-366.
- [19] N.W. Smith, M.B. Evans, *Chromatographia* 38 (1994) 649-657.
- [20] R.J. Boughtflower, T. Underwood, C.J. Paterson, *Chromatographia* 40 (1995) 329-.
- [21] P.D.A. Angus, C.W. Demarest, T. Catalano, J.F. Stobaugh, *Journal of Chromatography A* 887 (2000) 347-365.
- [22] R.A. Carney, M.M. Robson, K.D. Bartle, Peter Myers, *Journal of High Resolution Chromatography* 22 (1999) 29-32.
- [23] A.S. Rathore, C. Horvath, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 3069-3077.
- [24] N.W. Smith, M.B. Evans, *Chromatographia* 41 (1995) 197-203.
- [25] F. Progent, in, Paris XI, Châtenay-Malabry, 2005, p. 245.
- [26] C.P. Kapnissi-Christodoulou, X. Zhu, I.M. Warner, *Electrophoresis* 24 (2003) 3917-3934.
- [27] J.J. Pesek, M.T. Matyska, *Journal of Chromatography A* 887 (2000) 31-41.
- [28] M.T. Matyska, J.J. Pesek, A. Katrekar, *Analytical Chemistry* 71 (1999) 5508-5514.
- [29] M.T. Matyska, J.J. Pesek, R.I. Boysen, M.T.W. Hearn, *Journal of Chromatography A* 924 (2001) 211-221.

- [30] M.T. Matyska, J.J. Pesek, R.I. Boysen, M.T.W. Hearn, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 5116-5125.
- [31] J.J. Pesek, M.T. Matyska, S. Sentellas, M.T. Galceran, M. Chiari, G. Pirri, *Electrophoresis* 23 (2002) 2982-2989.
- [32] X. Huang, J. Zhang, C. Horvath, *Journal of Chromatography A* 858 (1999) 90-101.
- [33] S. Hjerten, K. Nakasato, J. Mohammad, D. Eaker, *Chromatographia* 37 (1993) 287-294.
- [34] S. Hjerten, J.-L. Liao, R. Zhang, *Journal of Chromatography A* 473 (1989) 273-275.
- [35] F. Svec, T.B. Tennikova, Z. Deyl, *Monolithic materials, preparation, properties and applications*, Elsevier, Paris, 2003.
- [36] F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Analytical Chemistry* 64 (1992) 820-822.
- [37] H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, *Analytical Chemistry* 68 (1996) 3498-3501.
- [38] F.D. Hileman, R.E. Sievers, G.G. Hess, W.D. Ross, *Analytical Chemistry* 45 (1973) 1126-1130.
- [39] Q.C. Wang, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Analytical Chemistry* 65 (1993) 2243-2248.
- [40] J.-L. Liao, R. Zhang, S. Hjerten, *Journal of Chromatography A* 586 (1991) 21-26.
- [41] S. Xie, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Biotechnology and bioengineering* 62 (1999) 30-35.
- [42] F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Science* 273 (1996) 205-211.
- [43] V. Szucs, R. Freitag, *Journal of Chromatography A* 1044 (2004) 201-210.
- [44] M. Petro, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Journal of Chromatography A* 752 (1996) 59-66.
- [45] J.L. Liao, N. chen, C. Ericson, S. Hjerten, *Analytical Chemistry* 68 (1996) 3468-3472.
- [46] F. Svec, E.C. Peters, D. Sýkora, C. Yu, J.M.J. Fréchet, *Journal of High Resolution Chromatography* 23 (2000) 3-18.
- [47] E.C. Peters, M. Petro, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Analytical Chemistry* 69 (1997) 3646-3649.
- [48] R. Asiaie, X. Huang, D. Farnan, C. Horvath, *Journal of Chromatography A* 806 (1998) 251-263.
- [49] T. Adam, K.K. Unger, M.M. Dittmann, G.P. Rozing, *Journal of Chromatography A* 887 (2000) 327-337.
- [50] G. Chirica, V.T. Remcho, *Electrophoresis* 20 (1999) 50-56.
- [51] G.S. Chirica, Vincent T. Remcho, *Electrophoresis* 21 (2000) 3093-3101.
- [52] G.S. Chirica, V.T. Remcho, *Analytical Chemistry* 72 (2000) 3605-3610.
- [53] M.T. Dulay, R.P. Kulkarni, R.N. Zare, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 5103-5107.
- [54] N. Ishizuka, H. Kobayashi, H. Minakuchi, K. Nakanishi, K. Hirao, K. Hosoya, T. Ikegami, N. Tanaka, *Journal of Chromatography A* 960 (2002) 85-96.
- [55] M. Motokawa, H. Kobayashi, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, H. Jinnai, K. Hosoya, T. Ikegami, N. Tanaka, *Journal of Chromatography A* 961 (2002) 53-63.
- [56] A.-M. Siouffi, *Journal of Chromatography A* 1000 (2003) 801-818.
- [57] D. Allen, Z.E. Rassi, *Electrophoresis* 24 (2003) 3962-3976.
- [58] C. Legido-Quigley, N.D. Marlin, V. Melin, A. Manz, N.W. Smith, *Electrophoresis* 24 (2003) 917-944.
- [59] N. Tanaka, H. Kobayashi, K. Nakanishi, H. Minakuchi, N. Ishizuka, *Analytical Chemistry* (2001) 421A-429A.

- [60] J.D. Hayes, A. Malik, *Analytical Chemistry* 72 (2000) 4090-4099.
- [61] D. Allen, Z.E. Rassi, *Journal of Chromatography A* 1029 (2004) 239-247.
- [62] Z. Chen, T. Hobo, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 3348-3357.
- [63] M. Kato, K. Sakai-Kato, N. Matsumoto, T. Toyo'oka, *Analytical Chemistry* 74 (2002) 1915-1921.
- [64] M.T. Dulay, J.P. Quirino, B.D. Bennett, M. Kato, R.N. Zare, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 3921-3926.
- [65] J.P. Quirino, M.T. Dulay, B.D. Bennett, R.N. Zare, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 5539-5543.
- [66] J.P. Quirino, M.T. Dulay, R.N. Zare, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 5557-5563.
- [67] M.R. Buchmeiser, *Journal of Chromatography A* 1060 (2004) 43-60.
- [68] B. Mayr, G. Holzl, K. Eder, M.R. Buchmeiser, C.G. Huber, *Analytical Chemistry* 74 (2002).
- [69] F.M. Sinner, M.R. Buchmeiser, *Angewandte Chemie International Edition* 39 (2000) 1433-1436.
- [70] B. Mayr, R. Tessadri, E. Post, M.R. Buchmeiser, *Analytical Chemistry* 73 (2001).
- [71] S. Lubbad, B. Mayr, C.G. Huber, M.R. Buchmeiser, *Journal of Chromatography A* 959 (2002) 121-129.
- [72] B. Mayr, H. Schottenberger, O. Elsner, M.R. Buchmeiser, *Journal of Chromatography A* 973 (2002) 115-122.
- [73] J.-L. Liao, Y.-M. Li, S. Hjerten, *Analytical Biochemistry* 234 (1996) 27-30.
- [74] S. Hjerten, *Analytical Biochemistry* 223 (1994) 153-158.
- [75] A. Premstaller, H. Oberacher, C.G. Huber, *Analytical Chemistry* 72 (2000) 4386-4393.
- [76] H. Oberacher, C.G. Huber, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 21 (2002) 166-174.
- [77] W. Walcher, H. Toll, A. Ingendoh, C.G. Huber, *Journal of Chromatography A* 1053 (2004) 107-117.
- [78] I. Gusev, X. Huang, C. Horvath, *Journal of Chromatography A* 855 (1999) 273-290.
- [79] X. Xiong, L. Zhang, Y. Zhang, H. Zou, J. Zhang, *Journal of High Resolution Chromatography* 23 (2000) 67-72.
- [80] S. Zhang, X. Huang, J. Zhang, C. Horvath, *Journal of Chromatography A* 887 (2000) 465-477.
- [81] C. Ericson, J.-L. Liao, K. Nakazato, S. Hjerten, *Journal of Chromatography A* 767 (1997) 33-41.
- [82] A. Maruska, C. Ericson, A. Vegvari, S. Hjerten, *Journal of Chromatography A* 837 (1999) 25-33.
- [83] S. Xie, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 35 (1997) 1013-1021.
- [84] O. Kornysova, P.K. Owens, A. Maruska, *Electrophoresis* 22 (2001) 3335-3338.
- [85] D. Hoegger, R. Freitag, *Journal of Chromatography A* 1004 (2003) 195-208.
- [86] A. Palm, M.V. Novotny, *Analytical Chemistry* 69 (1997) 4499-4507.
- [87] F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Chemical Material* 7 (1995) 707-715.
- [88] F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Macromolecules* 28 (1995) 7580-7582.
- [89] C. Viklund, F. Svec, J.M.J. Fréchet, K. Irgum, *Chemical Material* 8 (1996) 744-750.

- [90] C. Viklund, E. Pontén, B. Glad, K. Irgum, P. Hörstedt, F. Svec, *Chemical Material* 9 (1997) 463-471.
- [91] E.C. Peters, M. Petro, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 2288-2295.
- [92] E.C. Peters, M. Petro, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 2296-2302.
- [93] D. Sykora, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Journal of Chromatography A* 852 (1999) 297-304.
- [94] U. Meyer, F. Svec, J.M.J. Fréchet, C.J. Hawker, K. Irgum, *Macromolecules* 33 (2000) 7769-7775.
- [95] C. Yu, F. svec, J.M.J. Fréchet, *Electrophoresis* 21 (2000) 120-127.
- [96] M. Lämmerhofer, E.C. Peters, C. Yu, F. Svec, J.M.J. Fréchet, W. Lindner, *Analytical Chemistry* 72 (2000) 4614-4622.
- [97] M. Lämmerhofer, F. Svec, J.M.J. Fréchet, W. Lindner, *Analytical Chemistry* 72 (2000) 4623-4628.
- [98] C. Yu, M.H. Davey, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 5088-5096.
- [99] T. Rohr, C. Yu, M.H. Davey, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Electrophoresis* 22 (2001) 3959-3967.
- [100] D.S. Peterson, T. Rohr, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Journal of proteome research* 1 (2002) 563-568.
- [101] D.S. Peterson, T. Rohr, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Analytical Chemistry* 74 (2002) 4081-4088.
- [102] T. Rohr, E.F. Hilder, J.J. Donovan, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Macromolecules* 36 (2003) 1677-1684.
- [103] D.S. Peterson, T. Rohr, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Analytical Chemistry* 75 (2003) 5328-5335.
- [104] T. Rohr, D.f. Ogletree, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Advanced Functional Materials* 13 (2003) 264-270.
- [105] E.F. Hilder, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Analytical Chemistry* 76 (2004) 3887-3892.
- [106] E.F. Hilder, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Journal of Chromatography A* 1044 (2004) 3-22.
- [107] V. Pucci, M.A. Raggi, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Journal of Separation Science* 27 (2004) 779-788.
- [108] M. Bedair, Z. El Rassi, *Journal of Chromatography A* 1044 (2004) 177-186.
- [109] M. Bedair, Z. El Rassi, *Journal of Chromatography A* 1013 (2003) 35-45.
- [110] M. Bedair, Z. El Rassi, *Journal of Chromatography A* 1013 (2003) 47-56.
- [111] B. Buszewski, M. Szumski, S. Sus, *LC-GC europe* December 2002 (2002) 2-8.
- [112] N. Delaunay-Bertoncini, C. Demesmay, J.-L. Rocca, *Electrophoresis* 25 (2004) 3204-3215.
- [113] S. Eeltink, W.M.C. Decrop, G.P. Rozing, P.J. Schoenmakers, W.T. Kok, *Journal of Separation Science* 27 (2004) 1431-1440.
- [114] Y. Fintschenko, W.-Y. Choi, S.M. Ngola, T.J. Shepodd, *Fresenius journal of analytical chemistry* 371 (2001) 174-181.
- [115] S.M. Ngola, Y. Fintschenko, W.-Y. Choi, T.J. Shepodd, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 849-856.
- [116] R. Shediak, S.M. Ngola, D.J. Throckmorton, D.S. Anex, T.J. Shepodd, A.K. Singh, *Journal of Chromatography A* 925 (2001) 251-263.
- [117] D. Allen, Z.E. Rassi, *Electrophoresis* 24 (2003) 408-420.
- [118] M. Bedair, Z. El Rassi, *Electrophoresis* 23 (2002) 2938-2948.

- [119] B. Preinerstorfer, W. Bicker, W. Lindner, M. Lämmerhofer, *Journal of Chromatography A* 1044 (2004) 187-199.
- [120] A. Manz, D.J. Harrison, E.V. Verpoorte, J.C. Fettinger, A. Paulus, H. Lüdi, H.M. Widmer, *Journal of Chromatography* 593 (1992) 253-258.
- [121] S.C. Jacobson, R. Hergenröder, L.B. Koutny, R.J. Warmack, J.M. Ramsey, *Analytical Chemistry* 66 (1994) 1107-1113.
- [122] C.T. Culbertson, S.C. Jacobson, J.M. Ramsey, *Analytical Chemistry* 72 (2000) 5814-5819.
- [123] Y. Kikutani, T. Horiuchi, K. Uchiyama, H. Hisamoto, M. Tokeshia, T. Kitamori, *Lab on a chip* 2 (2002) 188-192.
- [124] B.S. Cho, T.G. Schuster, X. Zhu, D. Chang, G.D. Smith, S. Takayama, *Analytical Chemistry* 75 (2003) 1671-1675.
- [125] M. Tokeshi, T. Minagawa, T. Kitamori, *Journal of Chromatography A* 894 (2000) 19-23.
- [126] N. Gottschlich, S.C. Jacobson, C.T. Culbertson, J.M. Ramsey, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 2669-2674.
- [127] R.D. Rocklin, R.S. Ramsey, J.M. Ramsey, *Analytical Chemistry* 72 (2000) 5244-5249.
- [128] A. Cantafora, I. Blotta, E. Pino, L. Pisciotta, S. Calandra, S. Bertolini, *Electrophoresis* 25 (2004) 3882-3889.
- [129] S.C. Jacobson, R. Hergenröder, L.B. Koutny, J.M. Ramsey, *Analytical Chemistry* 66 (1994) 2369-2373.
- [130] D. Ross, T.J. Johnson, L.E. Locascio, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 2509-2515.
- [131] J.D. Ramsey, S.C. Jacobson, C.T. Culbertson, J.M. Ramsey, *Analytical Chemistry* 75 (2003) 3758-3764.
- [132] N. Lion, T.C. Rohner, L. Dayon, I.L. Arnaud, E. Damoc, N. Youhnovski, Z.-Y. Wu, C. Roussel, J. Jossierand, H. Jensen, J.S. Rossier, M. Przybylski, H.H. Girault, *Electrophoresis* 24 (2003) 3533-3562.
- [133] G.J.M. Bruin, *Electrophoresis* 21 (2000) 3931-3951.
- [134] J.P. Kutter, S.C. Jacobson, N. Matsubara, J.M. Ramsey, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 3291-3297.
- [135] B.E. Slentz, N.A. Penner, F. Regnier, *Journal of Separation Science* 25 (2002) 1011-1018.
- [136] B. He, N. Tait, F. Regnier, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 3790-3797.
- [137] B.E. Slentz, N.A. Penner, F.E. Regnier, *Journal of Chromatography A* 984 (2003) 97-107.
- [138] B.E. Slentz, N.A. Penner, F.E. Regnier, *Journal of Chromatography A* 948 (2002) 225-233.
- [139] B.E. Slentz, N.A. Penner, E. Lugowska, F. Regnier, *Electrophoresis* 22 (2001) 3736-3743.
- [140] A.B. Jemere, R.D. Oleschuk, F. Ouchen, F. Fajuyigbe, D.J. Harrison, *Electrophoresis* 23 (2002) 3537-3544.
- [141] R.D. Oleschuk, L.L. Shultz-Lockyear, Y. Ning, D.J. Harrison, *Analytical Chemistry* 72 (2000) 585-590.
- [142] L. Ceriotti, N.F.d. Rooij, E. Verpoorte, *Analytical Chemistry* 74 (2002) 639-647.
- [143] C. Ericson, J. Holm, T. Ericson, S. Hjerten, *Analytical Chemistry* 72 (2000) 81-87.
- [144] K. Morishima, B.D. Bennett, M.T. Dulay, J.P. Quirino, R.N. Zare, *Journal of Separation Science* 25 (2002) 1226-1230.
- [145] D.J. Throckmorton, T.J. Shepodd, A.K. Singh, *Analytical Chemistry* 74 (2002) 784-789.
- [146] I.M. Lazar, L. Li, Y. Yang, B.L. Karger, *Electrophoresis* 24 (2003) 3655-3662.

- [147] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, *Journal of Chromatography* 218 (1981) 209-216.
- [148] J.H. Knox, I.H. Grant, *Chromatographia* 24 (1987) 135-143.
- [149] A.S. Rathore, C. Horvath, *Journal of Chromatography A* 781 (1997) 185-195.
- [150] A.S. Rathore, E. Wen, C. Horvath, *Analytical Chemistry* 71 (1999) 2633-2641.
- [151] A.S. Rathore, Y. Li, J. Wilkins, *Journal of Chromatography A* 1079 (2005) 299-306.
- [152] H.S. Dearie, V. Spikmans, N.W. Smith, F. Moffatt, S.A.C. Wren, K.P. Evans, *Journal of Chromatography A* 929 (2001) 123-131.
- [153] J.T.G. Overbeek, in H.R. Kruyt (Editor), *Colloid Science*, Elsevier, New York, 1952, p. 194-203.
- [154] K. Walhagen, M.I. Huber, T.P. Hennessy, M.T.W. Hearn, *Biopolymers* 71 (2003) 429-453.
- [155] A.S. Rathore, A.P. McKeown, M.R. Euerby, *Journal of Chromatography A* 1010 (2003) 105-111.
- [156] F. Lelievre, C. Yan, R.N. Zare, P. Gareil, *Journal of Chromatography A* 723 (1996) 145-156.
- [157] A.S. Rathore, C. Horváth, *Electrophoresis* 23 (2002) 1211-1216.
- [158] R. Rosset, M. Caude, A. Jardy, *Manuel pratique de chromatographie en phase liquide*, Masson, Paris, 1982.
- [159] T. Jiang, J. Jiskra, H.A. Claessens, C.A. Cramers, *Journal of Chromatography A* 923 (2001) 215-227.



# CHAPITRE 2. CONDITIONS DE SYNTHÈSE DE PHASES MONOLITHIQUES PHOTOPOLYMERISÉES A BASE D'ACRYLATES

## 1. Introduction

Afin de pouvoir insérer des monolithes dans des microsystemes analytiques notre choix s'est porté sur des réactions de polymérisation photoinitiées (chapitre 1-paragraphe 5). L'originalité de ce mode de synthèse est de permettre la localisation du polymère dans une partie délimitée du capillaire ou du canal. Dans un premier temps, un mélange réactionnel dont la composition a été optimisée, permettant la synthèse de monolithes aux caractéristiques séparatives intéressantes a été étudié. Cependant, il a été nécessaire de réaliser une étape d'optimisation de certains paramètres, pouvant intervenir sur le processus de synthèse, et donc influencer sur les propriétés structurales et séparatives du monolithe.

La description de synthèses *in situ* comporte parfois une étape précédant la polymérisation. Il s'agit d'un prétraitement de la surface du capillaire comprenant notamment une étape de silanisation. La nécessité de ce prétraitement est assez controversée et différents types de prétraitement sont décrits dans la littérature, cependant ces différences de protocole ont été peu évaluées. Néanmoins, nous pensons que cette étape est essentielle pour une immobilisation du monolithe dans la colonne.

La réalisation de réactions de photopolymérisation nécessite l'utilisation d'une source d'irradiation UV. Selon les équipes synthétisant ce type de monolithe, le matériel utilisé varie d'une simple lampe UV à un appareil comprenant plusieurs lampes et permettant un suivi de certains paramètres du rayonnement, le niveau d'irradiation variant d'un matériel à l'autre.

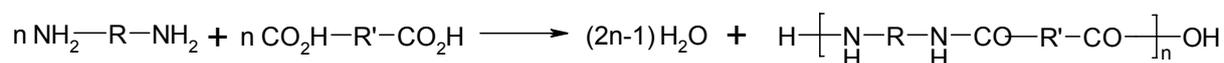
L'objectif de ce chapitre est l'étude du prétraitement du capillaire sur la synthèse et sur les caractéristiques analytiques des monolithes obtenus et de l'influence de la dose énergétique imposée lors de l'irradiation et, de façon à définir des conditions de synthèse permettant d'obtenir des phases efficaces et reproductibles.

## 2. La réaction de polymérisation

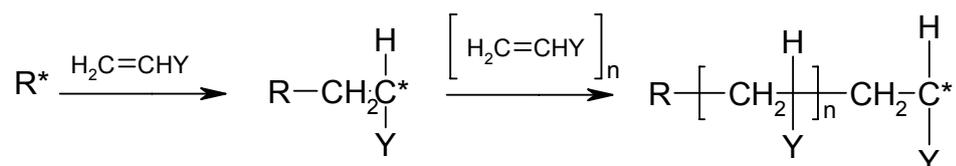
Il existe deux manières de classer les réactions de polymérisation : celle de Carothers et celle de Flory, qui est la plus employée et qui sera donc décrite [1,2]. Cette dernière est basée sur

les mécanismes réactionnels mis en jeu lors de la synthèse de polymères : les polymérisations sont ainsi classées en réaction par étapes ou en chaîne. La différence fondamentale existant entre ces deux types de réactions réside dans le temps nécessaire à la croissance de polymères de haut poids moléculaire. En effet, les réactions en chaîne produisent des polymères de haut poids moléculaire très rapidement, tandis que les réactions par étapes ne les produisent qu'en fin de réaction de polymérisation.

La polymérisation par étapes se produit entre les groupements fonctionnels des réactifs. Il y a donc une plus forte probabilité qu'un dimère réagisse avec un monomère, en fort effectif, en début de réaction et qu'il y ait donc beaucoup de petites macromolécules en croissance. Ces dernières s'associent entre elles pour former des polymères de haut poids moléculaire en fin de réaction. La taille des macromolécules augmente donc lentement dans ce type de processus.



Les polymérisations en chaîne requièrent la présence d'un catalyseur à partir duquel une espèce initiatrice, R\*, est formée et possède un centre réactionnel. Ce dernier peut prendre la forme d'un radical, d'un anion ou d'un cation. Ce type de réaction de polymérisation produit des macromolécules de haut poids moléculaire plus rapidement que celle décrite précédemment. La réaction a lieu par un mécanisme dit de propagation c'est-à-dire en additionnant successivement un grand nombre de molécules.



La croissance du polymère cesse lorsque le centre réactif est détruit par une des réactions de terminaison existantes. Les polymères peuvent se présenter sous diverses formes : linéaire, branchée ou réticulée en fonction de la structure des molécules de polymères. Lorsque des macromolécules de polymère sont liées les unes aux autres transversalement en d'autres points que leurs extrémités, le polymère est dit réticulé. La rigidité et la stabilité du matériau obtenu en sont affectées : plus le polymère est ponté, plus il est rigide. Cela peut aller jusqu'à la formation d'un réseau tridimensionnel plus ou moins serré en fonction de la quantité d'agent réticulant en solution. Un agent réticulant est un monomère possédant deux fonctions réactives susceptibles d'être engagées dans la réaction de polymérisation. Les polymères

monolithiques synthétisés au cours de ces travaux sont produits par des réactions de polymérisation en chaîne radicalaire.

## 2.1 Principes et mécanismes de la polymérisation radicalaire en chaîne

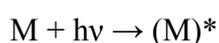
Ces réactions peuvent se décomposer en trois phases distinctes : l'initiation, la propagation et enfin la terminaison. Brièvement, l'initiation correspond à la formation de monomères activés. Cette étape est lente et nécessite une énergie d'activation importante. La présence de groupements électronégatifs/positifs, ou d'une dissymétrie dans les molécules de monomères influe de façon importante sur la stabilité des radicaux formés et donc sur la vitesse de polymérisation. Ensuite, la propagation correspond à la croissance des chaînes formées précédemment. Cette étape est rapide et ne nécessite que peu d'énergie. Enfin, lorsque les chaînes ne croissent plus ou se désactivent, la phase de terminaison est atteinte. La cinétique du processus global dépend de l'étape d'initiation qui est cinétiquement limitante. Selon l'agent utilisé et le type de monomère employé, cette phase d'initiation présente des caractéristiques différentes.

Les polymères monolithiques utilisés lors de ces travaux sont synthétisés par photopolymérisation sous irradiation UV. La photoinitiation présente des avantages pratiques variés tels qu'une production de radicaux limitée aux zones irradiées ainsi qu'un début et un arrêt simple à maîtriser, en allumant et en éteignant la source lumineuse. De plus, la vitesse d'initiation peut être contrôlée par le choix combiné de l'intensité lumineuse, de la température, et de l'origine des radicaux. L'inconvénient majeur d'un tel mode d'initiation provient de la pénétration limitée des rayons lumineux au travers d'une certaine épaisseur du matériau, si celui-ci ne présente pas une absorbance non-nulle. Par exemple, l'utilisation de contenants en verre pose des problèmes de transparence au rayonnement UV pour des longueurs d'onde d'irradiation inférieures à 300 - 325 nm. Il faut alors utiliser des contenants en quartz qui présentent une bonne transmission des longueurs d'onde en dessous de 300 - 325 nm.

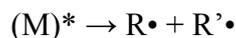
### 2.1.1 Initiation photochimique

Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de la production de radicaux : par un phénomène de photolyse du monomère sous irradiation, à partir d'un initiateur appelé aussi amorçeur ou grâce à un composé photosensible qui sert d'intermédiaire.

- Concernant la photolyse, l'absorption d'un quantum lumineux par un monomère M donne lieu à un état excité (M)\* :

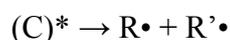
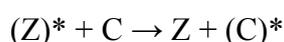
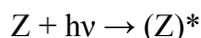


Cette espèce excitée subit ensuite une homolyse et produit des radicaux,  $R^\bullet$ , capables d'initier la polymérisation d'un monomère.



La nature des radicaux  $R^\bullet$  et  $R'^\bullet$  n'est généralement pas bien définie.

- L'utilisation de composés photosensibles peut être un autre moyen d'initier une polymérisation photochimique. Ils provoquent l'homolyse d'un monomère ou d'un initiateur, C, pour lequel l'irradiation ne serait pas suffisante ou la fréquence lumineuse mal adaptée. Cet agent reçoit l'excitation d'une radiation et transfère cette énergie au composé C :



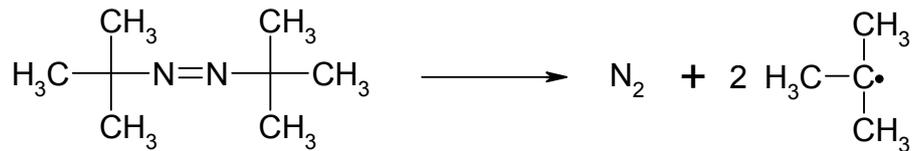
Ainsi, bien que l'espèce C ne puisse être excitée directement par les radiations lumineuses de fréquence  $\nu$ , l'absorption d'énergie est réalisée grâce à l'espèce Z qui est ainsi capable de la transférer à une fréquence pouvant être absorbée par le composé C.

- Une autre voie pour l'initiation photochimique est la dissociation photolytique d'initiateurs. Les agents permettant cette phase d'amorçage sont donc sensibles aux radiations lumineuses mais pas uniquement.



En effet, certains initiateurs produisant des radicaux par homolyse thermique peuvent aussi être employés en tant que photoinitiateurs. Ces deux modes conduisent en général à la formation des mêmes radicaux. La photopolymérisation permet d'utiliser une gamme plus large d'initiateurs comparée à la polymérisation thermiquement induite. De plus, les réactions photolytiques présentent une plus grande sélectivité des liaisons clivables, et donc des radicaux formés, que les réactions d'homolyse thermique. Ces dernières se produisent à de très hautes températures générant un grand nombre de radicaux différents car plusieurs types de liaison peuvent être cassés.

Les composés azo, comme le 2,2'-azobisisobutyronitrile ou AIBN par exemple, se dissocient facilement non pas à cause d'une liaison faible comme c'est le cas pour les peroxydes car l'énergie de la liaison C-N est élevée, mais parce qu'elle donne lieu à la formation d'une molécule très stable, de diazote, ce qui est le moteur de la réaction.



Ces composés ont d'abord été utilisés en tant qu'initiateurs thermiques mais sont aussi utilisés en tant qu'initiateurs photochimiques [3-5]. C'est cet initiateur, l'AIBN, que nous avons utilisé tout au cours de nos synthèses de monolithes.

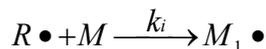
D'un point de vue cinétique, il est possible de décrire la suite réactionnelle de la manière suivante : décomposition homolytique de l'initiateur (I) en une paire de radicaux suivant la constante de vitesse de dissociation de l'initiateur ( $k_d$ ). On peut donc exprimer la vitesse de disparition de l'initiateur mais aussi la vitesse d'apparition des radicaux :



$$\text{avec } -\frac{d[I]}{dt} = k_d [I]$$

$$\frac{d[R\cdot]}{dt} = 2k_d [I]$$

Puis le radical formé va réagir avec une première molécule de monomère (M) et produire l'espèce initiant la chaîne avec une constante de vitesse d'initiation ( $k_i$ ) et une vitesse  $R_i$  :



$$R_i = \left( -\frac{dM}{dt} \right) = k_i \cdot [M] \cdot [R\cdot] = -\frac{dR\cdot}{dt}$$

Cependant il est difficile d'avoir accès à la concentration des radicaux formés car elle est très faible. De ce fait, on fait l'hypothèse d'un régime stationnaire ; c'est-à-dire que la concentration en radicaux augmente au début mais atteint très rapidement une valeur constante, stationnaire. C'est pourquoi les variations de concentration en radicaux pendant la polymérisation peuvent être considérées comme nulles, soit  $k_d = k_i$ . Ainsi,

$$2k_d \cdot [I] = k_i \cdot [R\cdot] \cdot [M]$$

$$[R\cdot] = \frac{2k_d}{k_i} \cdot \frac{[I]}{[M]}$$

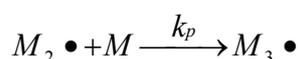
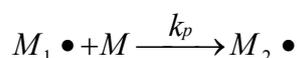
$$R_i = 2k_d [I]$$

Dans la plupart des cas, seule une fraction des radicaux produits va initier des chaînes polymériques. C'est ainsi que l'on définit l'efficacité d'un initiateur,  $f$ , dont la valeur est inférieure à 1. L'équation devient alors :

$$R_i = 2k_d \cdot f \cdot [I]$$

### 2. 1. 2 Phase de propagation

Ce stade de la réaction de polymérisation comprend donc l'addition successive de monomères sur la chaîne de polymère en croissance. Cette phase est plus rapide que la réaction d'amorçage et nécessite une énergie d'activation beaucoup plus faible. Cependant le nombre de collisions efficaces étant faible, cela nécessite un niveau d'énergie et des conditions stériques suffisants. La réaction de deux radicaux entre eux peut aussi se produire mais cela reste négligeable. La cinétique de cette étape peut être décrite par les réactions et équations ci-dessous. La croissance de  $M_1 \bullet$  provoque la formation d'un radical de même nature mais avec une chaîne plus longue d'une unité à chaque addition avec une constante de vitesse de propagation ( $k_p$ ).



Ce qui se résume à :  $M_n \bullet + M \xrightarrow{k_p} M_{n+1} \bullet$  avec une vitesse :

$$R_p = \left( -\frac{dM}{dt} \right)_p = k_p \cdot [M] \cdot [M_n \bullet]$$

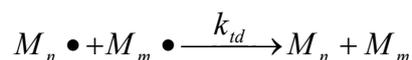
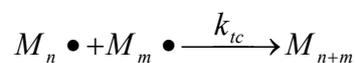
### 2. 1. 3 Réactions de terminaison

Il existe plusieurs types de processus permettant de mettre fin à une réaction de polymérisation.

- Un cas rare correspond à la cyclisation d'une macromolécule en croissance, ce type de désactivation intervient généralement pour une faible part dans les réactions de polymérisation. Le cas le plus fréquent correspond à la collision de deux macromolécules en croissance qui vont s'associer ou se désactiver par transfert d'hydrogène.

- Un autre processus de désactivation procède par la fixation de l'initiateur sur la partie réactive du polymère en croissance. En effet, une partie des radicaux permettant d'initier des réactions de polymérisation vont aussi participer à des réactions de terminaison et ainsi limiter le degré de polymérisation des macromolécules.
- D'autres phénomènes peuvent induire des désactivations : la présence d'impuretés (acides, bases, O<sub>2</sub>...), d'agents inhibiteurs ou de composés retardant la polymérisation. Les inhibiteurs réagissent avec les radicaux dès leur formation et ainsi la phase de propagation ne peut avoir lieu tant qu'il est présent en solution. Ils retardent ainsi la tenue de la réaction de polymérisation en accroissant le temps nécessaire à la phase d'initiation. Les retardateurs présentent le même fonctionnement que les inhibiteurs mais ils n'auront pas une action systématique de neutralisation des centres actifs.
- Les impuretés présentes dans les solvants et les monomères utilisés peuvent ainsi provoquer des phases d'initiation plus ou moins prolongées.

D'un point de vue cinétique, on considérera l'arrêt de croissance de la chaîne par des réactions bimoléculaires entre radicaux suivant des mécanismes de combinaison ou de transfert dont les constantes de vitesse sont  $k_{tc}$  et  $k_{td}$  respectivement.



Mais on peut aussi généraliser :  $M_n \bullet + M_m \bullet \xrightarrow{k_t}$  arrêt de la croissance

Avec  $k_t = k_{tc} + k_{td}$  et  $k_t$  constante de vitesse de terminaison. La vitesse de cette réaction a pour expression :

$$R_p = 2k_t \cdot [M \bullet]^2$$

Avec  $M \bullet$  la concentration globale en radicaux dans la solution

## 2. 2 Vitesse globale des réactions de polymérisation en chaîne

### 2. 2.1 Cas général

La vitesse globale de polymérisation correspond à la vitesse de disparition des monomères qui a lieu lors de l'ensemble du processus de polymérisation. Afin d'obtenir une expression de cette vitesse, il est d'abord nécessaire de supposer que :

- 1-  $k_p$  et  $k_t$  sont indépendantes de la taille du radical en croissance. Ainsi, quelle que soit la longueur de la chaîne, la constante de vitesse de l'étape sera la même pour tous.
- 2- l'hypothèse d'un régime stationnaire selon laquelle la vitesse d'initiation ( $R_i$ ) est égale à la vitesse de terminaison ( $R_t$ ) est vérifiée. Cette hypothèse est valide pour des réactions faisant intervenir des intermédiaires très réactifs et présents à de faibles concentrations ; ce qui est vérifié lors de polymérisations radicalaires en chaîne. Soit :

$$2k_t[M \bullet]^2 = 2k_d \cdot f \cdot [I]$$

$$[M \bullet] = \left( \frac{k_d f [I]}{k_t} \right)^{1/2}$$

La vitesse de disparition des monomères lors de l'initiation et de la propagation est donc donnée par l'expression suivante où  $R_i$  et  $R_p$  sont les vitesses d'initiation et de propagation :

$$\frac{-d[M]}{dt} = R_i + R_p$$

Cependant le nombre de molécules de monomères réagissant lors de l'initiation est très faible comparé à celui de l'étape de propagation, on peut donc négliger  $R_i$  par rapport  $R_p$ . La vitesse globale de la polymérisation devient alors :

$$R_p = k_p \cdot [M] \cdot [M \bullet]$$

En utilisant l'hypothèse du régime stationnaire, l'expression de la vitesse globale devient alors:

$$R_p = k_p \cdot [M] \cdot \left( \frac{k_d \cdot f \cdot [I]}{k_t} \right)^{1/2}$$

Cette équation décrit le cas le plus général d'une réaction de polymérisation en chaîne. Il est ainsi possible de voir la dépendance directe de la vitesse globale vis-à-vis de la racine carrée de la concentration en amorceur et de la concentration en monomère.

Il existe des modifications de cette équation en fonction de certaines variations du système.  
Par exemple :

- Il existe des polymérisations où la vitesse de propagation n'est pas directement proportionnelle à la concentration en monomère. Cela peut être dû à la dépendance entre la vitesse d'initiation et la concentration en monomère. En effet, l'équation de la vitesse globale a été établie à partir d'un postulat : la vitesse d'initiation est indépendante de la concentration en monomère. Or cela n'est pas toujours vérifié : l'efficacité d'un initiateur peut être affectée par la concentration en monomère.  $f = f'[M]$

Dans ce cas on arrive alors à avoir une relation directement proportionnelle entre  $R_i$  et  $[M]$ , et donc  $R_p$  varie en  $[M]^{3/2}$ .

- On obtiendrait le même résultat si la deuxième étape de l'initiation était l'étape cinétiquement déterminante au lieu de la première étape. Ce cas de figure peut se rencontrer lorsque  $k_d > k_i$  ou lorsque la concentration en monomère est faible.

### 2. 2. 2 Cas des réactions de photopolymérisation

La vitesse de formation des radicaux permettant l'initiation du processus est proportionnelle à l'intensité du rayonnement absorbé par la molécule subissant la photolyse. La vitesse d'initiation peut alors s'écrire :

$$R_i = 2 \cdot \phi \cdot I_a$$

Avec  $I_a$  l'intensité du rayonnement absorbé et  $\Phi$  le rendement en radicaux libres formés. Le facteur 2 ne s'applique que pour les initiateurs se décomposant en deux radicaux, s'il n'y a qu'un seul radical de formé par molécule d'initiateur, alors il faut appliquer un facteur 1. On considère toujours être dans un régime stationnaire  $R_i = R_t$  donc :

$$2 \cdot \phi \cdot I_a = k_t [M \bullet]^2$$

Soit une vitesse globale de polymérisation :

$$R_p = k_p \cdot \left[ \frac{\phi I_a}{k_t} \right]^{1/2} \cdot [M]$$

Il faut noter que l'on a accès à l'intensité absorbée,  $I_a$ , par la relation suivante :

$$I_a = \varepsilon \cdot I_0 \cdot [A] \cdot b$$

Où  $I_0$  est l'intensité du rayonnement incident,  $A$  est l'espèce réactive à la photo excitation,  $\varepsilon$  l'absorptivité molaire de l'espèce  $A$  à la fréquence de radiation absorbée et  $b$  est l'épaisseur du système réactionnel subissant l'irradiation. On obtient donc :

$$R_p = k_p \cdot \left[ \frac{\phi \cdot \varepsilon \cdot I_0 \cdot [A] \cdot b}{k_t} \right]^{1/2} \cdot [M]$$

Cette équation ne tient pas compte de la variation d'intensité des radiations incidentes qui peut avoir lieu de par l'épaisseur des récipients. Dans le cas contraire, l'équation se trouve en annexe 1 à la fin de ce chapitre. Or pour la plupart des polymérisations, la quantité de lumière absorbée par la verrerie ne peut être négligée. Cependant les matériaux des capillaires et des puces utilisés lors de ce travail sont en silice ou en verre et la photopolymérisation a lieu à une longueur d'onde de 360 nm, c'est-à-dire là où la transparence du verre aux radiations énergétiques est satisfaisante.

L'intensité du rayonnement délivré par diverses sources lumineuses est souvent donnée dans des unités telles que kcal/sec, kJ/sec, erg/sec soit une puissance, une énergie par unité de temps. Or, l'unité des intensités des équations précédentes est l'Einstein (moles) de quanta lumineux par litre seconde. En utilisant la longueur d'onde ou la fréquence des lampes utilisées, il est possible de passer d'une unité à l'autre.

Cette expression de la vitesse globale de la réaction met en évidence les facteurs influant sur la cinétique de la polymérisation. Dans le cadre d'une photopolymérisation, plusieurs facteurs entrent en ligne de compte : tout d'abord le mélange réactionnel avec la concentration et la réactivité de l'initiateur, la concentration et la nature du monomère, mais aussi les conditions de synthèse avec l'intensité lumineuse incidente et les dimensions du système réactionnel.

### *2. 2. 2 Remarques générales sur les facteurs influençant la polymérisation*

Des travaux décrivant les conditions de synthèse et leur influence sur le polymère obtenu ont été réalisés sur divers types de mélanges mais ne traitent pas du cas particulier des monolithes. Cependant, on peut en tirer quelques conclusions générales sur l'importance de divers paramètres qui correspondent aux équations décrites précédemment.

1- Le monomère est le facteur principal d'un système photoinduit, de par la réactivité ou les propriétés chimiques et physiques qu'il présente. Cependant, en dehors du monomère, d'autres facteurs vont influencer les réactions de photopolymérisation : le type d'initiateur, sa concentration, la présence d'inhibiteur, la température, le spectre d'émission de la lampe et son intensité [6,7].

2- Le choix de l'initiateur et du matériel d'illumination est primordial afin d'obtenir de bonnes conditions pour une photopolymérisation. En effet pour avoir une vitesse de polymérisation suffisante, il faut que le spectre de la lampe UV présente un maximum qui corresponde au maximum d'absorbance de l'initiateur. Un autre paramètre important est l'intensité des radiations émises par la lampe. Ainsi, une irradiation à une longueur d'onde moins appropriée peut être compensée par une intensité plus importante de la source lumineuse [6].

3- La réactivité élevée des acrylates et méthacrylates lors de photopolymérisation a été soulignée ainsi que leur possibilité à être modifiés par la présence de groupements esters sur le polymère [7,8].

Le type de mélange réactionnel étudié lors de ces travaux a été défini dans le chapitre précédent. Brièvement, il s'agit d'un mélange contenant des monomères à base d'acrylates, de solvants porogènes et d'AIBN comme initiateur. L'optimisation de la concentration en initiateur et en monomère ayant déjà été menée, les proportions optimisées ont été conservées [9]. Toutefois, il a fallu déterminer et adapter les conditions de synthèse : choix d'une source lumineuse, temps d'exposition.

### 3. Etat de l'art sur l'influence des paramètres énergie d'irradiation UV et prétraitements du capillaire sur la réaction de polymérisation

#### 3.1 Energie d'irradiation UV

La littérature consacrée à la synthèse et caractérisation de colonnes monolithiques a été peu développée sur l'importance des conditions d'irradiation, leurs conséquences sur le polymère et sur la détermination de conditions optimales de polymérisation. Par ailleurs, peu de précisions sont disponibles sur le choix des conditions d'illumination adoptées par chaque groupe de recherche. Or, dans le paragraphe précédent l'importance de l'intensité

d'irradiation, donc de l'énergie apportée, sur la cinétique de la réaction globale a été soulignée. C'est donc un paramètre essentiel à l'obtention de colonne monolithique présentant de bonnes performances séparatives.

Quelques publications donnent des éléments de réponse sur lesquels il est possible de s'appuyer pour orienter sa stratégie d'optimisation. Par exemple, selon Ngola et al [9], la polymérisation se produit dès  $1 \text{ J/cm}^2$  avec leur matériel d'illumination, calibré à 365 nm. Cependant il est précisé que l'énergie émise est insuffisante pour obtenir une polymérisation complète nécessitant donc une énergie plus importante afin d'obtenir un état d'avancement suffisant de la réaction. La dose énergétique a ainsi été fixée à  $6 \text{ J/cm}^2$  pour leurs synthèses.

Néanmoins, ces remarques résultent de quelques tests prospectifs et non d'une étude complète de l'influence de ce paramètre sur la réaction de polymérisation. D'un point de vue plus général, les conditions d'exposition, comme la distance entre la source et les capillaires par exemple, ne sont pas toujours précisées. Ainsi, d'un groupe de recherche à l'autre, le matériel d'illumination utilisé présente une grande diversité et ne possède généralement pas les mêmes caractéristiques au niveau du spectre d'émission de(s) lampe(s) ou de leur puissance. Les comparaisons sont donc difficiles à établir car il faudrait pour cela connaître l'énergie dispensée par les diverses lampes sur une gamme donnée de longueurs d'onde. Seuls, Yu et al ont mesuré la puissance de rayonnement émise par la lampe mercure-xénon de 500 Watts qu'ils avaient choisie et ce à diverses longueurs d'onde [10]. Il faut noter que la courbe fournissant la puissance de rayonnement en fonction de la longueur d'onde est polymodale : dans ce cas, le maximum émis se situe à 260 nm, mais 254 et 310 nm restent des longueurs d'onde pour lesquelles le rayonnement est encore puissant. C'est certainement pourquoi des temps de polymérisation assez différents sont décrits selon le matériel et l'initiateur utilisés [11-13]. Certains systèmes d'illumination intègrent une mesure de l'intensité émise mais ne précisent pas sur quelle gamme de longueur d'onde cette mesure est faite [9,13].

Il faut aussi noter que le dégagement de chaleur produit par les lampes peut influencer sur le mécanisme de polymérisation lorsque l'initiateur radicalaire est photosensible mais aussi thermosensible. C'est par exemple le cas de l'AIBN que nous utilisons. C'est pourquoi certains protocoles présentent des systèmes de ventilation ou de refroidissement [12].

Un autre point intéressant, relié aux conséquences de l'énergie d'irradiation, est celui de la réalisation d'une fenêtre de détection sur une colonne entièrement polymérisée [9,14]. En effet, un des moyens utilisé est d'exposer le monolithe présent dans la partie de la cellule de

détection à la lampe UV du détecteur de l'appareil d'électrophorèse capillaire. Au bout de quelques heures d'irradiation et sous écoulement électroosmotique, le polymère est éliminé. Il semblerait qu'il dépolymérise par l'action combinée de la chaleur et de l'énergie lumineuse. Ainsi l'exposition prolongée d'un monolithe à base de (méth)acrylate à une forte énergie lumineuse peut être néfaste.

## **3. 2 Traitement de surface du capillaire**

### *3. 2. 1 Définition et description*

Le processus de synthèse d'un monolithe à l'intérieur d'un capillaire comporte une première étape ayant pour but la modification chimique des groupements silanol de la paroi du capillaire, dans le but de pouvoir ancrer le futur polymère aux parois. L'état de surface et la charge potentielle du capillaire sont donc modifiés afin de s'adapter aux fonctionnalités du monolithe qui sera synthétisé. L'importance de cette étape dans l'obtention d'un monolithe a été soulignée par quelques auteurs [9,15], qui ont observé que sans aucune procédure de prétraitement, la colonne n'a pas un comportement régulier : il arrive qu'elle se détache en partie ou en entier des parois lors d'analyses sous champs électriques et qu'elle soit donc plus ou moins éliminée. Un des avantages de cette étape est donc de lier de façon covalente le polymère à la paroi du capillaire et ce de façon uniforme et homogène. De plus, si le polymère est lié aux parois, les effets de bords devraient être minimisés lors d'analyses et donc permettre d'obtenir de meilleures efficacités. Cette modification comprend généralement plusieurs étapes.

#### 3. 2. 1. 1- Activation des sites sous forme silanol

Tout d'abord des étapes de rinçage interviennent afin d'activer la surface du capillaire. La première étape consiste en un traitement en milieu très basique afin d'obtenir une dépolymérisation locale du réseau silicate permettant d'augmenter le nombre de groupements silanol présents, sous forme de groupements Si-O<sup>-</sup> et d'éliminer des impuretés à la surface. Ce rinçage est suivi d'une étape de lavage à l'eau purifiée, puis un rinçage acide intervient permettant d'obtenir des groupements silanol sous forme Si-OH à la surface du capillaire.

#### 3. 2. 1. 2- La réaction de silanisation

La réaction de silanisation a été largement employée et développée pour d'autres techniques analytiques, en CPL pour le greffage de divers groupements sur des particules de phase stationnaire de silice [16], ou pour le greffage de phases stationnaires dans des capillaires de

silice pour la chromatographie en phase gazeuse [17]. Elle fait intervenir un composé comportant deux groupements fonctionnels habituellement appelé agent silanisant. Celui-ci comprend un groupement silane trifonctionnel afin de pouvoir se lier à la paroi de silice du capillaire et une fonction (méth)acrylate dans notre cas, susceptible de pouvoir participer à la réaction de polymérisation (Figure 31). Ce traitement de surface permettra ainsi d'accrocher de façon covalente le monolithe au capillaire et de façon homogène sur l'ensemble de la surface du capillaire.

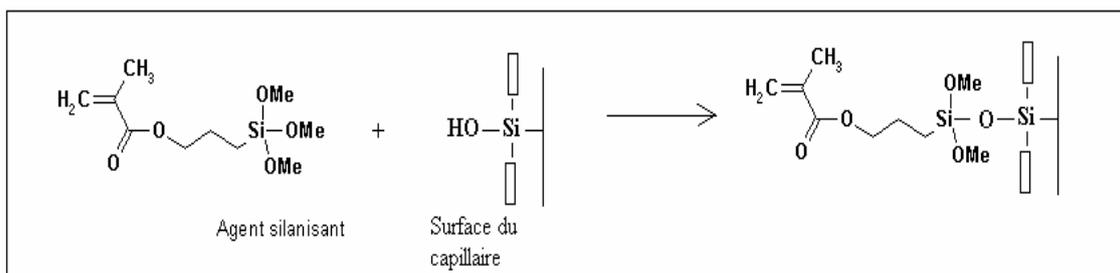


Figure 31: Schéma représentatif de la réaction de silanisation, étant donné que le silane est trifonctionnel, il est possible que les autres groupements silane réagissent avec la paroi du capillaire.

Il existe divers agents silanisants qui possèdent des fonctions vinyliques variées en fonction du monolithe à polymériser. Le plus utilisé est le 3-(triméthoxysilyl) propyl méthacrylate appelé aussi  $\gamma$ -méthacryloxypropyl triméthoxysilane (3-TMSM ou  $\gamma$ -MAPS) pour les polymères à base de (méth)acrylates. Lors de la synthèse de monolithes chargés négativement, la réaction de silanisation met en jeu un réactif neutre. Si quelques groupements silanol résiduels subsistent sur les parois du capillaire après synthèse du polymère, ils ne perturberont pas l'orientation du flux électroosmotique. Il en va tout autrement lorsqu'il s'agit de réaliser une colonne chargée positivement. En effet si quelques groupements silanol résiduels persistaient, ils perturberaient l'établissement du flux électroosmotique. C'est pourquoi l'utilisation d'un agent silanisant chargé positivement est nécessaire [18]. En effet les charges négatives des silanols restants seront « masquées » par les charges positives des groupements greffés. L'obtention de matériaux polymériques chargés positivement est ainsi réalisable sans que la paroi chargée négativement du capillaire perturbe l'homogénéité du champ électrique.

### 3. 2. 2 Polymérisation sans aucun prétraitement

Certaines publications font état de synthèses monolithiques en capillaire sans étapes de rinçage ni silanisation [11,12,19]. Les colonnes ainsi obtenues présentent une bonne stabilité au cours des analyses. Néanmoins, nos premières synthèses de monolithes ne comportaient

pas de procédure de prétraitement elles aussi et sur sept colonnes, la phase stationnaire n'était pas accrochée aux parois du capillaire pour trois d'entre elles. En effet, le polymère se déplaçait dans le tube sous l'effet de la pression ou de la tension. C'est pourquoi les solutions pouvant être apportées à ce problème ont été examinées.

### 3. 2. 3 Polymérisation utilisant un mélange réactionnel contenant un agent silanisant

La plus simple des modifications du protocole de synthèse consiste à ajouter un faible pourcentage d'agent silanisant au mélange à polymériser [9,14]. Cette procédure présente l'avantage de pouvoir lier le monolithe de façon covalente aux parois du capillaire sans ajouter d'étape préalable à la synthèse. La réaction de silanisation se produit alors de façon aléatoire et concomitante à la polymérisation. Cependant, sur huit colonnes que nous avons synthétisées, une colonne a présenté des déplacements de l'ensemble de la phase. Pour les autres colonnes, des tassements du monolithe ont été observés par microscopie après une soixantaine d'analyses. Cela peut s'expliquer par un attachement moins uniforme du polymère comparé à une procédure de prétraitement dû au fait que l'agent silanisant est inclus dans le mélange réactionnel. De plus, cette méthode a pour autre conséquence d'introduire les fonctions silane du monomère silanisant en tant que groupement fonctionnel de la phase stationnaire, son uniformité s'en trouvant alors affectée. Enfin, étant donné l'absence de procédure de prétraitement, les groupements silanol restants à la surface du capillaire peuvent prendre part à la génération du flux électroosmotique et présenter une hétérogénéité des charges de surface par rapport à celles portées par le monolithe.

### 3. 2. 4 Description des différents protocoles de prétraitement et de silanisation

Il existe un nombre important de protocoles permettant de préparer la surface du capillaire, plus ou moins répandus. Le tableau I résume les étapes des principaux protocoles existants et les groupes qui les utilisent.

Référence	Rinçage basique	Rinçage acide	Conditions entre les rinçages	Conditions de la silanisation	Conditions de rinçage et séchage
[20]				Solution acide pH=3,5 (acide acétique) de 1,7 mole/L de $\gamma$ -MAPS – 1h	
[21]	NaOH 0,1 M 30 min	HCl 0,1 M lavage	Eau	Solution de $\gamma$ -MAPS à 10% dans l'acétone (v/v) – 24h	
[22]	NaOH 0,2 M 30 min	HCl 0,2 M 30 min	Eau	Solution de $\gamma$ -MAPS à 30% dans l'acétone (v/v) – 24h	Rinçage à l'eau distillée

[23]	NaOH 1M, 2h à 100°C		Eau - 30 min puis acétone et séchage à l'azote pendant 1h à 120°C	Solution de $\gamma$ -MAPS à 50% (v/v) dans le DMF avec 0,1% de DPPH 6h à 120°C	Rinçage par du DMF puis séchage à 120°C sous azote
[24]	NaOH 0,2M 30 min	HCl 0,2M 30 min	Eau distillée	Solution de $\gamma$ -MAPS à 30% dans l'acétone (v/v) - 24h	Rinçage au methanol puis eau
[25]	NaOH 1M 30 min	HCl 0,1M 30 min	Eau - 30 min	Solution de $\gamma$ -MAPS à 50% (v/v) dans l'acétone 40 min	Rinçage à l'acétone puis eau
[26]				Solution à 20% de $\gamma$ - MAPS, 30% d'acide acétique glacial et 50% d'eau (v/v) réaction pendant la nuit	
[18,27]	NaOH 1M 30 min	HCl 0,1M 30 min	Eau - 30 min	Solution de $\gamma$ -MAPS à 50% (v/v) dans l'acétone 12 h	Rinçage au methanol puis eau séchage sous flux d'azote
[28]	NaOH 1M 30 min	HCl 0,1M 30 min	Eau - 30 min	Solution de $\gamma$ -MAPS à 50% (v/v) dans du methanol - 12 h	Rinçage au methanol puis eau séchage sous flux d'azote
[29]	NaOH 0,2 M 30 min	HCl 0,2 M 30 min	Eau distillée puis éthanol	Solution de $\gamma$ -MAPS à 20% dans l'éthanol dont pH = 5 par ajout d'acide acétique - 1h	Rinçage à l'éthanol puis à l'eau
[30]	NaOH 0,2 M 1h		Eau puis méthanol séchage sous azote	Solution de $\gamma$ -MAPS à 50% (v/v) dans du methanol - 12 h	Rinçage au méthanol puis eau
[9]				Solution à 20% de $\gamma$ - MAPS, 30% d'acide acétique glacial et 50% d'eau (v/v) réaction pendant la nuit	Rinçage et stockage dans le solvant de polymérisation
[15]	NaOH 1M (a)			4 $\mu$ L de $\gamma$ -MAPS ds 1 mL d'acide acétique 6mM - 1h au moins	Rinçage à l'eau puis séchage sous azote
	NaOH 1M ? min(b)			Solution de $\gamma$ -MAPS à 50% (v/v) dans du methanol - 12 h	Rinçage au méthanol puis à l'eau
	NaOH 1M 2h à 120°C (c)		Eau distillée 30 min puis acétone et séchage à l'azote pendant 1h à 120°C	Solution de $\gamma$ -MAPS à 50% (v/v) dans le DMF avec 0,1% de DPPH 6h à 120°C	Rinçage par de l'acétone puis séchage sous azote
[13]	Solution saturée de (NH <sub>4</sub> )HF <sub>2</sub> , 15 min		Eau puis séchage à 80°C, 1h	Solution de pyridine à sec, toluène, et de vinyltrichlorosilane (9 :5 :1), 6h à 50°C	Rinçage avec un mélange d'acétone et d'eau puis séchage 1h à 80°C

Tableau 1 : Références et description des principaux protocoles de prétraitement employés. L'utilisation d'un inhibiteur de polymérisation, le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl hydrate) permet d'éviter une autopolymérisation du  $\gamma$ -MAPS par les groupements vinyle à des températures élevées.

Ce tableau appelle plusieurs commentaires :

- Concernant l'activation des groupements silanol, trois procédures ne font aucun rinçage soit aucune préparation de la surface du capillaire. Néanmoins, le pH du milieu réactionnel est acide pour l'étape de silanisation. Deux sur quatorze n'emploient pas de rinçage acide entre le rinçage basique et la silanisation. Dans la majeure partie des cas, les informations concernant cette étape ne sont pas suffisamment précises pour connaître toutes les étapes mises en œuvre.
- La plus grande différence se situe surtout au niveau de la composition du mélange réactionnel, concentration en  $\gamma$ -MAPS, solvant, temps de réaction. Deux types de milieu réactionnel sont très employés, l'un aqueux et l'autre organique mais miscible à l'eau.
- Certains utilisent des protocoles décrits par d'autres tout en adaptant certaines conditions comme le temps de réaction des diverses étapes ou la concentration des solutions. Ainsi, un des plus repris est celui décrit par Hjerten [21]. Celui-ci avait décrit auparavant un autre protocole, cependant aucun commentaire ni aucune évaluation de ces deux protocoles n'ont justifié le changement [20-22].
- Tous présentent des monolithes dont les performances sont satisfaisantes, cependant la reproductibilité de la synthèse n'a pas été testée.
- L'étude entreprise par Buszewski et al [15] reprend et adapte quelque peu trois protocoles utilisés couramment dans la littérature : deux issus de Hjerten [20,21] et un d'Horvath [23]. Leur étude compare plusieurs procédures par des mesures d'angles de contact en milieu aqueux et des images MEB [15]. La méthode de l'ascension capillaire, permet de calculer les angles de contact pour les matériaux et revêtements en tube ouvert. Plus la surface de la paroi du tube est hydrophile, plus l'angle de contact sera faible et inversement. Ainsi, un capillaire silanisé présente un certain nombre de groupements méthacrylate à sa surface et donc une surface plus hydrophobe que celle d'un capillaire de silice vierge. L'angle de contact mesuré pour un capillaire en silice vierge selon [15] est ainsi de  $24^\circ$ , celui d'un capillaire silanisé selon la procédure décrite est de  $75^\circ$  [23]. La mesure des angles de contact sur des capillaires en silice vierge donne la même valeur de  $24^\circ$ . Ainsi, les trois prétraitements, décrits dans le Tableau 1, donnent des valeurs plus élevées de l'angle de contact ce qui prouve qu'il y a bien eu une réaction de silanisation des parois du capillaire :

- Les procédures (a) et (b) [15] possèdent des valeurs d'angle proches, environ  $60^\circ$ , la procédure (c) possède une valeur plus élevée que les autres,  $80^\circ$ . La surface obtenue par le

protocole (c) présente donc la plus grande hydrophobie, et donc certainement le plus fort taux de groupements méthacrylates présents sur les parois. Ce dernier prétraitement présente la particularité d'être effectué à de plus hautes températures (120°C) et fait intervenir de ce fait un inhibiteur de polymérisation, le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl hydrate).

- Des observations par microscopie électronique à balayage (MEB) ont été effectuées pour juger de la régularité de la polymérisation [15]. Pour le prétraitement (b), les observations présentent des discontinuités du polymère aux abords des parois du capillaire. Les deux autres types de protocoles, (a) et (c) ne donnent pas lieu à ce type d'observation. C'est pour toutes ces raisons que le prétraitement (c), rinçage basique à chaud, silanisation dans le DMF, semble le plus performant et a été choisi comme protocole de référence par ce groupe de recherche [15].

- Lors de la comparaison des procédures a, b, c, issue de [15], aucune de celles décrites ne comporte d'étape de rinçage acide, même quand la réaction de silanisation n'est pas menée en milieu acide (procédure b et c).

- Des divers prétraitements cités dans le Tableau 1, peu d'évaluations ont été menées concernant leur portée au niveau des performances analytiques. L'étude menée par Buszewski [15] sur l'influence de traitements de surface sur la polymérisation, c'est-à-dire sur le monolithe, n'est étudiée que par imagerie MEB. Ainsi la modification des propriétés séparatives due aux modifications structurales du polymère n'est pas envisagée.

- Quelques observations ont aussi été faites par une autre équipe [9] sur des colonnes préalablement silanisées par rapport à des colonnes non silanisées en ce qui concerne la vitesse électroosmotique, le facteur de rétention, l'efficacité des colonnes et la résolution observée. Ainsi une colonne non prétraitée présente une vitesse électroosmotique plus faible mais des valeurs de  $k'$  plus importantes. Concernant l'efficacité et la résolution, elles ne semblent pas affectées par un prétraitement. Cependant, il s'agissait ici aussi de résultats prospectifs.

C'est pourquoi il nous a semblé intéressant de comparer plusieurs prétraitements et d'étudier leur influence sur les performances séparatives (facteur de rétention, efficacité) des colonnes obtenues. En effet, un meilleur attachement du monolithe aux parois du capillaire doit diminuer les effets de bords qui peuvent se produire et ainsi améliorer les caractéristiques séparatives de ce type de matériau.

## 4. Influence du prétraitement du capillaire sur les caractéristiques séparatives et optimisation

### 4.1. Conditions de prétraitement

Après avoir fait une synthèse des principales méthodes employées et des résultats obtenus, plusieurs facteurs nous semblent importants pour le prétraitement des capillaires.

- Le rinçage basique est dans tous les cas indispensable. Il permet de dissoudre partiellement le réseau de silice et donc des sites silanol basiques plus facilement activables sous forme acide, car libérés de toute impuretés (cations métalliques ou alcalins). De plus, il semble que la température ait un effet sur cette étape.
- Le rinçage acide est nécessaire, puisque la réaction de silanisation a lieu avec les silanols sous forme acide (forme Si-OH). Cependant, elle peut être omise si la réaction de silanisation est conduite en milieu acide.
- Solvants, concentration en  $\gamma$ -MAPS et durée de la réaction sont variables d'une silanisation à une autre. Il ne se dégage pas d'avantage de certaines conditions par rapport à d'autres.

Afin d'avoir plus d'information sur cette étape de prétraitement et sur son effet sur les propriétés des monolithes ainsi obtenus, nous avons étudié les réactions de silanisation. Celles-ci sont réalisées soit en milieu acide acétique à température ambiante (25°C), soit en milieu DMF à une température de 70°C. Deux rinçages basiques ont été envisagés soit à température ambiante pendant 30 minutes soit à une température de 90°C pendant 90 minutes. Les protocoles de ces quatre procédures, A à C sont décrits dans le Tableau 2.

Procédures de prétraitement	Etape basique (NaOH 1M)	Etape acide (HCl 0.1 M)	Silanisation avec 3-TMSM
<b>A</b>	30 min, 25°C	aucune	Acide acétique 15h 25 °C
<b>B</b>	30 min, 25°C	30min, 25°C	DMF 5h 70 °C
<b>C</b>	90 min, 90°C	aucune	Acide acétique 15h 25 °C
<b>D</b>	90 min, 90°C	45 min, 90°C	DMF 5h 70 °C

Tableau 2 : Description des protocoles de prétraitement testés.

Des capillaires d'environ 37 cm de longueur totale ont été prétraités (trois pour les protocoles A et B, deux pour les protocoles C et D) et la polymérisation de ceux-ci s'ensuit dans les 5 jours par remplissage avec le même mélange à polymériser dont le monomère fonctionnel est le butylacrylate (composition décrite en annexe 2). La polymérisation a lieu avec une énergie d'irradiation totale de 6 J/cm<sup>2</sup>, puis la colonne ainsi obtenue est rincée, conditionnée sous champ électrique et partiellement sous pression par une phase mobile constituée d'un mélange d'ACN et de tampon phosphate 5 mM, pH=7.1, 80/20 (v/v). Finalement, les premières analyses test peuvent être effectuées pour l'évaluation des performances.

## 4. 2. Evaluation des performances (méthodologie)

### 4. 2. 1 Analyses électrochromatographiques

#### 4. 2. 1. 1- Conditions séparatives

Le mélange test utilisé pour obtenir des courbes de van Deemter comporte 4 composés issus d'une même série d'alkylbenzènes linéaires : éthylbenzène, propylbenzène, butylbenzène et pentylbenzène. Ils sont injectés électrocinétiquement à 3kV pendant 3sec à la concentration de  $2,5 \cdot 10^{-3}$  mol/L. La phase mobile utilisée pour la séparation présente la même composition que celle utilisée pour le rinçage du capillaire, soit un mélange d'ACN et de tampon phosphate 5 mM, pH=7,1, (80:20, v/v). Le marqueur de flux électroosmotique utilisé pour toutes les analyses est le formamide à la concentration de  $10^{-2}$  mol/L. La Figure 32 représente un électrochromatogramme typique d'une séparation du mélange test utilisé pour le tracé des courbes de van Deemter. Les quatre composés tests sont séparés en moins de quatre minutes avec des efficacités comprises entre 250 et 300 000 plateaux/m.

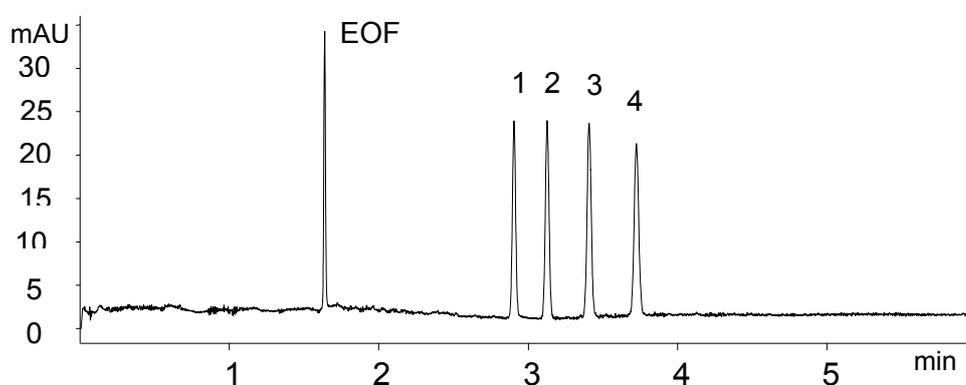


Figure 32 : Electrochromatogramme du mélange test contenant les 4 alkylbenzènes effectués sur une colonne à base de butylacrylate  $l = 26,6$  cm, ayant subi le protocole D ; longueur totale du capillaire :  $L = 35,1$  cm, diamètre interne 100  $\mu\text{m}$ . Tension : 30kV, électrolyte : ACN- tampon phosphate 5mM pH=7,1 (80 :20, v/v), détection à 200 nm. Avec (EOF) formamide, (1) éthylbenzène, (2) propylbenzène, (3) butylbenzène, (4) pentylbenzène.

#### 4. 2. 1. 2- Courbes de van Deemter

Après quelques analyses permettant de vérifier la constance des performances analytiques de la colonne, le mélange test est analysé sous différentes tensions, donc à différentes vitesses électroosmotiques, afin d'établir une courbe de van Deemter. Trois répétitions des analyses sont effectuées pour chaque tension (5, 10, 15, 20, 25, 30 kV) permettant d'obtenir une bonne représentativité des résultats.

Tout d'abord, les couples de données (vitesse de la phase mobile – hauteur de plateau) obtenus pour chaque colonne issue d'un même prétraitement sont réunis en un même ensemble. Ensuite les coefficients de l'équation de van Deemter sont ajustés par l'utilisation de la fonction Excel Solveur du programme Microsoft Excel, et permettent d'obtenir une courbe ajustée. Cet accès aux coefficients d'une courbe permettra de comparer les divers prétraitements. Grâce aux valeurs de chacun des coefficients il sera aussi possible d'évaluer la contribution des origines de l'élargissement des pics ainsi que leur évolution en fonction des protocoles appliqués. Les valeurs des facteurs de rétention des composés tests pourront aussi être étudiées.

#### *4. 2. 2 Images MEB*

Après caractérisation électrochromatographique, des observations MEB et clichés de sections transversales de chaque colonne ont été réalisés par microscopie électronique à balayage. Les coupes transversales des colonnes sont réalisées en utilisant un coupe-capillaire. Celles-ci sont effectuées sur des matériaux préalablement séchés à l'air et nécessitent une métallisation préalable, toujours effectuée à l'or.

#### **4. 3. Comparaison des méthodes de prétraitement par les images MEB**

Les observations effectuées par microscopie électronique à balayage confirment une réticulation efficace entre le monolithe et la surface silanisée ainsi qu'une bonne homogénéité générale du polymère poreux pour l'ensemble des dix colonnes réalisées. La Figure 33 présente une image MEB représentative de chaque prétraitement. On peut voir que l'accrochage du monolithe aux parois du capillaire est meilleur pour les procédures C et D, ce qui semble indiquer qu'un traitement basique prolongé à chaud a un effet certain sur la structure du monolithe. En effet, des macropores et des nodules plus larges sont visibles sur les images correspondant aux colonnes ayant subi les prétraitements A et B comparés aux colonnes obtenues par les procédures C et D. Les observations en C et D présentent aussi une

plus haute surface développée de la phase stationnaire ce qui doit ainsi fournir un meilleur accès à la phase stationnaire pour les solutés et la phase mobile et ainsi permettre un meilleur transfert de masse diffusif. Cela devrait réduire l'élargissement de la bande de soluté généré par une moindre résistance au transfert de masse vers la phase stationnaire et la diminution des effets de bords.

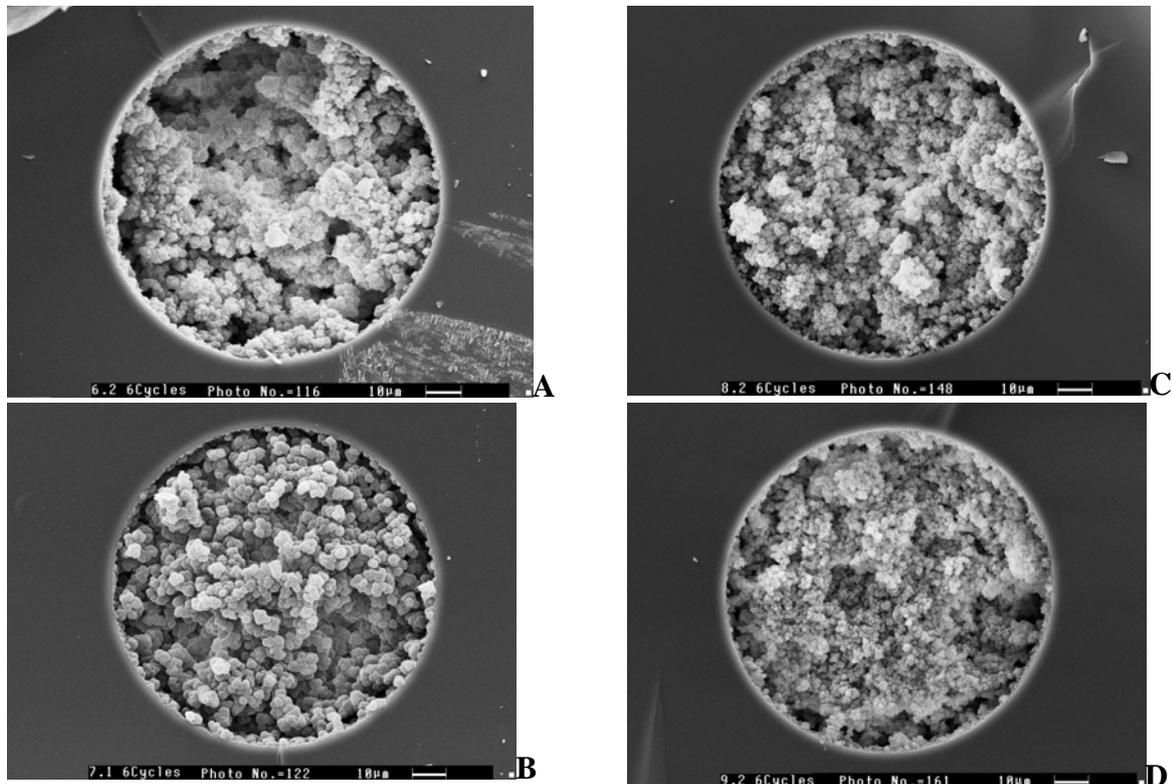


Figure 33 : Observations par microscopie électronique à balayage de colonnes monolithiques à base de butylacrylate dans des capillaires de silice vierge de 100 µm de diamètre interne. Chaque vue correspond à un des prétraitements testés : A, B, C, D.

#### 4. 4. Comparaison des méthodes de prétraitement par les facteurs de rétention

Le facteur de rétention,  $k'$ , caractérise les interactions développées par le soluté entre la phase stationnaire et la phase mobile en fonction de leur nature et sans tenir compte de paramètres géométriques de la colonne.  $k' = K \cdot V_s/V_m$  avec  $V_s$  le volume de phase stationnaire et  $V_m$  le volume de phase mobile et  $k$  la constante de distribution du soluté entre les deux phases.

Etant donné que toutes les colonnes ont été synthétisées à partir du même mélange de monomères, les groupements fonctionnels développés par chaque colonne doivent être les mêmes. De plus la phase mobile utilisée possède la même composition pour toutes les analyses effectuées. Cependant, le coefficient de distribution du soluté entre les deux phases,  $K$ , peut varier en fonction des modifications de la polymérisation. Par ailleurs,  $k'$  dépend aussi du rapport des volumes des deux phases. Les valeurs moyennes du facteur de rétention

et du coefficient de variation (CV) associé ont été établies pour chaque prétraitement quand le nombre de colonne était suffisant. Des valeurs comprises entre 1,3 et 1,7 et des CV de l'ordre de 15 % ont été obtenus pour le butylbenzène quel que soit le prétraitement. On peut en conclure que les variations du facteur de rétention ne sont pas influencées par le type de prétraitement employé. Le composé le plus retenu, le pentylbenzène, n'a pu être étudié car le nombre d'analyses n'est pas suffisant.

#### **4. 5. Comparaison des méthodes de prétraitement par les courbes de van Deemter**

L'efficacité d'une colonne est mesurée par le nombre de plateaux  $N$  qu'elle contient. Pour comparer des colonnes de longueurs variées on utilise le paramètre  $H$  correspondant à la hauteur équivalente à un plateau théorique avec  $H = L/N$ . C'est ce dernier qui permet la comparaison des courbes de van Deemter de colonnes différentes. En effet, il n'est pas possible d'utiliser de grandeur réduite en l'état actuel des connaissances sur les monolithes, aucun paramètre issu des phases stationnaires n'ayant été défini dans l'ignorance d'une dimension caractéristique des phases stationnaires équivalentes au diamètre des particules pour les colonnes particulaires.

L'influence de la procédure de prétraitement sur l'évolution de la hauteur de plateau théorique en fonction de la vitesse de la phase mobile est présentée sur le graphe de la figure 34. Les méthodes C et D, ayant subi des rinçages basiques à chaud permettent d'obtenir des colonnes plus efficaces. Il est sûr que le rinçage basique à chaud doit dissoudre la silice et conduit ainsi à une augmentation du nombre de groupements silanol à la surface de capillaire. Ces derniers étant modifiés chimiquement, les capillaires prétraités présentent de nombreux groupements méthacrylate à la surface qui doivent jouer un rôle dans la cinétique de la réaction de polymérisation. En effet, cette réaction est menée de façon plus homogène car réalisée simultanément à partir à la fois des bords du capillaire et du centre.

Les méthodes A et C présentent une plus grande dispersion de leurs efficacités par rapport aux méthodes B et D, indiquant une meilleure répétabilité des synthèses quand ces derniers sont réalisés dans le DMF à 70°C plutôt que dans l'acide acétique à 25°C.

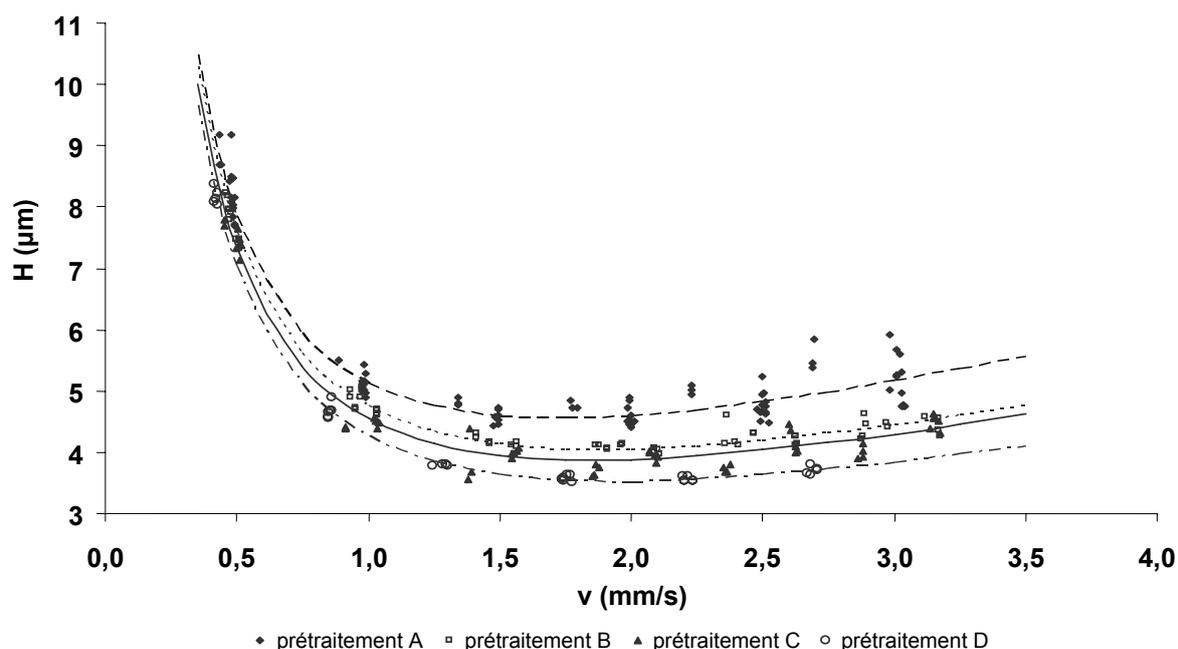


Figure 34 : Influence des quatre procédures de prétraitement sur l'allure des courbes de Van Deemter pour le butylbenzène. La courbe moyenne de van Deemter et les points expérimentaux ont été représentés pour chaque prétraitement.

Afin d'évaluer de façon plus approfondie l'influence des procédures de prétraitement sur l'élargissement d'une bande de soluté, les trois coefficients de l'équation de Van Deemter ont été déterminés. Les résultats obtenus pour l'un des composés les plus retenus : le butylbenzène ( $\log P = 4,13$ ) sont présentés dans le Tableau 3 comme composé modèle. Les coefficients de variation n'ont pas toujours été calculables du fait du peu de colonnes disponibles.

Coefficient de van Deemter	Prétraitement A	Prétraitement B	Prétraitement C	Prétraitement D
A	0.72	0.51	0.33	0.23
B	3.28	3.31	3.27	3.19
C	1.11	0.94	0.96	0.84

Tableau 3 : valeurs des coefficients de l'équation de van Deemter ajustées selon la procédure de prétraitement. Valeurs correspondant au butylbenzène.

Le coefficient B de cette équation mesure l'apport de la diffusion longitudinale à l'élargissement des pics et semble être indépendant du protocole de prétraitement. Etant donné qu'il est relié à la tortuosité,  $\gamma$ , et au coefficient de diffusion moléculaire,  $D_m$  :  $B = 2 \gamma D_m$ , il est possible de conclure que quel que soit le type de prétraitement la tortuosité de la phase stationnaire varie peu.

Le coefficient A représente l'influence des phénomènes d'anisotropie d'écoulement dus au caractère plus ou moins hétérogène de la phase stationnaire. L'évolution de ce paramètre présente une décroissance manifeste de la méthode A à la méthode D, laissant supposer que les diverses modifications des procédures sont bénéfiques à l'obtention d'une structure homogène. Cette conclusion est par ailleurs en accord avec les observations MEB réalisées.

La faible valeur du coefficient C reste une des principales caractéristiques des colonnes monolithiques utilisées en ECC, par rapport à la CPL. Ce paramètre représente la résistance au transfert de masse d'un soluté. C'est pour cette raison que les courbes de Van Deemter présentent une faible remontée aux vitesses élevées en électrochromatographie par rapport à la CPL conventionnelle. L'évolution du coefficient C en fonction des protocoles présente une décroissance du A au D. Cette observation ajoute encore du crédit à cette dernière méthode de prétraitement. Par ailleurs, pour toutes les colonnes testées, le paramètre C obtenu pour chaque composé du mélange test décroît lorsque le facteur de rétention augmente.

Des tendances similaires dans la variation des coefficients A, B et C ont été observées pour les autres composés du mélange test. C'est pour l'ensemble de ces raisons que le prétraitement D a été choisi pour la synthèse des monolithes à venir. En plus des critères d'études de l'influence de plusieurs types de prétraitement tels que la mouillabilité ou les caractéristiques séparatives, il serait intéressant de voir dans quelle mesure ces prétraitements influent sur la durée de vie d'une colonne. Une étude du vieillissement des colonnes obtenues aurait permis d'apporter quelques éléments de réponse.

#### **4. 6. Conclusions**

Les meilleures conditions de prétraitement correspondent à un rinçage basique prolongé à chaud suivi d'un rinçage acide à chaud et enfin une polymérisation réalisée dans le DMF à 70°C. Par conséquent le prétraitement D a été retenu pour les synthèses de colonnes qui ont suivi cette étude. Nous n'avons pas essayé de réduire les temps des deux rinçages et de la réaction de silanisation.

## 5. Optimisation de l'énergie d'irradiation imposée sur l'obtention d'un matériau analytique

### 5. 1. Choix et description des protocoles opératoires

Pour cette étude, plusieurs énergies d'irradiation ont été appliquées, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 20, 50 J/cm<sup>2</sup>, lors de la synthèse de colonnes. Au moins trois colonnes ont été synthétisées pour chaque énergie, excepté à 20 et 50 J/cm<sup>2</sup> pour lesquelles une seule colonne a été réalisée. Chaque colonne a subi la même procédure de prétraitement, D décrite en 3.1, et la phase a été synthétisée à partir du même mélange de monomère à base d'hexylacrylate (Annexe 3). Après synthèse des monolithes, les colonnes sont rincées avec une phase mobile de même composition que celle servant pour tester : ACN- tampon phosphate 5 mM, pH = 7,1 (80:20, v/v).

Le matériel d'illumination utilisé au cours de ces études est une chambre d'illumination comportant six lampes UV calibrées à 360 nm d'une puissance de 15 W chacune. Il est possible de programmer l'appareil en intensité ou en énergie. La valeur énergétique maximale imposable est 1 J/cm<sup>2</sup>. Pour aller au-delà de cette valeur, il faut réitérer le programme.

Après quelques analyses permettant de vérifier la résistance de la colonne et ses performances analytiques, un mélange test est analysé sous différentes tensions afin d'établir trois courbes de Van Deemter consécutives par colonne. Chaque courbe a été réalisée avec deux points pour chaque tension imposée, soit six points au total. Comme précédemment, à chaque courbe ajustée correspond un jeu de coefficients A, B, C obtenu par la fonction Solveur du programme Microsoft Excel.

Des observations par MEB ont aussi été réalisées sur chaque colonne. Des coupes ont aussi été réalisées en plusieurs points d'une même colonne afin d'obtenir une meilleure représentativité des observations réalisées et ce pour chaque énergie étudiée.

### 5. 2. Evaluation des performances

#### 5. 2. 1 Par électrochromatographie

Le mélange test utilisé pour obtenir des courbes de van Deemter est le même que celui utilisé précédemment et comporte 4 composés (éthylbenzène, propylbenzène, butylbenzène et pentylbenzène), injectés électrocinétiquement (3kV, 3sec) à la concentration de  $2,5 \cdot 10^{-3}$  mol/L. La phase mobile utilisée pour la séparation présente la même composition que celle

utilisée pour le rinçage du capillaire, soit un mélange d'ACN et de tampon phosphate 5 mM, pH=7.1, (80:20 v/v). Le marqueur de flux électroosmotique utilisé pour toutes les analyses est le formamide à la concentration de  $1.10^{-2}$  mol/L.

Après quelques analyses permettant de vérifier la constance des performances analytiques de la colonne, le mélange test est analysé sous différentes tensions, donc à différentes vitesses électroosmotiques, afin d'établir une courbe de van Deemter : (5, 10, 15, 20, 25, 30 kV). Le même type de traitement des données, que celui décrit dans le point précédent utilisant la fonction Solveur de Microsoft d'Excel, a été mené.

Un traitement statistique des données a aussi été mené, étant donné que trois colonnes ont été synthétisées par énergie et que chaque colonne a donné lieu à trois courbes de Van Deemter. Il s'agit d'une structure d'expériences en plan pyramidal à deux facteurs contrôlés. En effet, le premier facteur correspond aux variations inter-colonnes, pour une même énergie, le deuxième correspondant aux variations inter-énergie. La Figure 35 présente la structure des expériences réalisées :

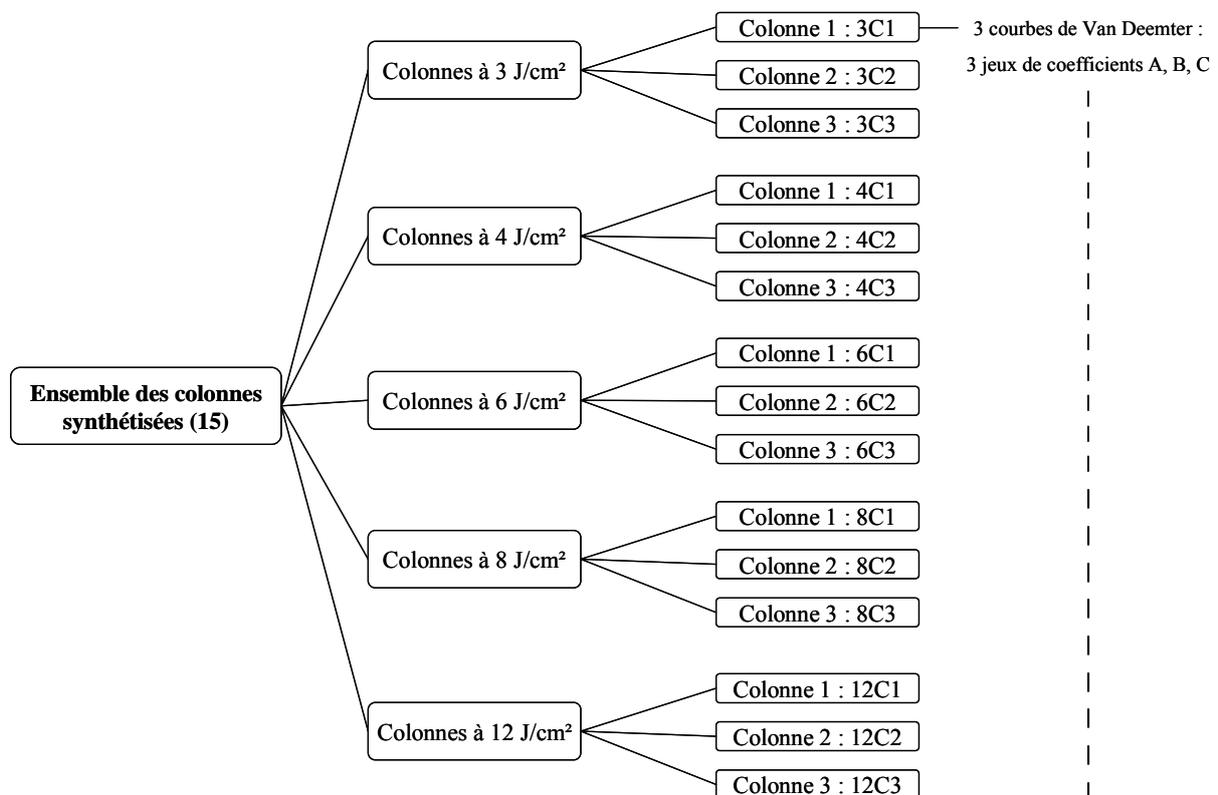


Figure 35: Schéma descriptif de l'ANOVA à plan pyramidal établi pour étudier l'influence des facteurs colonnes et énergies sur la dispersion des résultats.

La particularité d'un plan pyramidal réside dans le fait que chaque modalité du second facteur de variation (ici la colonne) est conditionnée par les modalités du premier facteur de variation (ici la dose énergétique imposée). Les modalités du facteur colonne correspondent donc au nombre de colonnes synthétisées par niveau énergétique. En procédant à l'analyse de la variance (ANOVA) il sera ainsi possible d'étudier si la dispersion inter-colonnes pour une même énergie et si la dispersion entre les énergies sont significativement différentes. Les réponses relevées pour faire cette étude ont été les paramètres A, B et C des courbes de Van Deemter associées à chaque colonne. Ces analyses de la variance ont été réalisées pour un composé non retenu, le formamide, et pour le butylbenzène. Trois ANOVA, une pour chaque coefficient, ont été réalisées par composé. Un test de comparaison des variances au seuil de 5 % a été utilisé pour évaluer si les facteurs contrôlés, dose énergétique et colonne induisent une dispersion des résultats plus importante que la variance résiduelle, permettant de conclure à la mise en évidence ou non d'une influence significative de chaque facteur sur les résultats produits.

#### 5. 2. 2 *Par MEB*

Après caractérisation électrochromatographique, des analyses de sections transversales de chaque colonne ont été réalisées par microscopie électronique à balayage. Plusieurs coupes ont été réalisées sur toute la longueur du monolithe et cela pour une colonne de chaque énergie. Ces analyses sont effectuées sur des matériaux préalablement séchés à l'air et nécessitent une métallisation préalable, toujours effectuée à l'or.

### **5. 3. Comparaison des énergies d'irradiation par les images MEB**

Afin de vérifier l'homogénéité des caractéristiques structurales des monolithes, des coupes ont été réalisées en plusieurs points d'une même colonne. Une certaine variabilité dans la forme ou le diamètre des nodules ainsi que dans la densité du polymère peut être distinguée pour une même colonne ainsi que pour des colonnes synthétisées avec la même énergie, Figure 36. C'est pourquoi plusieurs échantillons doivent être collectés le long d'une même colonne dans le but d'éviter de dresser des conclusions sur des variations d'échantillonnage.

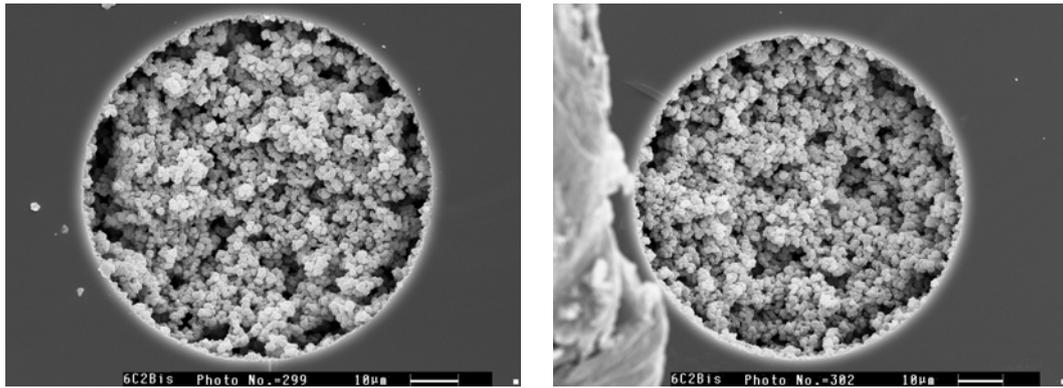


Figure 36 : Images MEB de la même colonne monolithique, échantillons issus de deux prélèvements différents, capillaires de silice de diamètre interne de 75  $\mu\text{m}$ , mélange à base d'hexylacrylate. Polymérisations réalisées à 6  $\text{J}/\text{cm}^2$ .

### 5. 3. 1 Energies inférieures à 3 $\text{J}/\text{cm}^2$

Parmi toutes les énergies (2, 3, 4, 6, 8, 12  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) seules les colonnes obtenues à 2  $\text{J}/\text{cm}^2$  ne permettent pas de réaliser des analyses car le polymère obtenu ne présente pas de propriétés séparatives. Les images MEB réalisées sur chacune des trois colonnes affichent une structure du polymère comme gélifiée, fondue, les nodules semblent coalescents, un exemple représentatif est illustré sur la Figure 37. Ces résultats laissent supposer que cette énergie n'est pas suffisante pour obtenir un monolithe présentant des caractéristiques chromatographiques. Cela peut provenir soit d'une étape d'initiation insuffisante soit d'une étape de propagation présentant un temps trop court. Etant donné que la structure du polymère est déjà majoritairement en place il est plus vraisemblable de retenir la deuxième hypothèse.

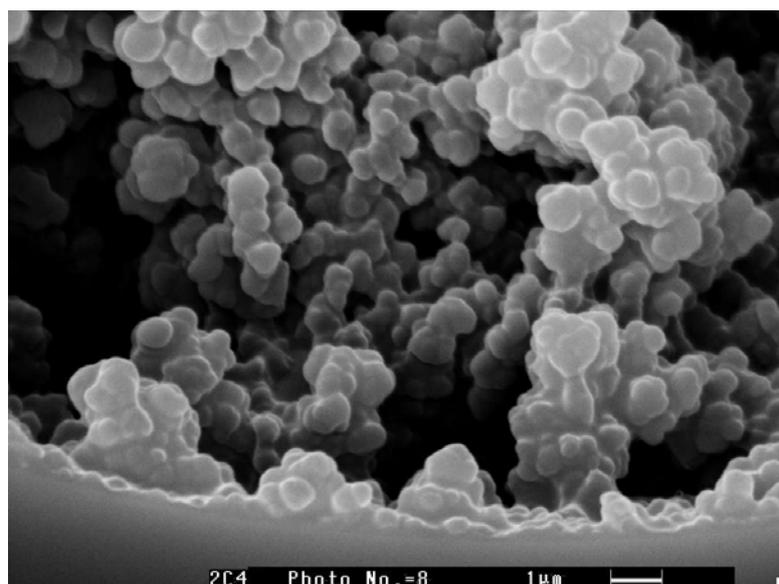


Figure 37: Image MEB d'une section de colonne monolithique obtenue à 2  $\text{J}/\text{cm}^2$ , capillaire de 75  $\mu\text{m}$  de diamètre interne, mélange à base d'hexylacrylate.

### 5. 3. 2 Energies supérieures ou égales à 20 J/cm<sup>2</sup>

Deux valeurs énergétiques hautes ont également été testées pour la synthèse de colonnes monolithiques, 20 et 50 J/cm<sup>2</sup>, afin d'évaluer si une dégradation du polymère se produisait pour une exposition prolongée aux irradiations.

- Les images MEB, présentées sur la Figure 38, sont obtenues à partir de la colonne synthétisée à 20 J/cm<sup>2</sup>. Elles présentent des nodules et des pores plus importants, des discontinuités dans la structure du monolithe ainsi qu'un attachement moins homogène aux parois du capillaire. Le polymère présente donc une structure moins régulière et semble être dégradé en certains endroits.
- La colonne préparée à 50 J/cm<sup>2</sup> n'a pas permis de réaliser des séparations. Les images MEB correspondantes de la Figure 38 montrent que la structure du monolithe a été endommagée par la trop forte dose énergétique reçue, en révélant un large trou au centre de la colonne. Les parties de monolithes restantes se situent sur les parois du capillaire. Les nodules apparaissent de taille plus petite et comme agrégés les uns aux autres. D'autres images MEB montrent un capillaire dont les parois ne sont recouvertes que d'un film de polymère d'épaisseur variable, tout le reste du monolithe ayant disparu.

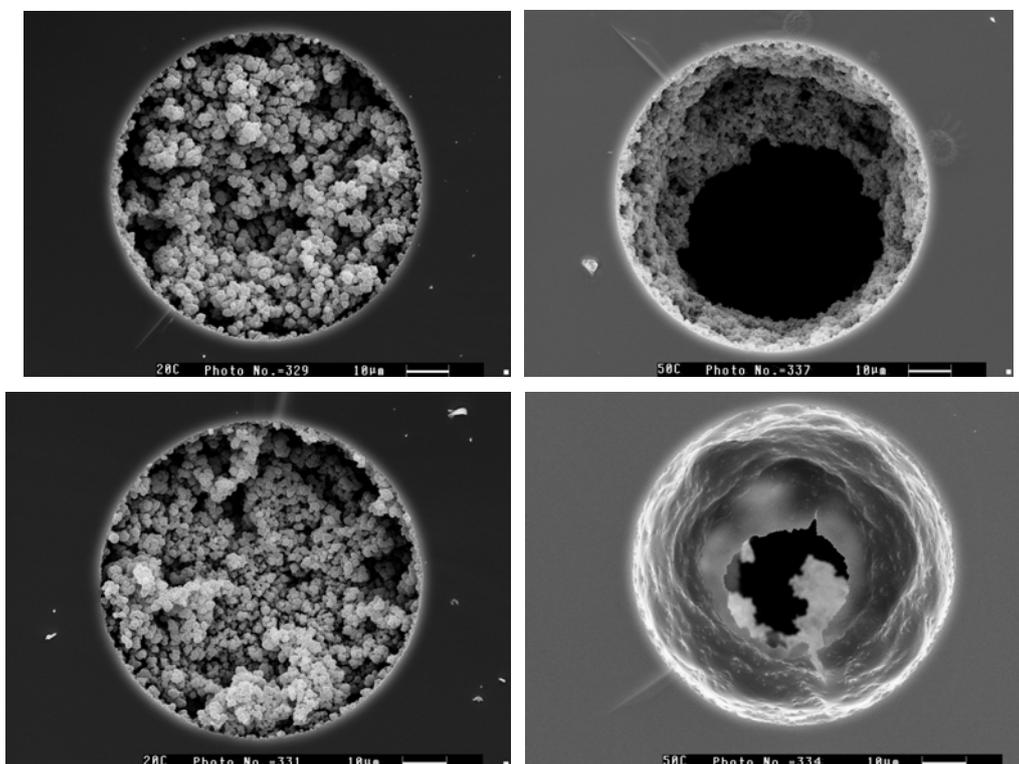


Figure 38 : Images MEB de colonnes monolithiques, capillaire de silice de diamètre interne de 75 µm, mélange à base d'hexylacrylate. Polymérisations réalisées avec des doses énergétiques à gauche : 20 J/cm<sup>2</sup>, à droite à 50 J/cm<sup>2</sup>.

### 5. 3. 3 Energies comprises entre 3 et 20 J/cm<sup>2</sup>

Dans cette gamme d'énergie, aucune différence significative n'a pu être observée dans la structure, la forme ou la taille des nodules lors d'analyses par MEB. Cela tend à confirmer les résultats obtenus en CEC. La Figure 39 présente des exemples représentatifs de plusieurs colonnes synthétisées à diverses énergies. Leur structure est régulière et homogène et la phase bien attachée aux parois des capillaires.

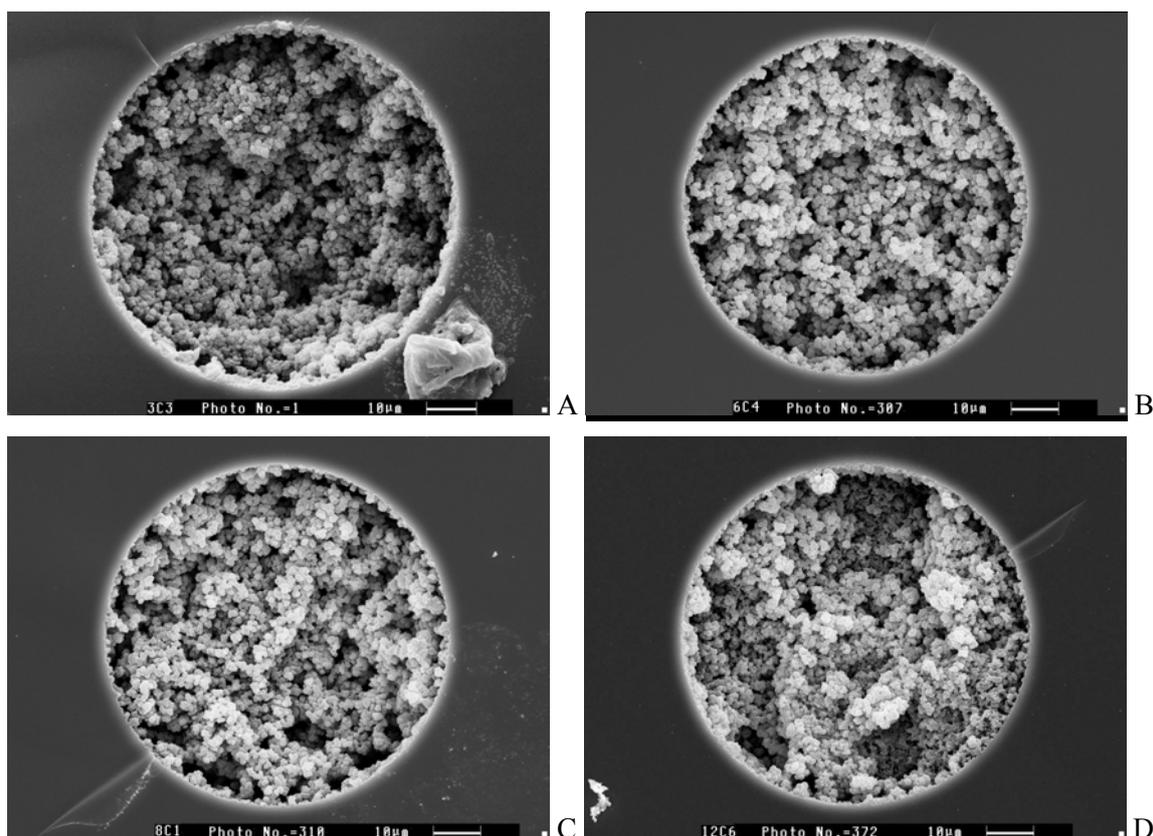


Figure 39 : Images MEB de colonnes monolithiques, capillaires de silice de diamètre interne de 75  $\mu\text{m}$ , mélange à base d'hexylacrylate. Polymérisations réalisées à : A : 3 J/cm<sup>2</sup>, B : 6 J/cm<sup>2</sup>, C : 8 J/cm<sup>2</sup> et D : 12 J/cm<sup>2</sup>. Les trous observés dans la figure D sont dus à la coupe.

En conclusion, l'influence de l'énergie imposée est observable par des modifications structurales du polymère en fonction de la dose imposée. Ainsi, il existe un plateau d'énergie d'irradiation entre 3 et 12 J/cm<sup>2</sup> pour lesquelles le polymère obtenu conduit à une colonne monolithique de bon aspect.

### 5. 4. Comparaison des énergies d'irradiation par les facteurs de rétention

Avant d'étudier les variations des efficacités, les facteurs de rétention du butylbenzène ont été comparés pour des énergies allant de 4 à 12 J/cm<sup>2</sup>. Des valeurs comprises entre 1,9 et 2,1 avec des valeurs de coefficients de variation, CV, entre 6 et 12 % ont été obtenues pour chaque

ensemble de trois colonnes synthétisées à une même énergie. Pour l'ensemble des colonnes synthétisées avec des énergies allant de 4 à 12 J/cm<sup>2</sup>, la valeur moyenne du facteur de rétention de ce composé test de 2,0 % avec un CV de 10 %. La comparaison des phases obtenues avec des énergies différentes a donc été réalisée sur le butylbenzène.

## **5. 5. Comparaison des énergies d'irradiation par les courbes de van Deemter**

### *5. 3. 1 Monolithes préparés avec des énergies comprises entre 3 et 12 J/cm<sup>2</sup>*

Pour cette gamme d'énergie d'irradiation, les coefficients A, B, C caractérisant les courbes de van Deemter obtenus pour le formamide, marqueur du FEO, et pour le butylbenzène ont été déterminés et ce pour chaque colonne. Les coefficients A, B et C représentent les divers effets dispersifs réduisant l'efficacité de la séparation ayant lieu dans une colonne. La Figure 35 représente la structure des expériences réalisées entre 3 et 12 J/cm<sup>2</sup>, permettant de procéder à l'analyse de la variance (ANOVA). Les tableaux de résultats concernant le butylbenzène sont en annexe 3 de ce chapitre.

Tout d'abord, une première comparaison des coefficients de van Deemter est effectuée pour une même colonne, prenant donc en compte trois courbes. Puis, la comparaison des coefficients A, B, C est évaluée entre trois colonnes synthétisées à une même énergie, soit neuf courbes de van Deemter. Une certaine dispersion des valeurs est observée pour les colonnes obtenues à une même énergie, notée dispersion inter-colonne. La comparaison des variations des coefficients de van Deemter est ensuite menée pour l'ensemble des énergies, et la dispersion observée est notée inter-énergie.

Après avoir procédé à l'analyse de la variance, la dispersion des valeurs « inter-énergie » est du même ordre de grandeur que la variation « inter-colonne » observée. Ce résultat a plusieurs conséquences directes. Tout d'abord cela revient à considérer que toutes les colonnes dont l'énergie de polymérisation est comprise entre 3 et 12 J/cm<sup>2</sup> sont équivalentes du point de vue des performances séparatives et forment donc un ensemble homogène de quinze colonnes. Il est alors possible, dans cette situation, de considérer l'ensemble des points expérimentaux obtenus à partir de ces quinze colonnes comme étant issus d'une seule et même colonne. Une courbe, et ses paramètres de van Deemter globaux, a pu ainsi être déterminée pour tous ces points, présentée sur la Figure 40.

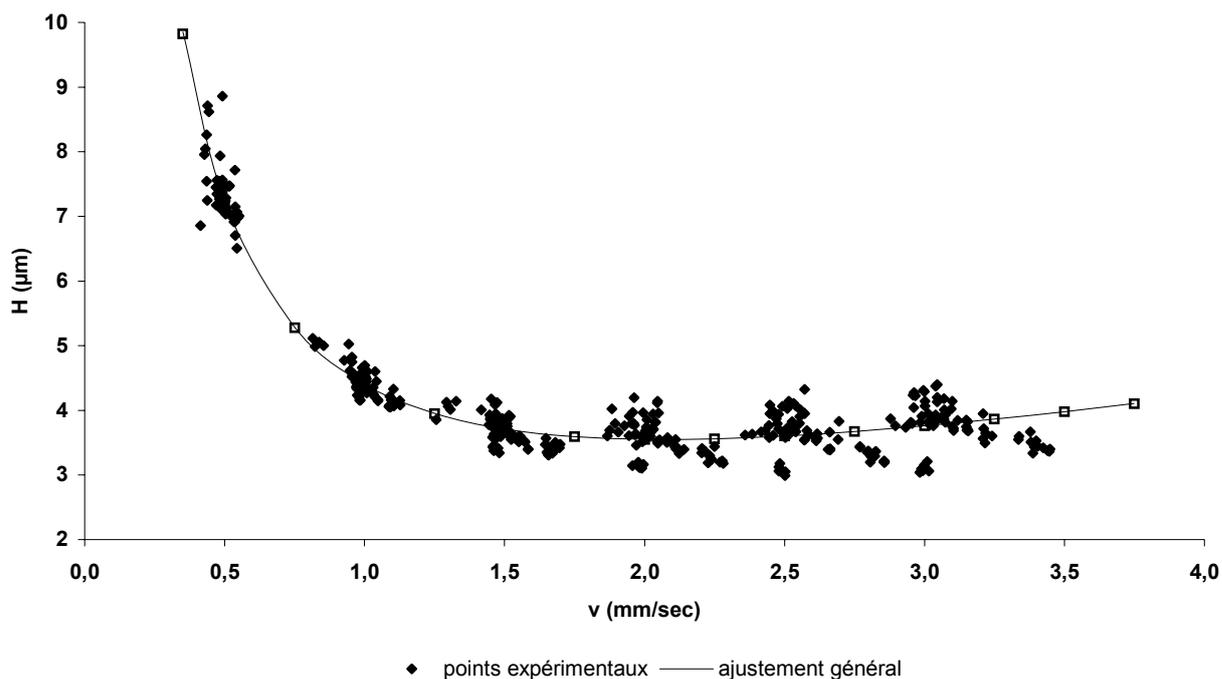


Figure 40: Courbe de Van Deemter générale et moyenne à partir de l'ensemble des points expérimentaux des 15 colonnes synthétisées avec des énergies allant de 3 à 12 J/cm<sup>2</sup> ou avec les coefficients moyens calculés lors de l'ANOVA.

### 5. 3. 1 Monolithes préparés avec des énergies supérieures à 12 J/cm<sup>2</sup>

Deux énergies de valeur supérieure ont également été testées : 20 et 50 J/cm<sup>2</sup> afin d'évaluer si une dégradation du polymère décrite par ailleurs se produisait pour une exposition prolongée aux irradiations.

La colonne préparée à 20 J/cm<sup>2</sup>, correspondant à un temps de polymérisation de 120 min environ, présente de moins bonnes performances séparatives que les colonnes préparées avec des énergies de 3 à 12 J/cm<sup>2</sup>. En effet, la répétabilité des analyses pour de faibles tensions n'est pas très bonne tant au niveau des temps de rétention que du flux électroosmotique. De plus, il était difficile d'obtenir une ligne de base stable : elle présente des irrégularités importantes quelle que soit la tension appliquée ne permettant pas d'obtenir des analyses exploitables. Les efficacités relevées pour cette colonne présentent des valeurs plus faibles, comme le montre la Figure 41, que celles obtenues pour l'ensemble des colonnes étudiées précédemment entre 3 et 12 J/cm<sup>2</sup>. Ces résultats électrochromatographiques sont en accord avec la dépolymérisation du monolithe obtenue après une irradiation prolongée sous UV. Ce phénomène semble avoir lieu dès 20 J/cm<sup>2</sup> mais les propriétés séparatives du monolithe peuvent toujours être déterminées, tandis qu'à 50 J/cm<sup>2</sup> la dégradation des propriétés analytiques et de la structure est totale.

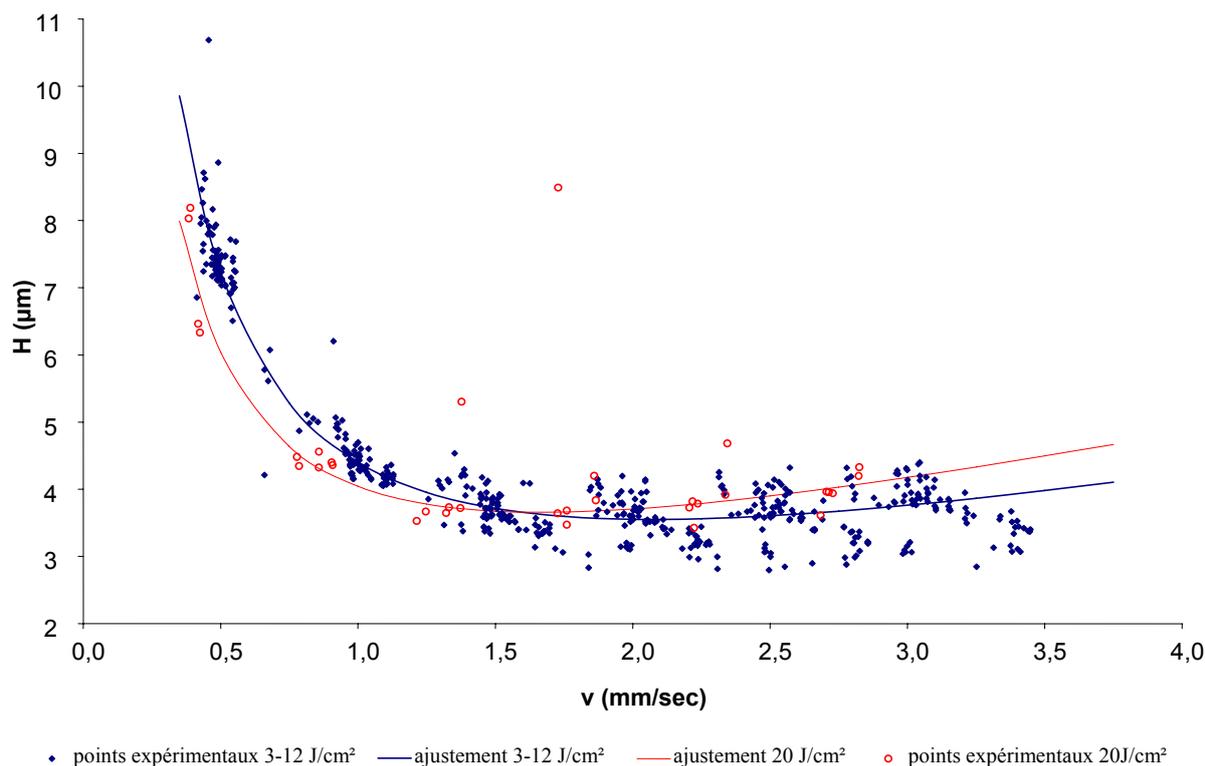


Figure 41 : Graphe présentant les courbes de Van Deemter ajustées ainsi que les points expérimentaux réalisés sur les 15 colonnes équivalentes (bleu) et sur la colonne à 20 J/cm<sup>2</sup> (rouge).

## 5. 6. Conclusions sur l'influence du paramètre énergie d'irradiation

Ainsi cette étude révèle que l'obtention de colonnes monolithiques présentant des efficacités optimales lors d'analyses en ECC nécessite des énergies appliquées lors de la réaction de polymérisation supérieures 3 J/cm<sup>2</sup> et inférieures à 20 J/cm<sup>2</sup>. Les observations réalisées par MEB et les performances électrochromatographiques sont en bon accord.

Le paramètre énergie d'irradiation est donc critique puisque les valeurs extrêmes, soit de très faibles soit de très fortes énergies ne permettent pas l'obtention d'un matériau séparatif. Néanmoins, entre ces valeurs extrêmes son influence est faible tant sur les facteurs de rétention que sur l'efficacité du système ou sur les structures observées par MEB. Cependant, il semble raisonnable de choisir de ne pas s'approcher des valeurs extrêmes. Un bon compromis se situe entre 4 et 6 J/cm<sup>2</sup> dans nos conditions d'irradiation.

## 6. Répétabilité et reproductibilité des phases monolithiques

Les monolithes représentent une nouvelle technologie de colonne, des études de répétabilité et de reproductibilité des phases obtenues sont donc nécessaires pour pouvoir les développer en

routine. Les données issues de l'étude sur l'influence du paramètre énergie d'irradiation ont été utilisées afin de déterminer la répétabilité et la reproductibilité du flux électroosmotique, du facteur de rétention ainsi que des efficacités. En effet l'arborescence de la Figure 35 présente les différents niveaux de comparaison concevables pour ces différents paramètres : la répétabilité des mesures issues de la même colonne, la répétabilité des colonnes synthétisées dans les mêmes conditions d'irradiation et la reproductibilité de l'ensemble des colonnes.

La répétabilité a donc été évaluée lors d'analyses consécutives du mélange test composé de quatre alkylbenzènes, menées dans les mêmes conditions : même colonne, même phase mobile, même tension, même température et même appareillage. Les données de l'étude du paragraphe 4 ont été systématiquement collectées pour chacune des colonnes synthétisées entre 4 et 12 J/cm<sup>2</sup>. Cette étude statistique ayant démontré que l'énergie imposée n'influe pas de manière significative sur les paramètres de Van Deemter, la reproductibilité pour l'ensemble des colonnes a aussi été étudiée. Ces études statistiques ont été menées pour le butylbenzène à deux tensions : 5 et 25 kV correspondant à des vitesses de 0,5 et 2,5 mm/sec. Les résultats présentés dans le tableau 4 ont été obtenus à 25kV.

Il ressort du tableau 4 que la répétabilité de la mobilité électroosmotique est particulièrement bonne pour une même série d'analyses, menées sur la même colonne : le coefficient de variation ne dépasse pas 2% (n = 6). A part pour une colonne, les coefficients de variation calculés pour la hauteur de plateau et pour le facteur de rétention sont inférieures à 3 % et 5 % respectivement. La reproductibilité des résultats obtenus pour des colonnes ayant subi une même dose énergétique, reste toujours acceptable puisque les coefficients de variation restent inférieurs à 10 % quel que soit le paramètre étudié. Les dispersions les plus importantes sont observées pour les colonnes obtenues avec une énergie de polymérisation égale à 4J/cm<sup>2</sup>, les coefficients de variation du FEO, du facteur de rétention et de la hauteur de plateau étant respectivement 6,4 ; 9,4 et 7,5%.

Colonne	Répétabilité						Reproductibilité colonne à colonne					
	meo ( $\cdot 10^{-5}$ cm <sup>2</sup> /V/s)		k		H ( $\mu$ m)		meo ( $\cdot 10^{-5}$ cm <sup>2</sup> /V/s)		k		H ( $\mu$ m)	
	moy	CV	moy	CV	moy	CV	moy	CV	moy	CV	moy	CV
<b>4J 1</b>	39.6	(0.9)	1.89	(2.8)	3.22	(1.0)	36.8	(6.4)	2.12	(9.4)	3.57	(7.5)
<b>4J 2</b>	36.8	(0.5)	2.34	(3.0)	3.78	(1.0)						
<b>4J 3</b>	34.1	(1.9)	2.13	(2.3)	3.72	(3.3)						
<b>6J 1</b>	34.7	(0.4)	1.94	(2.1)	3.08	(2.1)	35.1	(1.8)	1.94	(2.7)	3.4	(7.5)
<b>6J 2</b>	35.9	(0.6)	1.98	(2.7)	3.54	(5.1)						
<b>6J 3</b>	34.6	(0.1)	1.91	(2.4)	3.58	(1.0)						
<b>8J 1</b>	33.5	(0.6)	1.76	(2.9)	4.00	(1.9)	34.4	(2.8)	1.92	(6.9)	3.76	(5.0)
<b>8J 2</b>	35.7	(0.8)	2.0	(5.0)	3.63	(1.8)						
<b>8J 3</b>	34.1	(0.2)	2.0	(2.7)	3.64	(1.4)						
<b>12J 1</b>	33.5	(1.8)	2.11	(2.9)	4.11	(2.9)	36.1	(8.3)	2.08	(5.3)	3.74	(8.6)
<b>12J 2</b>	34.7	(0.6)	2.18	(2.4)	3.75	(3.8)						
<b>12J 3</b>	40.1	(0.9)	1.95	(2.3)	3.38	(1.6)						

Tableau 4 : Coefficients de variation en pourcentage mesurés sur l'ensemble des colonnes synthétisées entre 4 et 12 J/cm<sup>2</sup> sur trois paramètres séparatifs. Estimation de la répétabilité de chaque colonne, de la reproductibilité des colonnes synthétisées pour une même énergie.

La reproductibilité générale est déterminée à partir de l'ensemble des données issues des douze colonnes. La valeur moyenne de la mobilité électroosmotique est  $35,6 \times 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>.V<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> avec un CV de 6,4 %, le facteur de rétention du butylbenzène est de 2,01 avec un CV de 7,8% et enfin la hauteur de plateau est de 3,62  $\mu$ m avec un CV de 8,2 %. Ainsi, les valeurs des coefficients de variation sont inférieures à 10 %, ce qui indique une très bonne maîtrise des procédures de fabrication de ces phases stationnaires monolithiques, mais aussi les bonnes performances de ces nouveaux matériaux analytiques. Les résultats présentés précédemment étaient obtenus pour une vitesse assez rapide de phase mobile se situant sur la partie la plus favorable de la courbe de van Deemter. Néanmoins, à 5 kV, à une vitesse plus faible, les résultats sont similaires à ceux du Tableau 4 dans cette partie descendante de la courbe de van Deemter.

Il serait aussi intéressant d'évaluer la reproductibilité du processus de synthèse lorsque les colonnes étudiées ne proviennent pas du même mélange, mais de mélanges de même composition, fabriqués séparément. Les mélanges réactionnels utilisés lors de ces travaux ont été utilisés soit de façon intensive soit de manière épisodique pendant quelques mois. Ils ont été intermédiairement conservés au réfrigérateur entre chaque utilisation et ont présentés une bonne stabilité pendant environ 3 mois.

Nous n'avons pas testé la stabilité dans le temps des colonnes. Elles ont été cependant utilisées sur des périodes plus ou moins longues. Certaines colonnes ont été utilisées sur une période de trois mois permettant de réaliser au moins 300 analyses. Aucune dégradation des propriétés séparatives n'a été observée.

## 7. Conclusion

Lors d'une première étude, une étape de prétraitement s'est révélée nécessaire tant pour fournir un bon attachement du monolithe aux parois du capillaire que pour réaliser une réaction de polymérisation plus homogène. Après avoir réalisé une synthèse des diverses procédures de prétraitements utilisées, quatre ont été sélectionnées, légèrement adaptées et enfin comparées. Nous avons étudié les variations structurales des monolithes produits par microscopie électronique à balayage et ce moyen d'observation s'est révélé essentiel dans la détermination de l'homogénéité de la structure polymérique. Nous avons également étudié l'influence de divers prétraitements sur l'obtention d'une phase stationnaire performante en comparant les valeurs de paramètres séparatifs. Les résultats ont permis de déterminer quelle était la procédure et les conditions réactionnelles les plus performantes. Ainsi, un rinçage basique prolongé à chaud suivi d'un rinçage acide et enfin une réaction de silanisation à chaud dans le DMF permettent d'obtenir les meilleures performances en terme d'efficacité.

Dans une deuxième étude, l'énergie d'irradiation dispensée lors de la réaction de photopolymérisation a été étudiée afin de déterminer son influence sur la cinétique réactionnelle et donc sur la structure du polymère poreux. Diverses énergies ont été testées et ont permis de mettre en évidence l'existence d'un seuil au dessus duquel un matériau analytique est obtenu. En dessous de ce seuil, la réaction de polymérisation n'est pas suffisamment avancée. A partir de ce seuil, fixé à  $3\text{J}/\text{cm}^2$  dans nos conditions d'illumination, les propriétés séparatives et structurales du polymère peuvent être considérées comme similaires et performantes et ce jusqu'à  $12\text{J}/\text{cm}^2$ , comme établi par une analyse de la

variance. Enfin, sachant que les monolithes à base de méthacrylate se dépolymérisent sous une forte irradiation UV, des énergies assez importantes ont été imposées et ont provoqué une dégradation certaine de la structure polymérique et donc des caractéristiques séparatives. Il faut donc se situer sur le plateau énergétique compris entre 3 et 12 J/cm<sup>2</sup> afin d'obtenir une colonne monolithique ; en outre, par précaution il est bon de ne pas se placer à une énergie trop proche des deux seuils.

Par ailleurs, la répétabilité et la reproductibilité des caractéristiques séparatives des colonnes monolithiques a aussi été abordée et donne de très bonnes valeurs attestant des bonnes performances de ces nouveaux matériaux analytiques et de la bonne maîtrise des procédés de synthèse.

## 8. Annexes

ANNEXE 8-1 : Expression de la vitesse globale de photopolymérisation lorsque l'épaisseur du contenant n'est plus négligeable

Rappelons d'abord que la vitesse globale de la réaction a pour expression :

$$R_p = k_p \cdot \left[ \frac{\phi \cdot \varepsilon \cdot I_0 \cdot [A] \cdot b}{k_t} \right]^{1/2} \cdot [M]$$

Pour la plupart des polymérisations, la quantité de lumière absorbée ne peut être négligée et  $I_0$  et  $I_a$ , (intensité absorbée par l'initiateur), dépendront de l'épaisseur du matériau. On obtient l'expression de  $I_a$  par la loi de Beer Lambert :

$$I_a = I_0 e^{-\varepsilon[A]b}$$

Avec  $I$  intensité de la lumière incidente à la distance  $b$  dans le récipient réactionnel. L'intensité absorbée par le système réactionnel devient alors :

$$I_a = I_0 [1 - e^{-\varepsilon[A]b}]$$

Avec  $b$  qui devient l'épaisseur du récipient réactionnel. On peut donc obtenir une équation de la vitesse de polymérisation de la forme :

$$R_p = k_p \cdot \left[ \frac{\phi \cdot I_0 [1 - e^{-\varepsilon[A]b}]}{k_t} \right]^{1/2} \cdot [M]$$

## ANNEXE 8-2 : Préparation des mélanges à polymériser [9]

### Mélange à base de butylacrylate :

Le mélange de monomères comprend : (% en volume)

- 30 % de 1, 3 – butanediol diacrylate (BDDA) en tant qu'agent réticulant
- 69,5 % de butylacrylate (BA) comme monomère fonctionnel
- 0,5 % d'acide 2-acrylamido-2-méthyl-1-propanesulfonique (AMPS)
- 0,3 % d'agent d'adhésion :  $\gamma$ -MAPS

Le mélange de solvants est constitué de : (% en volume)

- 20 % d'éthanol
- 20 % de tampon phosphate 5mM, pH = 7,1
- 60 % d'acétonitrile

Le mélange à polymériser est finalement constitué d'un rapport (33 : 67) du mélange de monomère et du mélange de solvants

L'initiateur radicalaire le 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) est ajouté à raison de 0,5 % (en masse) par rapport au mélange de monomère.

### Mélange à base d'hexylacrylate :

Le mélange de monomères comprend : (% en volume)

- 30 % de 1, 3 – butanediol diacrylate (BDDA) en tant qu'agent réticulant
- 69,5 % de hexylacrylate (HA) comme monomère fonctionnel
- 0,5 % d'acide 2-acrylamido-2-méthyl-1-propanesulfonique (AMPS)
- 0,3 % d'agent d'adhésion :  $\gamma$ -MAPS

Le mélange de solvants est constitué de : (% en volume)

- 20 % d'éthanol
- 20 % de tampon phosphate 5mM, pH = 7,1
- 60 % d'acétonitrile

Le mélange à polymériser est finalement constitué d'un rapport (33 : 67) du mélange de monomère et du mélange de solvants

L'initiateur radicalaire le 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) est ajouté à raison de 0,5 % (en masse) par rapport au mélange de monomère.

### Description du matériel d'électrochromatographie capillaire

Electrophorèse capillaire Agilent Technologies, 3D CE, équipée d'une bouteille d'azote externe. Logiciels d'exploitation et de retraitement des données : Chemstation.

Capillaires en silice vierge revêtu d'un film transparent aux UV de diamètre 100 et 75  $\mu\text{m}$  de diamètre interne, 365  $\mu\text{m}$  de diamètre externe, Polymicro Technologies.

### Description du matériel d'illumination :

Spectrolinker XL-1500 de chez Spectronics Corporation (Westbury, New York)

Il est équipé de 6 tubes UV de 15 watts calibrés à 360nm.

## ANNEXE 8-3 : Tableaux des résultats des tests ANOVA pour le butylbenzène

Des analyses de la variance (ANOVA) à deux facteurs contrôlés, en plan pyramidal, ont été menées sur chacun des coefficients de van Deemter. Les tableaux de résultats pour chacun des coefficients sont présentés ci-dessous :

Concernant le coefficient A :

source de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen $q=Q/v$
facteur énergie	0,863	4	0,216
facteur colonne	0,769	10	0,077
résiduelle	3,003	30	0,100
totale	4,635	44	

Facteur colonne :  $f_{\text{obs}} = 2,154$  ;  $[F_{\alpha}(10, 30)]_{0,05} = 2,348$

On conclut au non-rejet de l'hypothèse  $\sigma_{\text{Colonne}} = 0$ , il n'est pas mis en évidence d'influence significative du facteur colonne sur le paramètre A de l'équation de van Deemter.

Facteur énergie :  $f_{\text{obs}} = 0,768$  ;  $[F_{\alpha}(4, 30)]_{0,05} = 3,748$

On conclut au non-rejet de l'hypothèse  $\sigma_{\text{Energie}} = 0$ , il n'est pas mis en évidence d'influence significative du facteur énergie sur le paramètre A de l'équation de van Deemter.

Concernant le coefficient B :

source de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen $q=Q/v$
facteur énergie	0,231	4	0,058
facteur colonne	0,945	10	0,095
résiduelle	1,417	30	0,047
totale	2,593	44	

Facteur colonne :  $f_{\text{obs}} = 2,000$  ;  $[F_{\alpha}(10, 30)]_{0,05} = 2,348$

On conclut au non-rejet de l'hypothèse  $\sigma_{\text{colonne}} = 0$ , il n'est pas mis en évidence d'influence significative du facteur colonne sur le paramètre B de l'équation de van Deemter.

Facteur énergie :  $f_{\text{obs}} = 1,221$  ;  $[F_{\alpha}(4, 30)]_{0,05} = 3,748$

On conclut au non-rejet de l'hypothèse  $\sigma_{\text{Energie}} = 0$ , il n'est pas mis en évidence d'influence significative du facteur énergie sur le paramètre B de l'équation de van Deemter.

Concernant le coefficient C :

source de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen $q=Q/v$
facteur énergie	0,443	4	0,111
facteur colonne	0,533	10	0,053
résiduelle	0,257	30	0,009
totale	1,23	44	

Facteur colonne :  $f_{\text{obs}} = 6,230$  ;  $[F_{\alpha}(10, 30)]_{0,05} = 2,348$

On conclut au rejet de l'hypothèse  $\sigma_{\text{Colonne}} = 0$ , il est mis en évidence une influence significative du facteur colonne sur le paramètre C de l'équation de van Deemter.

Facteur énergie :  $f_{\text{obs}} = 2,075$ ;  $[F_{\alpha}(4, 10)]_{0,05} = 3,748$

On conclut au non-rejet de l'hypothèse  $\sigma_{\text{Energie}} = 0$ , il n'est pas mis en évidence d'influence significative du facteur énergie sur le paramètre C de l'équation de van Deemter.

## 9. Références bibliographiques

- [1] G. Odian, Principles of polymerization, Wiley-interscience, New York, 1981.
- [2] G. Champetier, L. Monnerie, Introduction à la chimie macromoléculaire, Masson, Paris, 1969.
- [3] M.V. Encinas, E.A. Lissi, C. Martinez, European Polymer Journal 32 (1996) 1151.
- [4] T.G. Gerasimov, D.L. Snavey, Macromolecules 35 (2002) 5796.
- [5] M. Shirai, S. Morishita, H. Okamura, M. Tsunooka, Chemical Material 14 (2002) 334.
- [6] J. Kindernay, A. Blazkova, J. Ruda, V. Jancoviciva, Z. Jakubikova, Journal of Photochemistry and photobiology A: Chemistry 151 (2002) 229.
- [7] J.D. Oxman, D.W. Jacobs, M.C. Trom, V. Sipani, B. Ficek, A.B. Scranton, Journal of Polymer Science 43 (2005) 1747.
- [8] T.Y. Lee, T.M. Roper, E.S. Jonsson, I. Kudyakov, K. Viswanathan, C. Nason, C.A. Guymon, C.E. Hoyle, Polymer 44 (2003) 2859.
- [9] S.M. Ngola, Y. Fintschenko, W.-Y. Choi, T.J. Shepodd, Analytical Chemistry 73 (2001) 849.
- [10] T. Rohr, C. Yu, M.H. Davey, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Electrophoresis 22 (2001) 3959.
- [11] M. Lämmerhofer, E.C. Peters, C. Yu, F. Svec, J.M.J. Fréchet, W. Lindner, Analytical Chemistry 72 (2000) 4614.
- [12] C. Yu, M.H. Davey, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Analytical Chemistry 73 (2001) 5088.
- [13] C. Viklund, E. Pontén, B. Glad, K. Irgum, P. Hörstedt, F. Svec, Chemical Material 9 (1997) 463.
- [14] N. Delaunay-Bertoncini, C. Demesmay, J.-L. Rocca, Electrophoresis 25 (2004) 3204.
- [15] B. Buszewski, M. Szumski, S. Sus, LC-GC europe December 2002 (2002) 2.
- [16] R. Rosset, M. Caude, A. Jardy, Manuel pratique de chromatographie en phase liquide, Masson, Paris, 1982.
- [17] J. Tranchant, P. Arpino, A. Prévôt, J. Serpinet, A. Vergnol, P. Witier, Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, Masson, Paris, 1995.
- [18] M. Bedair, Z. El Rassi, Journal of Chromatography A 1013 (2003) 35.
- [19] E.C. Peters, M. Petro, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Analytical Chemistry 69 (1997) 3646.
- [20] S. Hjerten, Journal of Chromatography A 347 (1985) 191.
- [21] S. Hjerten, Analytical Biochemistry 223 (1994) 153.
- [22] C. Ericson, J.-L. Liao, K. Nakazato, S. Hjerten, Journal of Chromatography A 767 (1997) 33.
- [23] X. Huang, C. Horvath, Journal of Chromatography A 788 (1997) 155.
- [24] D. Hoegger, R. Freitag, Journal of Chromatography A 1004 (2003) 195.
- [25] A. Palm, M.V. Novotny, Analytical Chemistry 69 (1997) 4499.
- [26] D. Bandilla, C.D. Skinner, Journal of Chromatography A 1004 (2003) 167.
- [27] M. Bedair, Z. El Rassi, Electrophoresis 23 (2002) 2938.
- [28] M. Bedair, Z. El Rassi, Journal of Chromatography A 1013 (2003) 47.
- [29] D.S. Peterson, T. Rohr, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Analytical Chemistry 75 (2003) 5328.
- [30] X. Xiong, L. Zhang, Y. Zhang, H. Zou, J. Zhang, Journal of High Resolution Chromatography 23 (2000) 67.



# CHAPITRE 3. UTILISATIONS DE PHASES MONOLITHIQUES POUR LA SEPARATION

## 1. Introduction

Après avoir optimisé certaines conditions de synthèse *in situ* des phases monolithiques en capillaire, nous avons obtenu une structure monolithique permettant d'obtenir de meilleures caractéristiques séparatives. Nous nous intéressons dans ce chapitre à la caractérisation de leurs propriétés séparatives en électrochromatographie. Dans un premier temps, des caractéristiques physico-chimiques et chromatographiques de ces phases stationnaires polymériques sont étudiées, puis, diverses fonctionnalités de phases sont décrites et plusieurs modes séparatifs sont abordés. Enfin, des séparations de mélanges tests en ECC et en CEMC illustrent les points forts et les limites de ces deux techniques analytiques.

## 2. Caractéristiques physico-chimiques et chromatographiques des phases monolithiques étudiées

### 2.1 Porosité

#### 2.1.1 Rappels bibliographiques

La porosité totale d'une colonne est définie comme la fraction du volume total de celle-ci occupée par la phase mobile, elle informe donc sur la portion réelle de phase stationnaire qui participe à la séparation des composés. Par définition, la porosité totale d'une colonne chromatographique est donnée par :

$$\varepsilon_t = V_m / V_c \quad (1)$$

où  $V_c$  est le volume de la colonne et  $V_m$  le volume accessible à la phase mobile ou volume mort ( $V_m = V_i + V_p$  :  $V_i$  le volume interstitiel et  $V_p$  le volume poreux).

Si  $\varepsilon_t$  est comprise entre 0,7 et 0,8 le support est considéré comme complètement poreux et si elle est comprise entre 0,3 et 0,4 le support est considéré comme imperméable. Gusev et al. [1] ont décrit les trois principales méthodes permettant de la déterminer : la méthode dite du flux, la méthode gravimétrique et la méthode des conductivités.

La méthode par le flux fait appel à la  $\mu$ HPLC et les analyses sont faites sous pression. Pour utiliser cette méthode, il faut travailler avec une colonne remplie ou polymérisée jusqu'à la fenêtre de détection. Il s'agit de déterminer le débit de la phase mobile en mesurant le temps que met un marqueur de flux pour parcourir la partie vide de la colonne. Les fluides étant incompressibles, le débit mesuré pour parcourir la partie vide est identique à celui mis pour parcourir la partie remplie. On peut donc déterminer le volume occupé par la phase mobile dans la partie remplie, en y injectant le même marqueur de flux dans les mêmes conditions de pression que pour l'injection du côté vide. Connaissant ce volume, on peut alors calculer la porosité totale de la colonne.

La méthode gravimétrique consiste à peser la colonne sèche puis remplie de solvant. Connaissant la différence de poids entre les deux, le volume du capillaire avant d'y introduire la phase et la densité du solvant, on peut calculer le volume mort de la colonne et donc sa porosité.

La méthode dite des conductivités dérive de la méthode utilisée pour déterminer la porosité de roches en géologie et utilise des modèles empiriques. Elle donne une estimation de la porosité totale de la phase et est applicable lorsque la phase stationnaire est non conductrice [1]. Elle consiste à mesurer la conductivité de l'électrolyte dans une colonne capillaire remplie ( $\sigma_{remplie}$ ) ainsi que dans un capillaire en silice vierge ( $\sigma_{ouvert}$ ), de même diamètre et dans les mêmes conditions expérimentales. On peut alors en obtenir le rapport des conductivités, noté  $\Phi$  :

$$\Phi = \sigma_{remplie} / \sigma_{ouvert} \quad [2-4] \quad (2)$$

La conductivité mesurée sur une colonne remplie d'une phase stationnaire non conductrice présente une conductivité moins élevée que celle mesurée sur un capillaire vide, c'est pourquoi le rapport des conductivités est inférieur à 1. Des équations ont été proposées pour calculer le rapport des conductivités à partir de mesures expérimentales du courant. Pour une colonne entièrement remplie ou polymérisée, l'équation suivante est obtenue :

$$\Phi = I_{remplie} / I_{ouvert} \quad (3)$$

où  $I_{remplie}$  est le courant dans la colonne remplie et  $I_{ouvert}$  le courant dans le capillaire en silice vierge, chacun étant mesuré dans les mêmes conditions. Pour une colonne remplie jusqu'à la fenêtre de détection, également appelée colonne duplex :

$$\Phi = \frac{\lambda}{\frac{I_{ouvert}}{I_{duplex}} - (1 - \lambda)} \quad (4)$$

où  $I_{duplex}$  est le courant dans la colonne partiellement remplie et  $\lambda = l/L$  où  $l$  est la longueur du segment rempli et  $L$  la longueur totale de la colonne.

Ce rapport des conductivités entre un capillaire vide et une colonne remplie dépend de plusieurs paramètres [5]. Tout d'abord, la section transversale libre du capillaire est réduite par la présence d'une phase stationnaire, cette diminution dépendant de la porosité interstitielle de la phase en présence. Puis, la tortuosité et les infractuosités de la phase stationnaire augmentent les longueurs effectives de migration des ions par rapport à un capillaire vide. Ces effets peuvent être pris en compte grâce au facteur de tortuosité. Par ailleurs, les sections transversales des canaux où migrent les ions, peuvent se dilater ou se rétracter, cet effet pouvant être pris en compte par un facteur de constriction. Chen et al. [4] définissent quant à eux le rapport des conductivités comme étant égal au produit de la porosité par le facteur de tortuosité :

$$\Phi = \varepsilon\gamma \quad (5)$$

Néanmoins, ces modèles et leurs fondements sont trop peu développés voire simplifiés pour permettre de choisir lequel est le plus adapté à la détermination des différents paramètres menant à la porosité. En effet, la plupart des paramètres et grandeurs utilisés dans ces travaux ne sont pas suffisamment définis pour vérifier la validité des modèles. C'est pourquoi, l'approche généralement retenue permettant de relier le rapport des conductivités à la porosité totale de la colonne est empirique et peut être décrite par la loi d'Archie ( $\Phi = \varepsilon_t^m$ ) qui est la plus employée [5]. Le Tableau 5 décrit plusieurs modèles qui ne sont que des cas particuliers pour la plupart issus de la loi d'Archie [1].

Archie	$\Phi = \varepsilon_t^{1,3}$
Tobias	$\Phi = \varepsilon_t^{1,5}$
Wyllie	$\Phi = \varepsilon_t / \sqrt{2}$
Humble	$\Phi = 1,613\varepsilon_t^{2,15}$
Slawinski	$\Phi = \varepsilon_t / (1,3219 - 0,3219\varepsilon)^2$

Tableau 5: Expressions littérales du rapport des conductivités ( $\Phi$ ) et de la porosité totale ( $\varepsilon_t$ ) d'après différents modèles

Dans les études réalisées au cours de ces travaux, la porosité et ses variations ont été estimées grâce aux mesures des rapports de conductivités et au modèle empirique d'Archie, décrit dans le Tableau 5. Notre objectif a été de déterminer les influences de la force ionique et du pourcentage en acétonitrile sur la porosité totale et de savoir si des phénomènes de gonflement ou de recouvrement de double couche électrique se produisaient dans ces phases monolithiques.

### *2. 1. 2 Résultats expérimentaux*

Nous nous sommes intéressés à la porosité de la phase stationnaire utilisée et pour cela trois différents types de colonnes ont été mis en œuvre :

- colonne capillaire entièrement polymérisée (75 $\mu$ m x 35,8 cm, détection située à 27,3 cm).
- colonne capillaire polymérisée jusque la fenêtre de détection (75 $\mu$ m x 35,5 cm, détection située à 27 cm)
- capillaire en silice vierge (75 $\mu$ m x 36 cm, détection située à 27,5 cm)

La composition du mélange réactionnel permettant d'obtenir la phase stationnaire utilisée dans cette étude est à base d'hexylacrylate et est décrit en annexe 1 de ce chapitre.

#### 2. 1. 2. 1- Influence du pourcentage en acétonitrile de la phase mobile sur la porosité

Afin de caractériser la phase stationnaire mise en œuvre dans la suite de l'étude, nous avons étudié l'influence du pourcentage en acétonitrile de la phase mobile sur la porosité de la phase stationnaire. Des mesures de courant ont ainsi été réalisées en présence de différentes compositions de phase mobile, la force ionique théorique étant maintenue constante. Puis, le rapport des conductivités a été calculé à partir du rapport des courants (équation 3). La porosité de notre phase stationnaire a ensuite pu être déterminée en utilisant le modèle d'Archie. Ces expériences ont été réalisées à la fois sur la colonne entièrement polymérisée et sur la colonne partiellement polymérisée. L'objectif est d'évaluer si le fait de polymériser totalement ou partiellement la colonne conduit à une modification de la porosité de la phase stationnaire monolithique. Comme le montre la Figure 42, une variation du pourcentage en acétonitrile de la phase mobile n'entraîne pas de variation de la porosité que ce soit pour la colonne entièrement ou partiellement polymérisée.

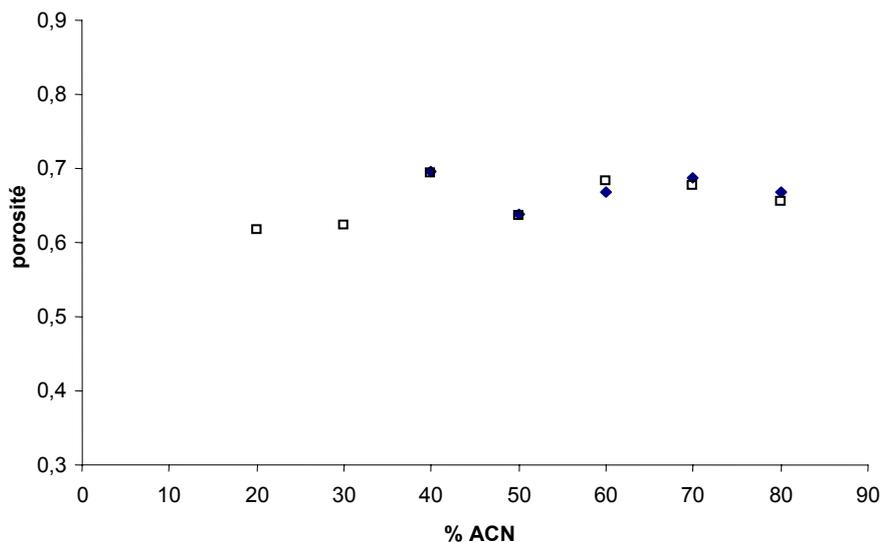


Figure 42 : Evolution de la porosité pour une colonne partiellement (□) et une entièrement (◆) polymérisée selon le modèle d'Archie en fonction du pourcentage d'acétonitrile de l'électrolyte. Monolithes à base d'hexylacrylate. Colonne partiellement polymérisée : L = 35,5 cm ; l = 27 cm ; di = 75 μm ; colonne entièrement polymérisée : L = 35,8 cm ; l = 27,3 cm ; di = 75 μm. Electrolyte : tampon phosphate pH 6,8 en milieu eau-acétonitrile (v/v variable), force ionique = 1,75 mM. Tension : + 25 kV. Température : 25°C.

Cela nous permet de conclure que les phénomènes de gonflement liés à la composition de la phase mobile sont négligeables dans notre cas. En effet, s'il y avait un gonflement de la phase stationnaire, les pores deviendraient plus petits et une décroissance de la porosité serait observée pour des pourcentages croissants en acétonitrile de la phase mobile.

La porosité totale moyenne pour la colonne partiellement polymérisée est de 0,63 avec un coefficient de variation de 12% pour cette série de mesures. Concernant la colonne totalement remplie, la porosité totale moyenne est de 0,65 avec un CV de 5%. Ces valeurs indiquent une porosité totale assez élevée qui est généralement observée pour des phases de type particulière ou monolithique. Les valeurs rapportées dans la littérature pour d'autres phases monolithiques sont comprises entre 0,4 et 0,7 quelles que soient les fonctionnalités des monomères mis en jeu [1,2,6]. La méthode de détermination des porosités totales utilise les mêmes relations que celles que nous avons choisies : détermination du rapport des conductivités et application d'un modèle empirique. Seule une porosité totale de 0,9 a été déterminée sur une colonne monolithique par les mêmes méthodes, colonne qui présente par ailleurs de très bonnes caractéristiques séparatives [7].

### 2. 1. 2. 2- Influence de la force ionique de la phase mobile sur la porosité

Dans un second temps, l'influence de la force ionique de la phase mobile sur la porosité de la phase stationnaire a été étudiée. Pour ce faire, des mesures de courant ont été réalisées avec des concentrations décroissantes en tampon phosphate dans la phase mobile, le pourcentage en acétonitrile étant maintenu constant. L'objectif était alors d'évaluer si un phénomène de recouvrement de la double couche de certains canaux pouvait être observé aux faibles forces ioniques. L'équation 6 présente la relation entre l'épaisseur de la double couche et la force ionique de la phase mobile :

$$\delta = \sqrt{\frac{\epsilon_r \epsilon_0 RT}{2IF^2}} \quad (6)$$

où R est la constante des gaz parfaits, T la température absolue, F la constante de Faraday, I la force ionique,  $\epsilon_r$  la constante diélectrique du milieu et  $\epsilon_0$  la permittivité du vide.

D'après cette relation, lorsque la force ionique diminue, l'épaisseur de la double couche augmente. Il est alors possible d'observer un recouvrement de la double couche qui ne permettra plus l'accès de la phase mobile aux petits pores de la phase stationnaire. Dans ce cas, une diminution de la porosité aux faibles forces ioniques sera observée. Ces phénomènes ont déjà été observés par Progent et al. [8]. Par ailleurs, ces expériences ont été réalisées à la fois sur la colonne polymérisée dans sa totalité et sur la colonne partiellement polymérisée. Cette étude a été effectuée pour une phase mobile présentant un pourcentage en acétonitrile constant. Comme le montre la Figure 43, une variation de la force ionique de la phase mobile n'entraîne pas de variation significative de la porosité ; ce résultat permet de conclure à l'absence de phénomène de recouvrement de la double couche électrique. Ainsi, la phase mobile a toujours accès aux mésopores et aux macropores de la phase stationnaire et la porosité est maximale quelles que soient les conditions d'analyses.

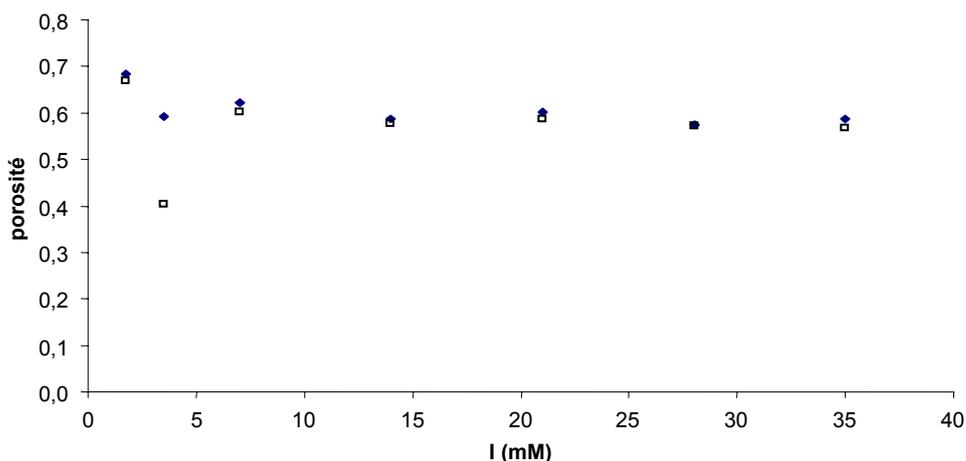


Figure 43 : Evolution de la porosité pour une colonne partiellement (□) et une entièrement (◆) polymérisée selon le modèle d'Archie en fonction de la force ionique de l'électrolyte. Monolithes à base d'hexylacrylate. Colonne partiellement polymérisée :  $L = 35,5$  cm ;  $l = 27$  cm ;  $d_i = 75$   $\mu\text{m}$  ; colonne entièrement polymérisée :  $L = 35,8$  cm ;  $l = 27,3$  cm ;  $d_i = 75$   $\mu\text{m}$ . Electrolyte : tampon phosphate pH 6,8 en milieu acétonitrile-eau (60:40, v/v), force ionique variant de 3,5 à 35 mM. Tension : +25 kV. Température : 25°C.

La Figure 43 indique que la porosité peut être considérée comme constante en fonction de la force ionique pour ces deux colonnes malgré un point aberrant à 3,5 mM pour la colonne partiellement remplie. La porosité totale moyenne pour la colonne partiellement polymérisée a été estimée à 0,58 avec un coefficient de variation de 2% pour cette série de mesures. Concernant la colonne totalement remplie, la porosité totale moyenne est de 0,59 avec un CV de 3%.

D'une part, ces valeurs de porosité moyenne sont du même ordre de grandeur que l'étude soit menée en fonction de la composition de la phase mobile ou en fonction de sa force ionique. La valeur moyenne de la porosité des phases stationnaires monolithiques à base d'hexylacrylate employées dans cette étude est ainsi d'environ 0,6. Par ailleurs, il n'y a pas de phénomènes de recouvrement de double couche électrique ni de gonflement de phase stationnaire. De plus, les valeurs de porosité obtenues pour les colonnes partiellement et totalement remplies sont du même ordre de grandeur, les écarts pouvant provenir de la variabilité colonne à colonne. Les caractéristiques poreuses des monolithes ne se trouvent donc pas affectées par la longueur polymérisée des colonnes. La porosité ne permet pas de choisir quelle est la meilleure géométrie entre les deux présentées lors de ces études.

D'autre part, la porosité de colonnes monolithiques a été déterminée grâce à d'autres méthodes que celle des conductivités associée au modèle d'Archie. Il s'agit de la méthode gravimétrique et la méthode du flux, toutes deux décrites au début de ce chapitre. Concernant

une même colonne à base d'hexylacrylate, la méthode gravimétrique donne une valeur de porosité totale de 0,73. La méthode par le flux donne une valeur de 0,70 et la méthode du rapport des conductivités associée au modèle d'Archie donne une valeur de 0,63. Chacune de ces méthodes évalue la porosité d'une colonne par des moyens différents c'est pourquoi il n'est pas anormal de trouver des divergences entre ces valeurs, qui restent du même ordre de grandeur. Par ailleurs, la méthode des conductivités présente l'avantage de mesurer la porosité dans les conditions des analyses électrochromatographiques, ne tenant donc pas compte des pores occlus contrairement aux autres méthodes.

Cette même étude a été menée sur une colonne à base de butylacrylate et les valeurs obtenues sont 0,94 pour la méthode gravimétrique et 0,74 pour la méthode du rapport des conductivités. Il est ainsi possible de comparer la porosité totale de deux types de colonne monolithique. Tout d'abord, ces deux valeurs indiquent une porosité totale assez importante pour ces deux types de colonne monolithique, mais aussi que la porosité des colonnes à base de butylacrylate est plus importante que celle à base d'hexylacrylate pour les deux méthodes de mesures employées. Or seule la nature de ce monomère a varié dans la composition du mélange réactionnel. Cette variation de porosité peut ainsi provenir, des effets de solvation des polymères en croissance lors de la polymérisation. En effet, en fonction de l'hydrophobie des monomères et donc des polymères, leurs solubilités dans le mélange de solvants porogènes est plus ou moins importantes et peut ainsi retarder ou avancer leur précipitation et donc la cinétique de polymérisation.

## 2. 2 Le Flux Electroosmotique (FEO)

### 2. 2. 1 Rappels bibliographiques sur le FEO en ECC

#### 2. 2. 1. 1- Généralités sur le FEO en ECC

En électrochromatographie, le flux électroosmotique peut être généré à la fois par les parois du capillaire et par la phase stationnaire si celle-ci contient des fonctionnalités chargées. La mobilité électroosmotique est généralement exprimée comme en électrophorèse capillaire par le modèle de Smoluchowski, on parle alors de mobilité électroosmotique :

$$m_{eo} = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta}{\eta} = \frac{\delta\sigma}{\eta} \quad (7)$$

Elle est expérimentalement mesurée d'après l'équation suivante :

$$m_{eo_{app}} = \frac{Ll}{Vt_{eo}} \quad (8)$$

où  $\zeta$  ne représente plus seulement le potentiel zéta de la paroi du capillaire mais celui de la paroi, s'il s'agit d'une colonne duplex, ajouté à celui de la phase stationnaire.

La mobilité électroosmotique apparente ne tient pas compte du remplissage plus ou moins partiel du capillaire par une phase stationnaire.

- En effet, dans le cas d'une colonne remplie jusqu'à la fenêtre de détection, on observe une variation importante du champ électrique et donc de la vitesse du flux électroosmotique entre les parties remplies et vides de la colonne. Cependant, le calcul de la mobilité apparente fait intervenir le potentiel appliqué à la totalité de la colonne et non le potentiel de chacune des deux parties de la colonne. De plus, cette mobilité électroosmotique apparente ne tient pas compte de la longueur réellement parcourue par un marqueur de flux dans une colonne remplie d'une phase stationnaire, mais seulement la longueur extérieure de la colonne. La tortuosité est le paramètre qui rend compte de l'influence de la phase stationnaire comme obstacle à la phase mobile et au soluté, c'est-à-dire du chemin réellement parcouru par un composé. Le chemin réellement parcouru s'exprime généralement à l'aide d'un coefficient dit de tortuosité  $\gamma$  qui est toujours inférieur à l'unité.

Rathore et al. ont ainsi proposé de calculer la mobilité électroosmotique réelle [2,3,6] :

$$m_{eo_{réelle}} = \frac{L_e^2}{t_{eo} V_{plein}} \quad (9)$$

$V_{plein}$  est le potentiel réellement appliqué à la partie polymérisée de la colonne :

$$V_{plein} = V \left( 1 - \frac{I_{duplex} L_{creuse}}{I_{ouvert} L} \right) \quad (10)$$

où  $L_{creuse}$  est la longueur de la partie non remplie de la colonne partiellement polymérisée et  $I_{duplex}$  est le courant mesuré dans une colonne comprenant une partie creuse et une partie remplie de phase stationnaire.

$L_e$  est la longueur effective du chemin parcouru par le marqueur de flux (Figure 44), tenant donc compte de la tortuosité de la phase stationnaire. Pour une colonne polymérisée jusqu'à la fenêtre de détection, elle est définie comme suit :

$$L_e = L \left( \sqrt{\frac{I_{ouvert}}{I_{duplex}}} \right) - L_{creuse} \quad (11)$$

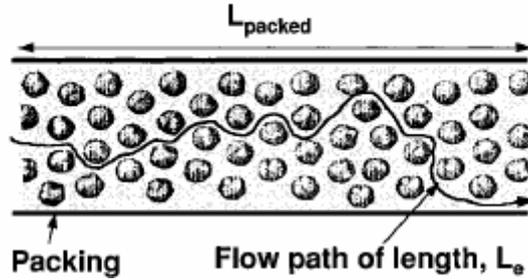


Figure 44 : Schéma représentant le chemin parcouru par le flux dans une colonne remplie de particules :  $L_{packed}$  représente la longueur polymérisée de la colonne et  $L$  la longueur totale de la colonne

Ce modèle tient compte de la différence de résistivité présentée par la colonne entre la partie vide et la partie remplie du capillaire. De plus, les différences entre la longueur du chemin parcouru par le marqueur de flux, la longueur effective et la longueur totale, sont aussi prises en compte dans ce modèle. L'effet de la tortuosité de la phase stationnaire est donc inclus dans le calcul de la mobilité électroosmotique réelle. C'est donc à partir de la mobilité électroosmotique ainsi définie que le potentiel zêta de la phase stationnaire peut être déduit.

- Dans le cas d'une colonne entièrement polymérisée, l'équation permettant d'accéder à la mobilité électroosmotique réelle est différente. En effet, même si le potentiel appliqué n'a pas besoin d'être corrigé, il faut néanmoins prendre en compte la longueur du chemin réellement parcouru par le marqueur de flux. Dans ce cas :

$$m_{eo_{réelle2}} = \frac{L_e^2 l}{t_{eo} V L} \quad (12)$$

où  $L_e$  pour une colonne entièrement polymérisée est calculée selon l'équation suivante :

$$L_e = L \left( \sqrt{\frac{I_{open}}{I_{remplie}}} \right) \quad (13)$$

### 2. 2. 1. 2- Influence du pourcentage en solvant de la phase mobile sur la mobilité électroosmotique

Comme le montre la relation de Helmholtz-Smoluchowski (équation 7), le FEO dépend du potentiel zêta, de la viscosité et de la constante diélectrique du milieu. La présence de solvant

organique dans l'électrolyte devrait ainsi modifier le flux électroosmotique de par son impact sur ces trois facteurs.

Plusieurs études contradictoires ont été consacrées à l'évolution du flux électroosmotique. En effet, certains auteurs observent une décroissance de la mobilité électroosmotique apparente lorsque la proportion d'acétonitrile contenue dans l'électrolyte augmente, alors que d'autres observent le comportement inverse. Ainsi, Schwer et al. [9] ont observé en EC qu'une augmentation du pourcentage de solvant organique dans l'électrolyte entraîne une diminution de la mobilité électroosmotique, avec un comportement particulier de l'acétonitrile par rapport aux solvants comme l'acétone et le DMSO. En effet la décroissance du flux électroosmotique lorsque l'on augmente le pourcentage d'acétonitrile est moins importante que pour les autres solvants et les valeurs des vitesses électroosmotiques obtenues avec ce solvant sont plus élevées. Ceci est en accord avec les observations de Valko et al. [10] selon lesquelles l'acétonitrile en absence de sels électrolytes permet d'obtenir des mobilités électroosmotiques supérieures à celles obtenues pour l'eau.

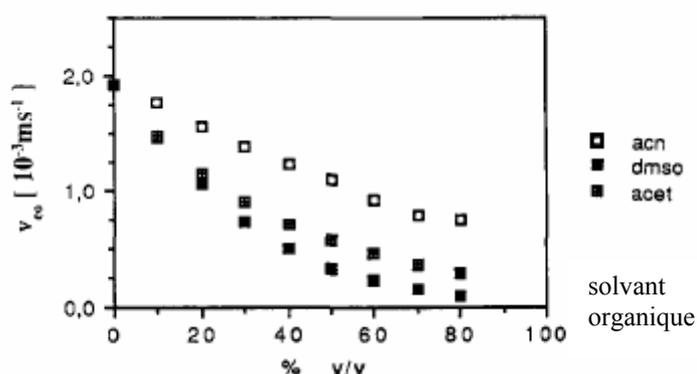


Figure 45 : Variation de la vitesse électroosmotique avec la composition en solvant organique de la phase mobile dans un capillaire en silice vierge ( $L = 96 \text{ cm}$ ,  $l = 43 \text{ cm}$ , diamètre interne :  $100 \mu\text{m}$ ). Les vitesses électroosmotiques de  $2 \cdot 10^{-3} \text{ ms}^{-1}$  et  $1 \cdot 10^{-3} \text{ ms}^{-1}$  correspondent respectivement à des mobilités électroosmotique de  $96 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$  et  $48 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$  ( $E = 208,33 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

Une diminution de la mobilité électroosmotique avec les pourcentages croissants en acétonitrile a également été observée avec des colonnes électrochromatographiques remplies de particules de  $5 \mu\text{m}$  ODS [11] et des colonnes monolithiques polymérisées à partir de méthacrylates possédant des groupements amines tertiaires [12]. Par ailleurs, d'autres études [13-15] ont montré que la mobilité électroosmotique apparente augmente lorsque le pourcentage en acétonitrile augmente, et ce pour des colonnes remplies de particules d'ODS ou d'Hypersil C18.

Les raisons de cette contradiction ne sont pas claires. Une hypothèse émise est que ce contraste peut être dû au choix inadapté du marqueur de flux [13]. Celui-ci doit prendre en compte son affinité avec la phase stationnaire et les propriétés éluantes de la phase mobile, la discontinuité des colonnes duplex pouvant être un facteur aggravant.

Dearie et al. [13] ont comparé le flux électroosmotique apparent obtenu en variant la proportion d'acétonitrile de la phase mobile pour des colonnes duplex dont la partie remplie est plus ou moins longue et pour une colonne entièrement remplie avec des particules de 3  $\mu\text{m}$  d'ODS. La colonne duplex ayant la partie remplie la plus courte donne le flux électroosmotique le plus élevé (Figure 46). Au contraire, la colonne entièrement remplie donne le flux le plus lent. La partie vide a donc une nette influence sur le flux en électrochromatographie. En effet, ils observent une augmentation du flux de 46,6% entre la colonne entièrement remplie et celle comportant la plus longue partie remplie, la seule différence entre ces deux colonnes étant l'ajout de la partie creuse. La présence d'une partie vide influe donc de façon non négligeable sur la vitesse moyenne de la phase mobile.

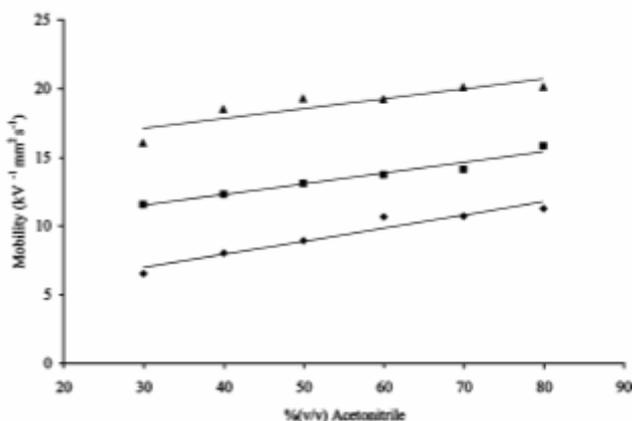


Figure 46 : Effet de la composition en acétonitrile sur la mobilité électroosmotique apparente dans des colonnes duplex et entièrement remplies de particules de 3  $\mu\text{m}$  d'ODS (triangle : partie remplie = 15 cm, L = 45 cm, diamètre interne = 100  $\mu\text{m}$ , carré : partie remplie = 30 cm, L = 45 cm, diamètre interne = 100  $\mu\text{m}$ , losange : L = 30 cm, diamètre interne = 100  $\mu\text{m}$ ). Electrolyte : acétate d'ammonium pH 7 de force ionique 25 mM – acétonitrile (v/v variable) [13]

### 2. 2. 1. 3- Influence du pourcentage en solvant de la phase mobile sur le potentiel zéta

Cette influence a d'abord été étudiée sur un capillaire en silice vierge [9]. Lorsqu'il s'agit de l'acétonitrile, le potentiel zéta diminue en valeur absolue quand la fraction molaire de solvant organique augmente (Figure 47). Cette décroissance résulte de la diminution des charges négatives sur la surface du capillaire. Elle est aussi expliquée par une diminution plus abrupte

du potentiel dans la couche compacte par rapport à un milieu purement aqueux du fait de l'adsorption des molécules de solvant sur la surface du capillaire et de leur présence dans la sphère de solvation des contre-ions adsorbés. Dans ce cas, la constante diélectrique de la couche compacte diminue, ce qui induit une diminution du potentiel zéta.

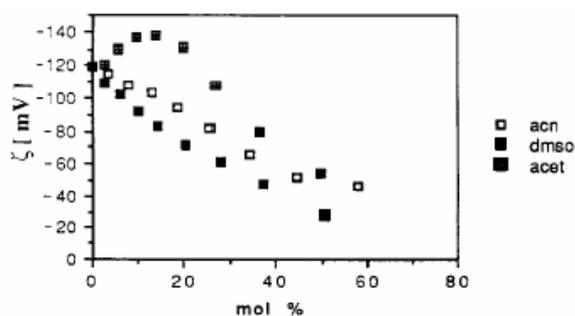


Figure 47 : Variation du potentiel zéta avec la composition en solvant organique dans un capillaire en silice vierge [9].

L'influence de la proportion en acétonitrile de la phase mobile sur le potentiel zéta a été étudiée pour une colonne remplie de particules d'ODS de 3  $\mu\text{m}$  [13]. Les valeurs du potentiel zéta calculées à partir de la mobilité électroosmotique réelle (selon Rathore [1]) et celles mesurées par LDV (laser doppler velocimetry) ont été comparées. Le potentiel zéta calculé à partir de la mobilité électroosmotique réelle croît puis décroît lorsque la proportion en acétonitrile augmente, alors que le potentiel zéta mesuré par LDV reste relativement constant. La différence entre les valeurs n'est pas négligeable. Elle est expliquée par le fait que le modèle de Rathore et al., utilisé pour calculer le flux, est basé sur des modèles empiriques et des approximations des phénomènes entrant en jeu.

#### 2. 2. 1. 4- Influence de la force ionique sur le flux électroosmotique

La force ionique est un paramètre qui, comme l'épaisseur de la double couche, influe sur la valeur du potentiel zéta et donc sur la mobilité électroosmotique (équation 6 et 7). Ainsi, nous nous sommes intéressés à l'influence de la force ionique sur la mobilité électroosmotique réelle et apparente.

Choudhary et al. [5], ont étudié l'influence de la force ionique de la phase mobile sur le flux électroosmotique apparent dans une colonne remplie de particules de phase stationnaire d'ODS de 3,5  $\mu\text{m}$  ainsi que dans un capillaire de silice vierge. Dans les deux cas, la vitesse électroosmotique apparente diminue lorsque la force ionique de la phase mobile augmente. Ce comportement est en accord avec la théorie du flux électroosmotique (équations 6 et 7). Les

mêmes observations ont été réalisées pour des colonnes remplies de particules de silice de 3  $\mu\text{m}$  greffées avec des groupements phényle [15] : la mobilité apparente croît linéairement avec l'inverse de la racine carrée de la force ionique.

Par ailleurs, une diminution de la force ionique du milieu peut permettre d'observer un phénomène de recouvrement de la double couche dans des pores de la phase stationnaire dont la taille est inférieure à dix fois la longueur de Debye. Ainsi leur accès pour les espèces de la phase mobile sera limité et une diminution de la mobilité électrosmotique par rapport à la linéarité attendue doit être observée. Cela a été effectivement constaté avec une phase monolithique polymérisée à partir de butyl-acrylate [7].

Progent et al. [16] ont montré que, dans une colonne remplie de phase mixte en  $\text{C}_{23}$ , la mobilité électrosmotique apparente est indépendante de la concentration en tampon alors que la mobilité électrosmotique réelle décroît fortement aux faibles concentrations puis plus faiblement aux concentrations plus élevées. Cette différence de comportement peut être due au fait que la mobilité électrosmotique apparente est constante de par la superposition de deux phénomènes opposés. Le premier est la diminution de l'épaisseur de la double couche lorsqu'une augmentation de la concentration se produit, induisant ainsi une décroissance de la mobilité électrosmotique. Le second correspond à la baisse de tortuosité lorsqu'il y a recouvrement de la double couche dans les pores entraînant une augmentation du flux aux faibles concentrations. L'effet de la tortuosité est pris en compte lors du calcul de la mobilité électrosmotique réelle, le comportement observé pour celle-ci est donc simplement dû à la diminution de l'épaisseur de la double couche. Dans ce cas, lorsque la force ionique augmente, l'épaisseur de la double couche diminue et la mobilité électrosmotique décroît.

### *2. 2. 2 Résultats expérimentaux*

#### 2. 2. 2. 1- Influence du pourcentage d'acétonitrile dans la phase mobile

Au cours de cette étude, nous nous sommes donc intéressés à l'influence du pourcentage volumique d'acétonitrile contenu dans la phase mobile (de 80/20 à 20/80 ACN – tampon phosphate pH 6,8) sur les valeurs de la mobilité électrosmotique réelle et apparente. Par ailleurs, cette étude a été réalisée à force ionique constante ( $I = 1,75 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ). Le marqueur de flux électrosmotique utilisé est le formamide (de concentration  $4 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ ). Par ailleurs, l'injection est de type électrocinétique et non hydrodynamique pour s'affranchir de la pression en tête de colonne liée à la présence d'une phase stationnaire. Afin de pouvoir déterminer

l'influence de la présence de phase stationnaire dans le capillaire, le flux électroosmotique a été mesuré pour différents types de colonnes :

- capillaire vide en silice vierge (75 $\mu$ m x 36 cm, détection située à 27,5 cm)
- capillaire silanisé par des groupements 3-triméthoxysilylpropylméthacrylate (75 $\mu$ m x 36 cm, détection située à 27,5 cm)
- colonne polymérisée jusqu'à la fenêtre de détection (75 $\mu$ m x 36,1 cm, détection située à 27,6 cm)
- colonne entièrement polymérisée par un mélange à base d'hexylacrylate (75 $\mu$ m x 35,5 cm, détection située à 27 cm)

Pour le capillaire en silice vierge et pour le capillaire silanisé, le flux électroosmotique a été mesuré en électrophorèse de zone. Dans ce cas, la mobilité réelle et la mobilité apparente ont la même expression (équation 8). Pour les colonnes polymérisées, le flux électroosmotique a été mesuré en utilisant les expressions de la mobilité électroosmotique apparente et réelle. C'est cette dernière expression qui tient compte des modifications dues à la présence d'une phase stationnaire dans le capillaire (équation 9 et 12). C'est donc les valeurs de la mobilité électroosmotique réelle que nous présentons, cependant nous avons comparé les valeurs des deux modes de calculs car tous deux sont employés à l'heure actuelle dans la littérature.

Pour les colonnes partiellement et entièrement polymérisées, la mobilité électroosmotique réelle est plus élevée que la mobilité électroosmotique apparente. En effet, le calcul de la mobilité réelle prend en compte la longueur parcourue par le flux électroosmotique dans la phase stationnaire donc la tortuosité de la phase stationnaire (équation 11 et 13) ce qui n'est pas le cas du calcul de la mobilité apparente qui prend en compte la longueur extérieure (équation 8). La longueur réellement parcourue par le FEO étant toujours supérieure à la longueur totale de la colonne et à la longueur utile, la mobilité réelle est plus élevée que la mobilité apparente, si d'autres effets n'entrent pas en jeu.

Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 48. Pour les quatre types de colonnes, on observe une décroissance de la mobilité électroosmotique réelle et apparente lorsque le pourcentage d'acétonitrile de la phase mobile augmente. Cette décroissance peut s'expliquer par les variations du rapport  $\epsilon/\eta$  et du potentiel zéta. Les valeurs obtenues pour le capillaire en silice vierge sont en accord avec les valeurs de la littérature. Les valeurs de la mobilité électroosmotique apparente de la colonne partiellement polymérisée, non représentées, sont

supérieures aux valeurs de la colonne polymérisée dans sa totalité. La partie vide de la colonne polymérisée a donc une influence sur la mobilité électroosmotique apparente.

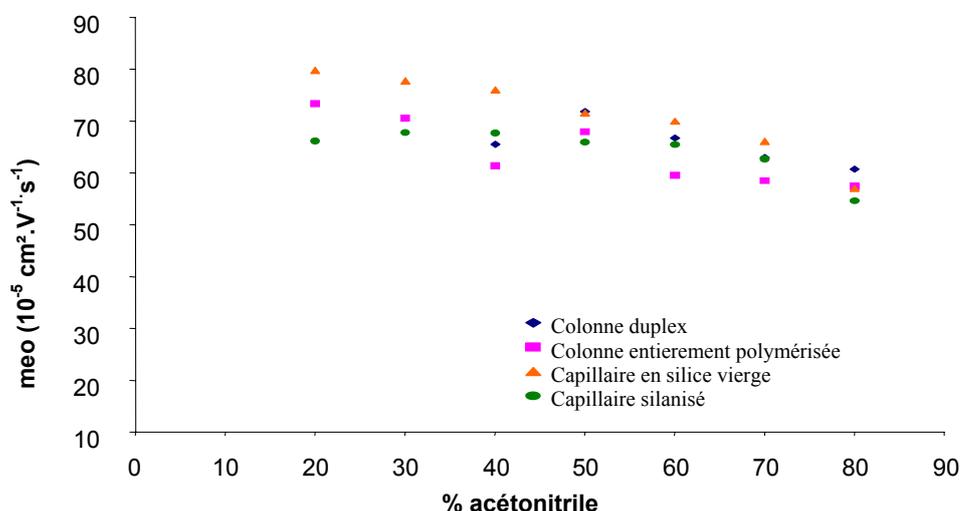


Figure 48 : Evolution de la mobilité électroosmotique réelle pour divers types de colonnes en fonction du pourcentage en volume d'acétonitrile présent dans l'électrolyte. Colonne : longueur utile 27.5 cm, longueur totale, 36 cm. Electrolyte : tampon phosphate pH 6,8 en milieu eau - acétonitrile (v/v variable), force ionique : 1,75 mM. Température : 25 °C. Détection par absorbance UV à 200 nm. Injection électrocinétique : 4 kV/ 4s

Comparons dans un premier temps les valeurs de la mobilité électroosmotique obtenues pour le capillaire en silice vierge et le capillaire silanisé. Des valeurs plus faibles sont observées pour le capillaire silanisé, mais celles-ci ne sont pas nulles. Cela confirme le fait que lors de la réaction de silanisation, tous les silanols de la paroi du capillaire ne réagissent pas avec un groupement silane, pour des raisons d'encombrement stérique, si bien qu'il reste des groupements Si-OH à la surface. C'est pourquoi malgré la silanisation, on mesure le flux électroosmotique mesuré dans ces capillaires mais de moindre valeur par rapport au capillaire non silanisé.

Dans un second temps, les valeurs de FEO déterminées pour le capillaire en silice vierge ont été comparées à celle d'une colonne entièrement polymérisée. Le FEO mesuré dans un capillaire en silice vierge est plus important que celui mesuré dans la colonne polymérisée dans sa totalité. Ce comportement peut être expliqué par la différence entre les groupements chargés de surface ou par un taux de charge par unité de surface moins important. En effet, dans une colonne polymérisée le FEO est généré par des groupements sulfonates ( $\text{SO}_3^-$ ), 0,5% du mélange de monomère, alors que dans un capillaire en silice vierge le FEO est généré par des groupements silanols ( $\text{SiO}^-$ ). De plus, la surface développée d'un monolithe est très

supérieure à celle d'un capillaire de silice vierge c'est pourquoi la densité de charges par unité de surface est moins importante. On remarque toutefois, que l'écart entre les valeurs s'amenuise lorsque le pourcentage d'acétonitrile de la phase mobile augmente. Ceci pourrait être dû à la différence d'ionisation des groupements générant le flux, à la formation de paires d'ions, lorsque le pourcentage en acétonitrile de la phase mobile augmente. Il aurait aussi pu être intéressant d'augmenter le pourcentage de monomère chargé dans la composition du mélange réactionnel, afin d'augmenter la densité de charges par unité de surface. Néanmoins, d'après les résultats récents de la littérature [7,17-19], une augmentation du pourcentage en monomère chargé entraîne une augmentation du FEO jusqu'à atteindre un plateau [17-19] ou une valeur maximale après laquelle intervient une faible décroissance [7]. L'effet de cette augmentation est limité et c'est pour cela que cette étude n'a pas été entreprise.

La comparaison entre les valeurs de la mobilité réelle obtenues pour la colonne partiellement polymérisée et celles obtenues pour la colonne entièrement polymérisée s'avère plus délicate. En effet, nous n'observons pas de tendance réelle mais les valeurs observées restent toutefois assez proches. Dans ce cas, la présence d'une partie vide silanisée semble générer un effet minime, contrairement à ce qu'observent Dearie et al. [13], en travaillant avec la mobilité électroosmotique apparente.

Bien qu'il existe des différences, le flux électroosmotique généré par les monolithes est du même ordre de grandeur que celui généré par un capillaire en silice vierge. Les densités de charges surfaciques de la colonne monolithique et celle du capillaire en silice vierge peuvent donc elles aussi être considérées du même ordre de grandeur (équation 6 et 7). Étant donné que la surface des monolithes est plus importante que la surface d'un capillaire, il est possible d'en déduire que les monolithes comportent plus de groupements chargés que la paroi du capillaire en silice vierge, ce qui semble assez naturel. Ceci est vrai si l'on considère que tout le flux est généré par les monolithes dans une colonne polymérisée et non pas par les parois du capillaire. Cette hypothèse est faite au regard des images MEB de la phase stationnaire (chapitre 2) qui montrent un recouvrement complet de la surface du capillaire par le monolithe. Les silanols ne participeraient plus à la génération du flux électroosmotique. Afin de vérifier cette hypothèse, il faudrait entreprendre une étude des variations du FEO en fonction du pH de la phase mobile.

### 2. 2. 2. 2. - Influence du pourcentage d'acétonitrile sur le potentiel zéta

Comme décrit précédemment, la mobilité électroosmotique dépend de la constante diélectrique du milieu ( $\epsilon$ ), de sa viscosité ( $\eta$ ) et du potentiel zéta (équation 7). Il est alors intéressant de comparer l'évolution de la mobilité électroosmotique à l'évolution du rapport  $\epsilon/\eta$  en fonction du pourcentage en acétonitrile de la phase mobile, présenté sur la Figure 49.

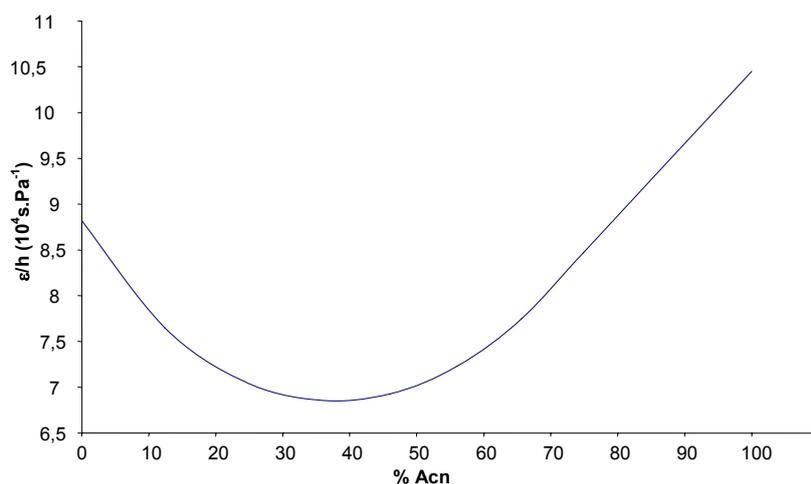


Figure 49 : Influence du pourcentage d'acétonitrile de la phase mobile (tampon phosphate pH 6,8 en milieu eau - acétonitrile v/v variable) sur le rapport  $\epsilon/\eta$  à 25°C.

La courbe représentée sur la Figure 49 montre que le rapport  $\epsilon/\eta$  décroît lorsque le pourcentage en acétonitrile augmente jusqu'à 40 %, son minimum. L'allure de cette courbe n'est pas superposable avec celles représentant l'influence de la proportion d'acétonitrile de la phase mobile sur la mobilité électroosmotique réelle pour les quatre types de colonnes étudiées. Ceci montre que la mobilité électroosmotique dépend également de la variation du potentiel zéta. Afin de mieux comprendre l'évolution du FEO en fonction du pourcentage en acétonitrile, nous l'avons comparé à l'évolution du rapport  $\epsilon/\eta$ , présentée sur la Figure 50.

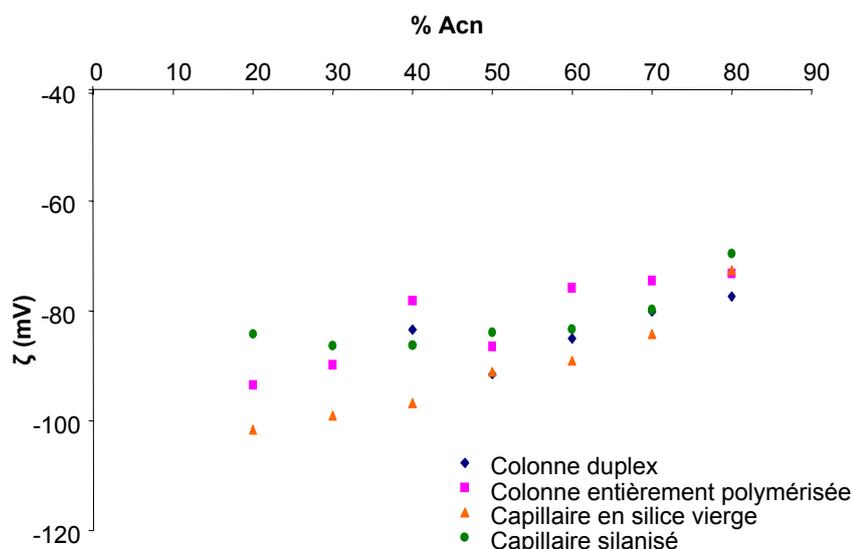


Figure 50 : Evolution du potentiel zêta en fonction du pourcentage d'acétonitrile présent dans l'électrolyte. Colonne : longueur utile 27.5 cm, longueur totale, 36 cm. Electrolyte : tampon phosphate pH 6,8 en milieu eau - acétonitrile (v/v variable), force ionique =  $1,75 \cdot 10^{-3} M$ . Tension : +25 kV. Température : 25 °C. Détection par absorbance UV à 200 nm. Injection électrocinétique : 4 kV/ 4s

Le potentiel zêta décroît en valeur absolue lorsque le volume d'acétonitrile contenu dans l'électrolyte augmente de 20 à 80 % (Figure 50). Il est intéressant de remarquer que ce comportement est observé pour les quatre colonnes utilisées, que le potentiel zêta soit généré par des groupements silanol ou sulfonate. Les valeurs obtenues pour le capillaire en silice vierge sont en accord avec les valeurs de la littérature. La décroissance observée peut être reliée au phénomène suivant : la constante diélectrique de la phase mobile diminue avec le pourcentage en acétonitrile, entraînant une augmentation des interactions électrostatiques. Ces interactions étant à l'origine de la formation et de l'épaisseur de la double couche électrique, la présence d'un certain pourcentage d'acétonitrile pourrait ainsi entraîner une diminution du potentiel zêta de la phase stationnaire monolithique et de la paroi du capillaire. L'écart entre les valeurs des différentes colonnes s'amenuise lorsque le pourcentage d'acétonitrile de la phase mobile augmente. Lorsque l'on modifie la composition de la phase mobile utilisée, à la fois la force éluante et le débit de celle-ci sont modifiés. En effet, la force éluante de la phase mobile augmentera avec le pourcentage en acétonitrile alors que le débit diminuera car le flux électroosmotique diminue quand le pourcentage en acétonitrile augmente. Il sera donc nécessaire de faire des compromis pour obtenir des séparations performantes.

### 2. 2. 2. 3 - Influence de la force ionique de la phase mobile

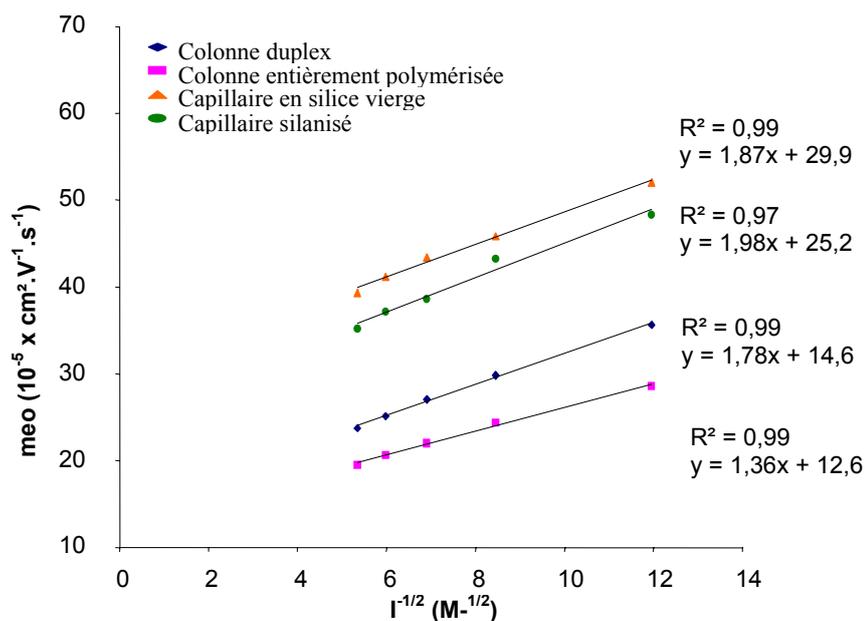
Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés à l'influence de la force ionique de la phase mobile (60/40 ACN – tampon phosphate pH 6,8 de force ionique de  $7 \cdot 10^{-3}$  à  $3,5 \cdot 10^{-2} M$ )

sur les valeurs de la mobilité électroosmotique réelle et apparente. Le marqueur de flux électroosmotique utilisé est le formamide (de concentration  $4.10^{-2}$  M). Afin de pouvoir déterminer l'influence de la présence de phase stationnaire dans le capillaire, le flux électroosmotique a été mesuré pour les quatre types différents de colonnes décrits précédemment.

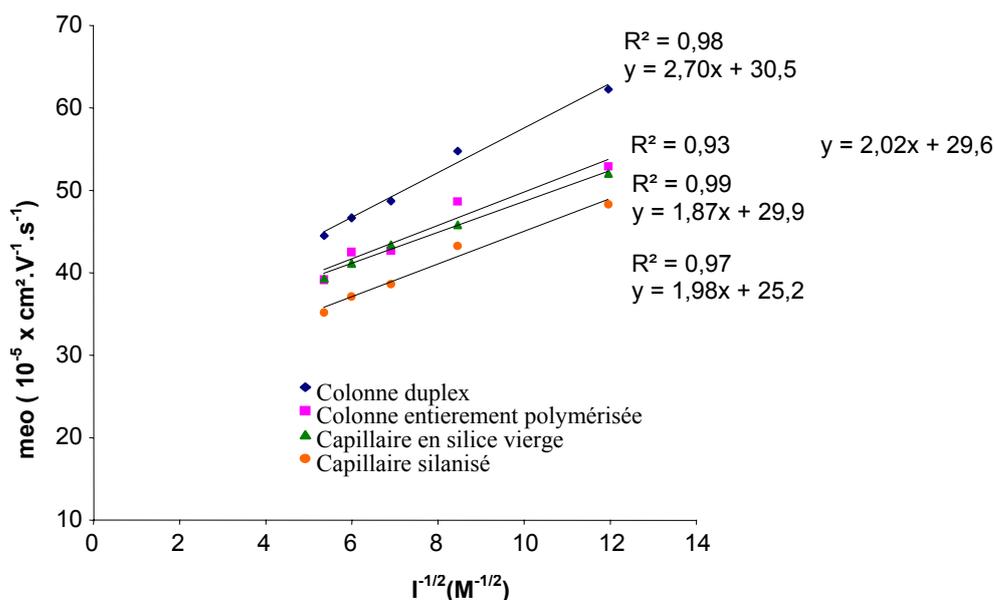
Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 51 A et B. Pour les quatre types de colonnes, on observe une croissance linéaire de la mobilité électroosmotique réelle et apparente en fonction de l'inverse de la racine carrée de la force ionique de la phase mobile. Ces observations sont en accord avec les équations théoriques (6 et 7) et concordent avec les comportements observés dans la littérature [13]. Comme précédemment, les valeurs de la mobilité électroosmotique apparente de la colonne partiellement polymérisée sont supérieures aux valeurs de la colonne polymérisée dans sa totalité, confirmant que la partie vide de la colonne polymérisée a une influence sur la mobilité électroosmotique apparente.

Nos résultats indiquent que l'évolution de la mobilité électroosmotique réelle et celle de la mobilité apparente sont du même ordre de grandeur pour les quatre types de colonnes. De plus, les études de la porosité en fonction de la force ionique ont montré que celle-ci était constante quelle que soit la force ionique du milieu. Ces résultats nous ont permis de conclure à l'absence de phénomènes de recouvrement de la double couche aux faibles forces ioniques, ce qui explique le comportement similaire des mobilités apparentes et réelles. Il n'y a donc pas de diminution de la mobilité réelle par rapport à la mobilité apparente, contrairement à ce qui a été observé par Progent et al. [16]. Dans ce cas, la mobilité électroosmotique réelle ne dépend que de la diminution de l'épaisseur de la double couche comme c'est le cas pour la mobilité électroosmotique apparente (équations 6 et 7)

Les pentes des droites de régression observées lors de l'étude de l'influence de la force ionique de la phase mobile sur la mobilité électroosmotique réelle comme sur la mobilité électroosmotique apparente ne sont pas identiques d'une colonne à l'autre. Les variations observées résultent de la différence de densité de charges surfaciques entre les colonnes. Néanmoins, comme dans l'étude précédente, les valeurs de l'écoulement électroosmotique générées par les monolithes sont du même ordre de grandeur que les valeurs générées par un capillaire en silice vierge, et ceci quelle que soit la force ionique de la phase mobile. Ces résultats confirment que la densité de charge surfacique de la colonne polymérisée et celle du capillaire en silice vierge sont elles aussi du même ordre de grandeur (équation 6 et 7).



A



B

Figure 51 A et B : Evolution de la mobilité électroosmotique apparente (A) et réelle (B) dans différentes colonnes en fonction de l'inverse de la racine carrée de la force ionique de l'électrolyte. Colonne : longueur utile 27.5 cm, longueur totale, 36 cm. Electrolyte : tampon phosphate pH 6,8 en milieu acétonitrile-eau (60:40, v/v), force ionique variant de  $3,5 \cdot 10^{-3}$  à  $3,5 \cdot 10^{-2}$  M. Tension : +25 kV. Température : 25 °C. Détection par absorbance UV à 200 nm. Injection électrocinétique : 4 kV/ 4s

### 2.3 Conclusion

En conclusion, les phases monolithiques étudiées lors de ces travaux présentent des caractéristiques poreuses et de l'écoulement électroosmotique particulièrement intéressantes. En effet, la porosité estimée de ces phases reste constante quelles que soient les variations de

composition en solvant ou en concentration de sels de la phase mobile. Aucun phénomène de recouvrement de double couche électrique ou de gonflement de ces phases stationnaires polymériques n'a été mis en évidence. Ceci permet d'obtenir un monolithe dont la surface développée ne varie pas selon les conditions d'analyse. De plus, le flux électroosmotique des colonnes monolithiques étudiées est du même ordre de grandeur que celui d'un capillaire en silice vierge ce qui permet de réaliser des analyses rapides. Les variations du FEO en fonction des conditions d'analyses sont par ailleurs similaires à celles observées sur un capillaire de silice vierge. Les colonnes totalement et partiellement remplies ont également un comportement similaire et des valeurs de FEO proches, ce qui permet d'utiliser indifféremment l'une ou l'autre des géométries.

### 3. Modes de séparation étudiés

Plusieurs types de monomères et d'association de monomères ont été utilisés au cours de ces travaux, conduisant à des monolithes différents. Tout d'abord les différents mélanges et leurs monomères seront présentés. Puis suivront leurs caractéristiques et leurs intérêts séparatifs. Enfin une étude plus approfondie a été menée sur une phase stationnaire de type hydrophobe, sélectionnée pour ses bonnes performances concernant les applications à développer en capillaire et en microsystème.

Les monomères employés lors de ces travaux ont été le ButylAcrylate (BA), l'HexylAcrylate (HA), le ButylMéthAcrylate (BMA), le 2-HydroxyEthylMéthAcrylate (HEMA), le GlycidylMéthAcrylate (GMA), l'Éthylène DiMéthAcrylate (EDMA), le 1,3-butanediol diacrylate (BDDA). Plusieurs monomères chargés ont aussi été employés : l'acide 2-acrylamido-2-méthyl-1-propanesulfonique (AMPS), l'acide acrylique (AA) et le chlorure de [2-(acryloyloxy)ethyl]triméthylammonium] (AETA). Ceux-ci sont décrits en annexe 2.

Le Tableau 6 permet de distinguer quels sont les groupements fonctionnels qui diffèrent d'un monolithe à l'autre à partir des premiers monolithes développés au cours de cette étude, soit l'hydrophobie, soit la charge d'un monomère. Ainsi, le groupement butyl a été remplacé par un groupement hexyl. Puis, le groupement sulfonate de l'AMPS a été substitué par le groupement acide carboxylique de l'acide acrylique. Enfin, dans un autre mélange réactionnel, un monomère chargé positivement, de par son groupement ammonium quaternaire, l'AETA (chlorure de [2-(acryloyloxy)ethyl]triméthylammonium]) remplace le monomère chargé négativement.

Composition du mélange	Formules des principaux monomères	Variation de la composition
BA-AMPS-BDDA	<chem>C=CC(=O)OCCCC</chem> <chem>C=CC(=O)N(C)(C)S(=O)(=O)O</chem>	Mélange primaire
HA-AMPS-BDDA	<chem>C=CC(=O)OCCCCCC</chem> <chem>C=CC(=O)N(C)(C)S(=O)(=O)O</chem>	Variation de l'hydrophobie
HA-AA-BDDA	<chem>C=CC(=O)OCCCCCC</chem> <chem>C=CC(=O)O</chem>	Variation de la charge, monomère anionique
BA-AETA-BDDA	<chem>C=CC(=O)OCCCC</chem> <chem>C=CC(=O)OCCN(C)(C)C</chem> Cl <sup>-</sup>	Variation de la charge, monomère cationique

Tableau 6 : Tableau récapitulatif de la composition des mélanges réactionnels utilisés au cours de ces travaux.

D'autres variations d'hydrophobie ont aussi été réalisées à partir de mélanges de monomères acrylates et méthacrylates, cependant ceux-ci n'ont pas donné lieu à la formation de phases stationnaires monolithiques, Figure 52.

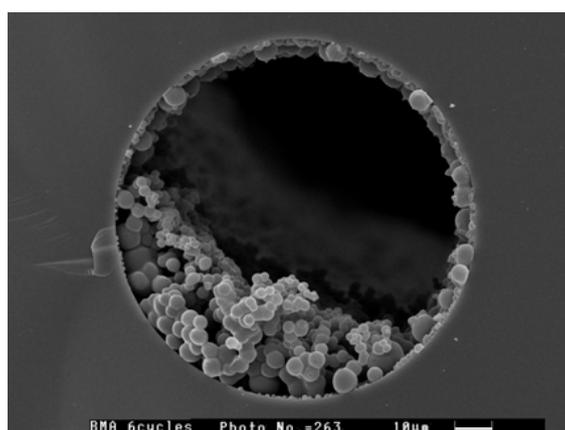


Figure 52 : image MEB de la structure polymérique obtenue avec un mélange réactionnel contenant du BMA- BDDA-AMPS.

Une structure polymérique se développe alors dans le capillaire mais se limite à un revêtement inhomogène des parois. La taille des globules est plus importante et plus dispersée

que celle obtenue avec les monolithes précédents. Ils sont compris entre 800 nm et 5  $\mu\text{m}$ , comme le montre la Figure 52. Aucune séparation n'a pu être effectuée sur ce matériau. Cela peut tout d'abord provenir des proportions désormais inadaptées du mélange réactionnel mais également de réactivités différentes entre les monomères acryliques et méthacryliques.

Il faut également constater ici qu'étant donné la composition du mélange de solvants porogènes, il n'est pas possible d'augmenter significativement l'hydrophobie du monomère principal, le butylacrylate, sous peine de voir le mélange réactionnel démixer. Ainsi, des phases à base de laurylacrylate-BDDA-AMPS ne sont pas concevables avec ce mélange de solvants porogènes. Cependant, des mélanges à base de butylacrylate comportant un faible pourcentage de laurylacrylate ont donné lieu à des phases stationnaires monolithiques dont les performances ne sont pas plus intéressantes qu'avec du butylacrylate.

### **3. 1 Performances et comportements séparatifs des diverses colonnes monolithiques**

#### *3. 1. 1 Phase négativement chargée, effet de la variation de l'hydrophobie du monomère*

##### 3. 1. 1. 1 – Phases à base de butylacrylate

Des phases à base de 1,3-butanediol diacrylate, de 2-acrylamido-2-méthyl-1-propanesulfonique et de butylacrylate ont été testées sur divers mélanges tests puis sur des composés d'intérêts environnementaux tels que des HAP, des pesticides et leurs métabolites. Ces séparations permettent d'estimer leur capacité à se comporter comme un matériau séparatif dans un premier temps puis à évaluer leurs caractéristiques rétentives. Les premiers mélanges tests à avoir été utilisés sont composés de divers dérivés benzéniques et leurs séparations sont présentées sur la Figure 53 et sur la Figure 54. Les séparations obtenues sont rapides, réalisées en moins de 10 minutes, avec de bonnes efficacités comprises entre 220 et 260 000 plateaux/m.

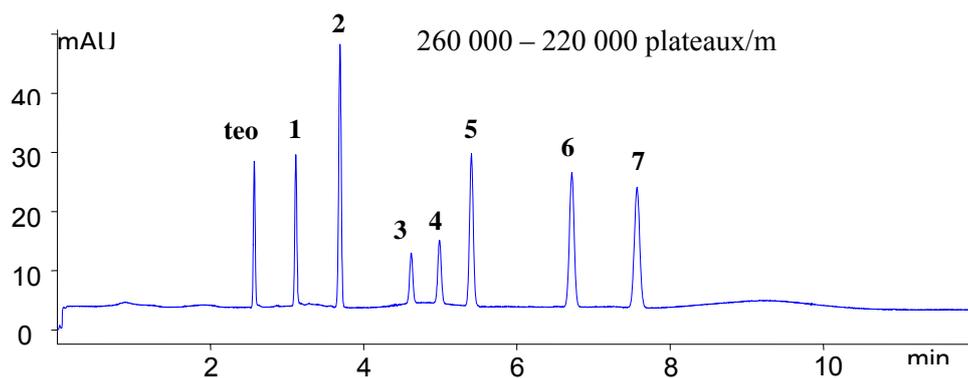


Figure 53 : Séparation de sept dérivés benzéniques sur une colonne monolithique à base de BA-BDDA-AMPS :  $L = 33$  cm,  $l = 24,5$  cm,  $d_c = 75\mu\text{m}$ . Tension : + 15 kV. Phase mobile : acétonitrile-tampon phosphate, 5mM, pH=7,1 (80 : 20, v/v). Injection : 3kV, 3sec. Détection à 200 nm. Marqueur de flux électroosmotique : formamide. Composés tests : **1** : alcool benzylique, **2** : benzaldéhyde, **3** : benzène, **4** : toluène, **5** : ethylbenzène, **6** : butylbenzène, **7** : pentylbenzène.

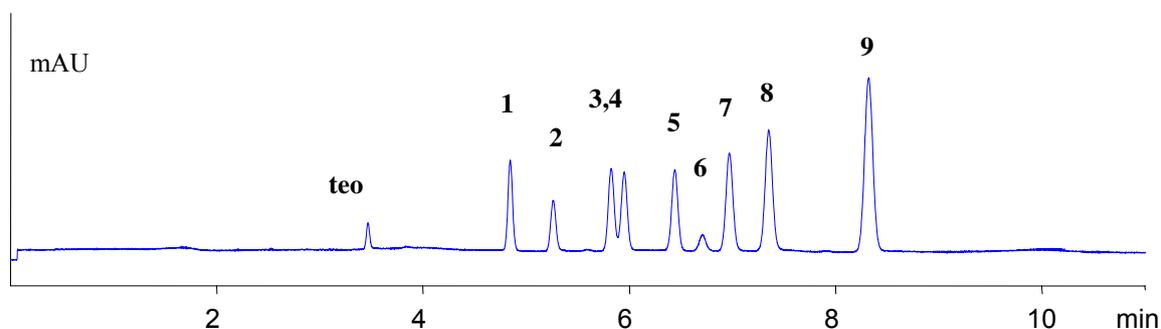


Figure 54 : Séparation de dérivés de l'aniline sur une colonne monolithique à base de BA-BDDA-AMPS. Tension : + 10 kV. Electrolyte : acétonitrile-tampon phosphate, 5mM pH=7,1 (80 : 20, v/v). Injection : 3kV, 3sec. Détection à 208 nm. teo : formamide, marqueur de FEO. Composés tests : **1** : aniline, **2** : 2,4-dinitro-aniline, **3** : 4-chloro-aniline, **4** : 3-nitro-toluène, **5** : 1-chloro-4-nitro-benzène, **6** : 4-chloro-2-nitro-aniline, **7** : 4-chloro-2-nitro-toluène, **8** : 2,5-dichloro-nitrotobenzène, **9** : 2,5 - dichloro-aniline.

La Figure 55 présente une séparation de mélange de pesticides et leurs métabolites, et la Figure 56 d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Ces analyses mettent en évidence la grande gamme de polarité couverte par ces phases monolithiques et leurs performances séparatives en ECC. En effet, les composés séparés sur la Figure 55 couvrent une gamme de constante de partage eau – octanol, ou log P, allant de 0 à 3,7, et ceux séparés sur la Figure 56, une gamme d'hydrophobie allant de 3,4 à 5,2 en mode isocratique. Par ailleurs les temps d'analyse sont assez rapides et la résolution donc l'efficacité du système chromatographique sont bonnes. L'efficacité mesurée sur les pics des divers composés varie entre 200 à 225 000 plateaux/m. L'ordre d'élution suit les hydrophobies croissantes comme c'est le cas en CPL à polarité de phase inversée. Cependant dans cette dernière méthode il est

très difficile d'analyser des composés répartis sur cette gamme de polarité en mode isocratique et il faut alors l'application d'un large gradient.

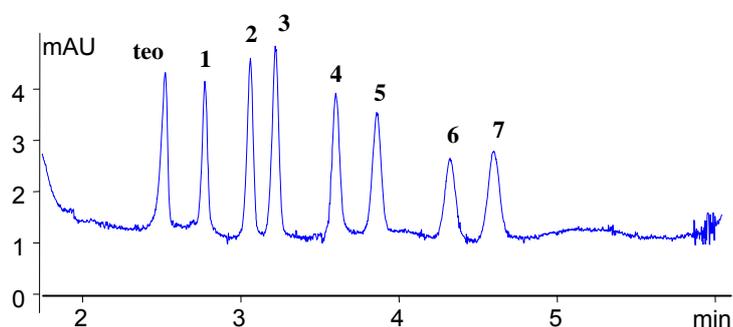


Figure 55 : Séparation de pesticides et métabolites de la famille des triazines sur colonne monolithique à base de BA-BDDA-AMPS,  $l = 24.5$  cm,  $L = 33$ cm,  $d_i = 100$   $\mu$ m. Tension : + 15 kV. Phase mobile : acétonitrile-tampon phosphate 5mM pH=7.1 (80:20, v/v). Détection à 214 nm. Injection : 3kV, 3sec. teo : formamide, marqueur de FEO, solutés : **1** : DDA, **2** : DIA, **3** : DEA, **4** : simazine, **5** : atrazine, **6** : terbutylazine, **7** : terbutryne, chacun à 10 mg/L.

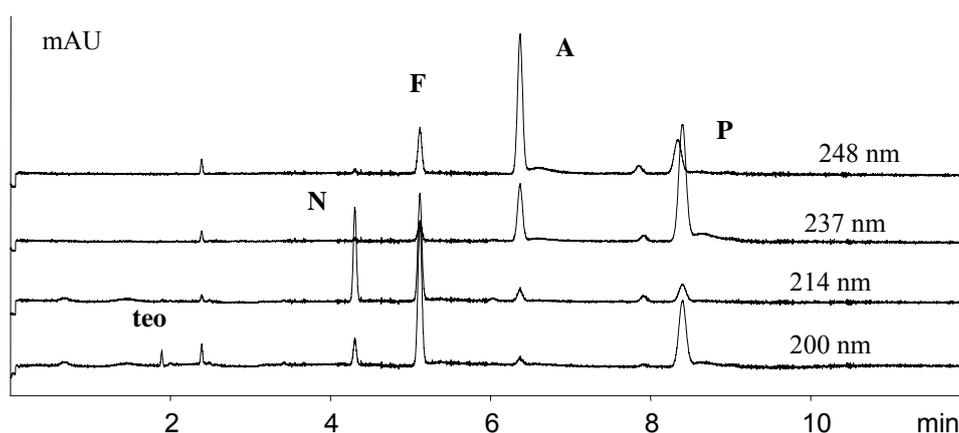


Figure 56 : Séparations de quatre hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sur colonne monolithique à base de BA-BDDA-AMPS,  $l = 24.5$  cm,  $L = 33$ cm,  $d_i = 100$   $\mu$ m. Tension : + 20 kV. Phase mobile : acétonitrile-tampon phosphate 5mM pH=7,1 (80 : 20, v/v). Injection : 3kV, 3sec. Teo : formamide, marqueur de FEO, **N** : naphtalène, **F** : fluorène, **A** : anthracène, **P** : pyrène entre 0,2 et 0,05 g/L

### 3. 1. 1. 2- Phases à base d'hexylacrylate : effet de la longueur de la chaîne

Des phases à base d'hexylacrylate ont été développées en substituant le pourcentage en monomère BA par un même pourcentage de monomère HA sans nuire aux propriétés séparatives du monolithe. Etant donné que la longueur de la chaîne alkyle se trouve augmentée de deux carbones, on s'attend à observer une augmentation de la rétention mais aussi une augmentation de la sélectivité. La comparaison des facteurs de rétention entre ces deux types de phases pour les mêmes composés est présentée Figure 57.

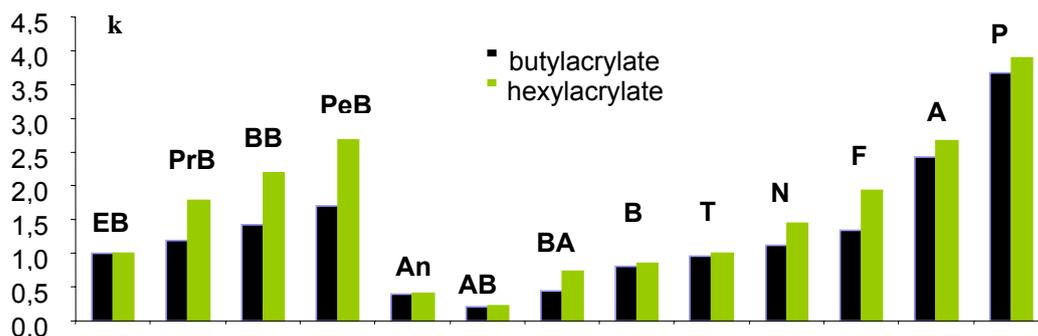


Figure 57 : Diagramme présentant les facteurs de rétention obtenus sur colonne monolithique à base de butylacrylate et d'hexylacrylate. EB : éthylbenzène, PrP : propylbenzène, BB : butylbenzène, PeB : pentylbenzène, An : aniline, AB : alcool benzylique, B : nezène, T : toluène, N : naphtalène, F : fluorène, A : anthracène, P : pyrène.

Une augmentation des facteurs de rétention des composés est ainsi observée, cependant elle est peu marquée. En effet, les facteurs de rétention augmentent légèrement lors du passage d'un mélange polymérique à base de BA à un mélange à base d'HA. Cette faible augmentation peut s'expliquer par l'augmentation limitée à deux atomes de carbones supplémentaires entre ces deux monomères.

La Figure 58 présente une séparation de composés nitrobenzéniques dont la résolution du mélange est plus importante que celle déjà obtenue sur une phase stationnaire à base de butylacrylate, Figure 54. Une augmentation de la sélectivité du système chromatographique est ainsi observable. Par ailleurs les efficacités atteignent des valeurs de 300 000 plateaux/m pour les pics les plus efficaces de cette séparation.

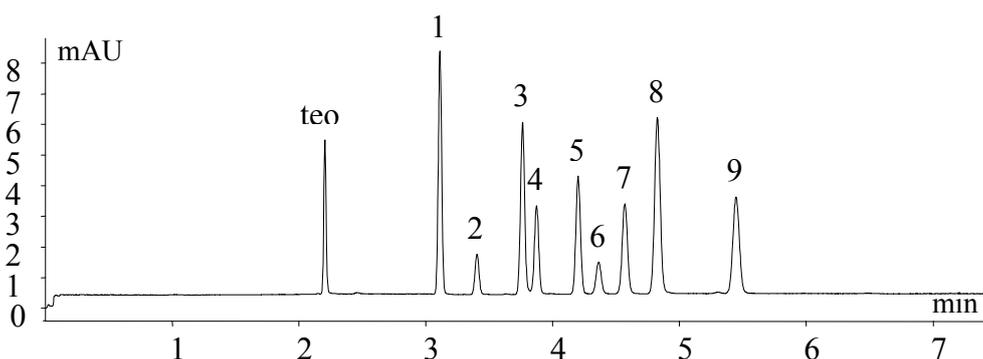


Figure 58 : Séparation de dérivés nitrobenzéniques sur colonne monolithique à base d'HA-AMPS-BDDA. Tension: + 15kV. Phase mobile : acétonitrile-tampon phosphate 5mM pH=7,1 (80 : 20, v/v). teo : formamide, marqueur de flux électroosmotique, **1** : aniline, **2** : 2,4-dinitro-aniline, **3** : 4-chloro-aniline, **4** : 3-nitro-toluène, **5** : 1-chloro-4-nitro-benzène, **6** : 4-chloro-2-nitro-aniline, **7** : 4-chloro-2-nitro-toluène, **8** : 2,5-dichloro-nitrobenzène, **9** : 2,5 -dichloro-aniline

La Figure 59 présente la séparation de mélange tests à base de pesticides présentant des efficacités de l'ordre de 300 000 plateaux/m et pouvant aller jusqu'à 350 000 plateaux/m. Ces

niveaux d'efficacité se retrouvent d'ailleurs pour des composés tels que des pesticides ou des HAP.

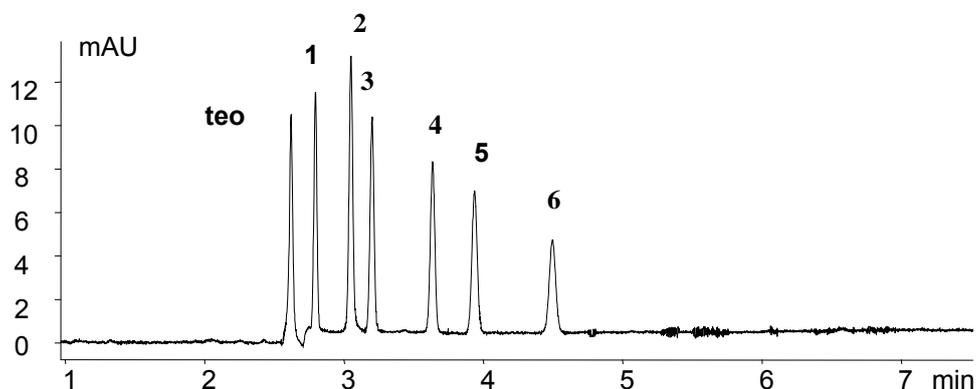


Figure 59 : Séparation de pesticides et de métabolites de la famille des triazines sur colonne monolithique à base de HA-BDDA-AMPS,  $L = 32$  cm,  $l = 24,5$  cm. Tension : + 15 kV. Phase mobile : acétonitrile-tampon phosphate 5mM pH=7.1 (80:20, v/v). Injection : 3kV, 3 s. **teo** : formamide marqueur de flux électroosmotique, **(1)** : DiDealkylAtrazine, **(2)** : DeIsopropylAtrazine, **(3)** : DeEthylAtrazine, **(4)** : simazine, **(5)** : atrazine, **(6)** : terbutylazine (à 10 mg/L).

Il est ainsi intéressant d'augmenter la longueur de la chaîne alkyle du monomère principal du mélange bien que la substitution réalisée n'augmente cette chaîne que de deux carbones, conduisant à de faibles variations de la rétention. Cependant, on ne peut pas concevoir de mélanges réactionnels avec des monomères plus hydrophobes, tels que le laurylacrylate, sauf en faible pourcentage en mélange avec le butylacrylate et les résultats obtenus ne permettent pas d'obtenir une augmentation significative de la rétention.

Par ailleurs, les efficacités obtenues sur ces systèmes séparatifs étant supérieures à celles obtenues avec le BA, il est probable que ce monomère HA s'intègre mieux à la composition générale du mélange à polymériser. Ainsi la cinétique de polymérisation qui en résulte donne lieu à un matériau aux propriétés séparatives plus performantes. C'est pourquoi ces phases ont été utilisées et développées dans les études ultérieures.

### 3. 1. 2 Phases négativement chargées ,effet de la variation de la nature de la charge

Ce monomère AMPS, utilisé pour synthétiser les phases à base de butylacrylate et d'hexylacrylate décrites ci-dessus, possède une fonction acide sulfonique toujours dissociée ce qui permet d'obtenir un flux stable quel que soit le pH de la phase mobile. Ce monomère a été substitué par un autre dont la nature du groupement chargé diffère, il s'agit du groupement acide carboxylique porté par l'acide acrylique (AA). Le comportement de ce groupement fonctionnel dépend du pH de la phase mobile et se trouve ainsi plus ou moins sous sa forme

dissociée ou sous sa forme protonée. Des expériences ont été menées à différents pH sur des phases contenant de l'AA, le FEO étant généré par les groupements carboxylate. Nous avons remarqué qu'à pH = 4,6 et à pH = 2,18 pour la phase mobile, les composés ne sont plus détectables et une ligne de base assez continue est obtenue. Il semblerait donc que les groupements carboxylate soient sous forme acide et ainsi le flux électroosmotique est quasi nul. A pH = 7,2 et 9,2, les groupements carboxylate sont chargés négativement et un FEO est généré permettant de réaliser des séparations.

Les Figure 60 et 61 permettent de comparer deux phases, ne différant que par l'utilisation du monomère chargé. Les caractéristiques séparatives sont comparables, les dérivés benzéniques sont séparés en moins de deux minutes. Nous notons cependant une meilleure efficacité pour la colonne préparée avec l'acide acrylique, 350 000 plateaux/m, par rapport à celle préparée avec l'AMPS, 235 000 plateaux/m. Dans ces deux cas, la phase stationnaire se situe du petit côté du capillaire, l'injection se faisant par ce même petit côté.

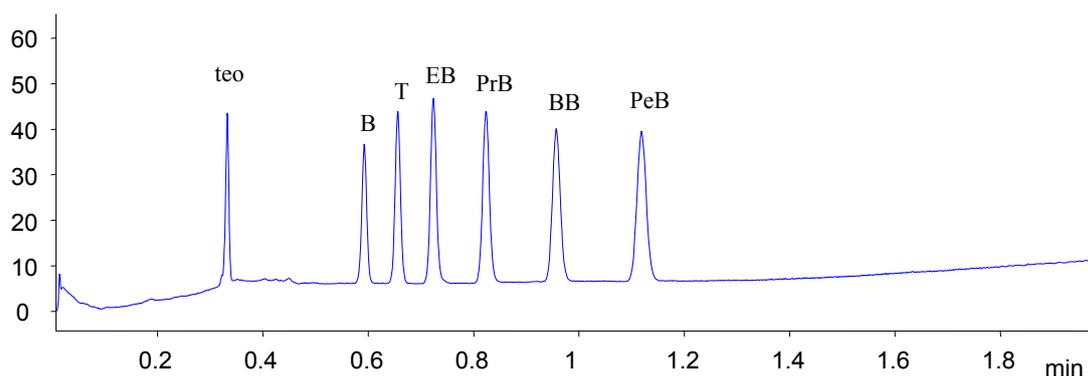


Figure 60 : Séparation de six dérivés benzéniques sur colonne monolithique à base de HA-BDDA-AMPS, L= 35 cm, l = 8,5 cm. Tension : - 30 kV. Phase mobile : acétonitrile-tampon phosphate 5mM pH=7,1 (80 : 20 v/v). Détection à 200 nm. Teo : marqueur de flux, formamide, B : benzène, T : toluène, EB : éthylbenzène, PrP : propylbenzène, BB : butylbenzène, PeB : pentylbenzène.

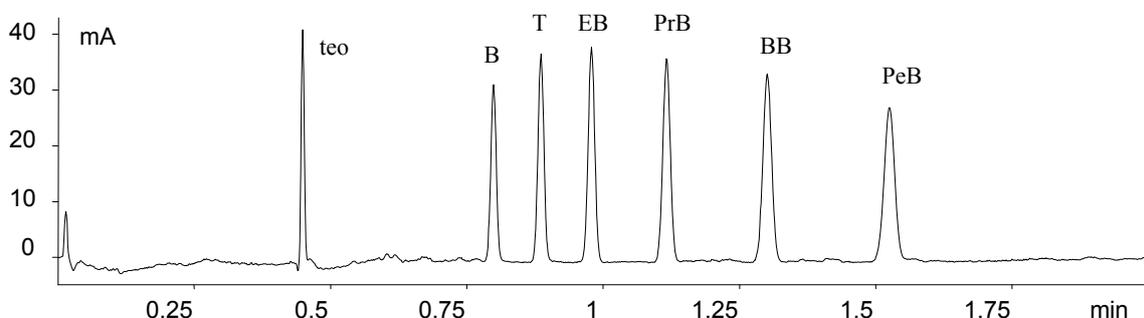


Figure 61 : Séparation de six dérivés benzéniques sur colonne monolithique à base de HA-BDDA-AA, L= 33,3 cm, l = 8,5 cm. Tension : - 30 kV. Phase mobile : acétonitrile-tampon phosphate 5mM pH=7,1 (80 : 20 v/v). Détection à 200 nm. Teo : marqueur de flux, formamide, B : benzène, T : toluène, EB : éthylbenzène, PrP : propylbenzène, BB : butylbenzène, PeB : pentylbenzène.

Dans les exemples précédents, les colonnes utilisées pour réaliser ces expériences ont été polymérisées du petit côté du capillaire, soit une longueur efficace de 8,5 cm, afin de mimer les conditions des microsystèmes analytiques, ceux dont nous disposons possèdent une longueur de canal séparatif de 10 cm environ. Les figures précédentes en présentent les spécificités : temps d'analyse plus court, efficacités similaires à celles décrites pour des colonnes d'une vingtaine ou d'une trentaine de centimètres. Ce format de colonne est donc tout à fait approprié à l'ECC, et donne des séparations très rapides. Par ailleurs, la longueur efficace des colonnes a été augmentée jusqu'à 60 cm et des efficacités de l'ordre de 250 000 plateaux/m ont été obtenues. Ceci indique la parfaite possibilité de synthétiser un polymère homogène sur une grande longueur.

### *3. 1. 3 Phases positivement chargées*

Les phases négativement chargées ont tendance à engendrer des adsorptions irréversibles de composés tels que des protéines chargées positivement, dues aux fortes interactions électrostatiques. C'est pourquoi les phases cationiques ont été développées pour l'analyse de peptides et de protéines positivement chargés à pH acide.

La préparation de telles phases nécessite la substitution de l'agent silanisant habituel, par un agent silanisant chargé positivement, l'hydrochlorure de N-[3(triméthoxysilyl)propyl] N'-(4-vinylbenzyl) éthylenediamine par exemple. L'utilisation d'un agent silanisant chargé positivement permet de contrebalancer les charges négatives des silanols résiduels de la paroi du capillaire après silanisation, évitant ainsi une inhomogénéité de charges opposées dans le capillaire. Par ailleurs, cet agent possède une fonction vinyle avec laquelle les monomères du mélange réactionnel pourront se lier.

Ensuite, la composition du mélange a été adaptée en remplaçant le monomère négativement chargé par un pourcentage identique en monomère chargé positivement (le chlorure de [2-(acryloyloxy)ethyl]triméthylammonium] noté AETA). Les analyses d'alkylbenzènes neutres, ont permis de mettre en évidence l'inversion du flux électroosmotique, car il a fallu inverser la polarité de la tension imposée pour obtenir leur séparation. Des efficacités comprises entre 300 000 et 340 000 plateaux/m ont été obtenues. Le facteur de rétention est compris entre 0,8 et 2,4 pour le benzène et le pentylbenzène respectivement. Ces phases positivement chargées présentent donc des caractéristiques séparatives aussi performantes pour les petites molécules non chargées que les phases négativement chargées.

La séparation d'un mélange comprenant plusieurs dérivés d'anilines chargées positivement au pH de l'analyse (pH = 2,1) a été réalisée en huit minutes, avec des efficacités élevées entre 250 et 300 000 plateaux/m, comme illustré sur la Figure 62. Aucune adsorption des composés n'est observable sur l'électrochromatogramme et une bonne résolution des composés illustrent bien les performances séparatives de ces phases stationnaires.

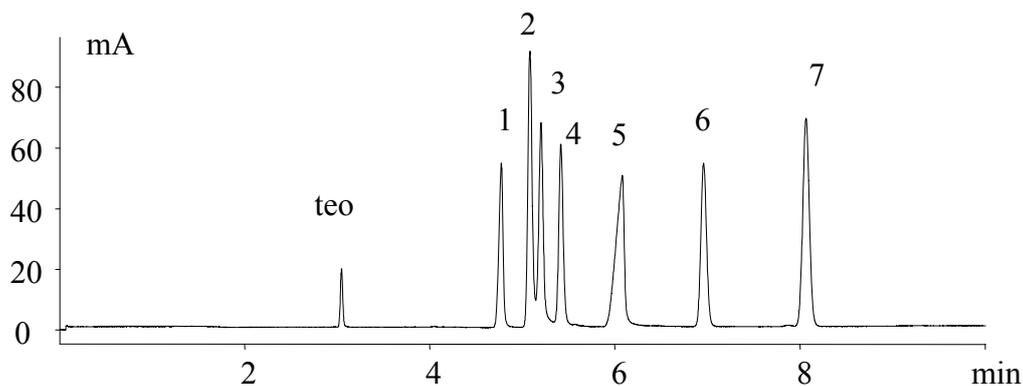


Figure 62 : Mélange de 7 anilines chargées sur une colonne monolithique à base d'AETA-BA-BDDA. L= 35,5 cm ; l=27. Tension -20kV. Phase mobile : acétonitrile-tampon phosphate 50mM à pH=2,1 (80 : 20 v/v). Injection -3kV, 3sec. Détection à 200 nm. Teo : formamide, marqueur de FEO, 1 : aniline, 2 : 2,6-diméthylaniline, 3 : 2-éthylaniline, 4 : 4-ispropylaniline, 5 : p-Chloroaniline, 6 : 2,3-dichloroaniline, 7 : diphénylaniline.

Plusieurs mélanges de protéines et de peptides ont été également testés rapidement. Bien que les séparations ne soient pas suffisamment résolues, le mélange de neuf protéines (Figure 63) et les produits de digestion protéolytique (Figure 64) sont séparés en moins de 4 minutes avec des efficacités comprises entre 180 et 380 000 plateaux/m pour le mélange de protéines BDH, protéines issues de la myoglobine.

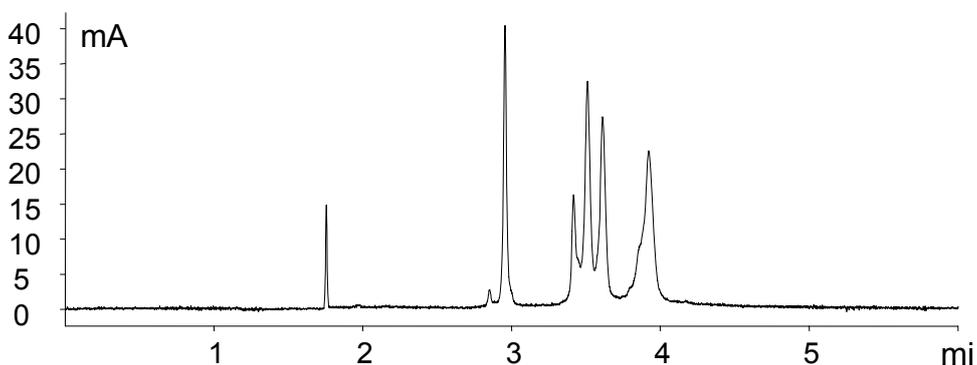


Figure 63 : Mélange de neuf protéines BDH, mélange de marqueur de point isoélectrique dont le pI est compris entre 5,6 et 8,3 séparées sur colonne monolithique à base d'AETA-BA-BDDA : L= 36,2 cm ; l=27,7. Tension -25kV. Phase mobile : acétonitrile-tampon phosphate 25mM à pH=2,1 (80 : 20 v/v). Injection -5kV, 5sec. Détection à 200 nm.

L'électrophorégramme de la Figure 64 présente seize pics alors qu'il y a normalement 18 produits issus de la digestion protéolytique du cytochrome C, ce qui est prometteur pour l'optimisation de cette séparation.

Ces séparations nécessitent donc d'optimiser les conditions d'élution et la composition en solvant et en électrolyte de la phase mobile afin d'améliorer la résolution entre les peptides ou protéines. Cette fonctionnalité permet ainsi d'ouvrir de nouvelles perspectives de développement et d'applications pour les phases monolithiques au sein du laboratoire.

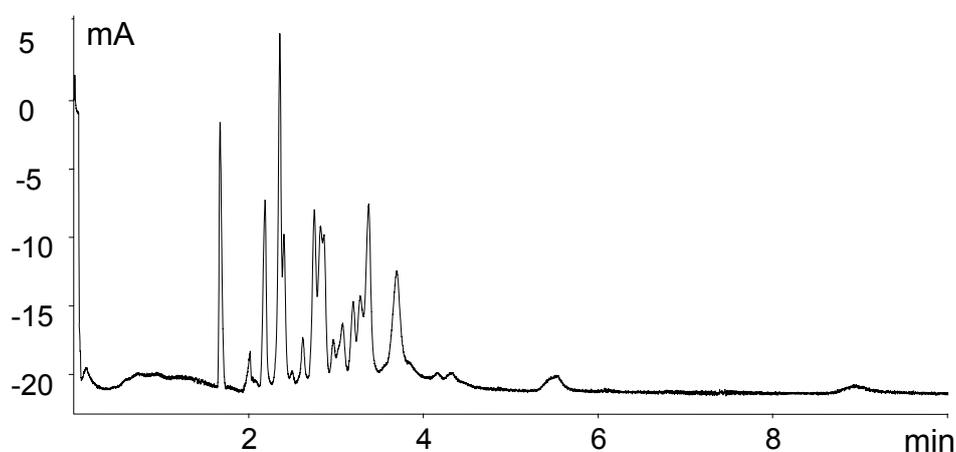


Figure 64 : produits de digestion protéolytique issu de cytochrome C séparés sur colonne monolithique à base d'AETA-BA-BDDA. L= 36,2 cm ; l=27,7. Tension -25kV. Phase mobile : acétonitrile-tampon phosphate 25mM à pH=2,1 (80 : 20 v/v). Injection -5kV, 5sec. Détection à 200 nm.

### 3. 2 Etude des phénomènes rétentifs

Le comportement séparatif des phases monolithiques synthétisées lors de ces travaux est principalement basé sur des mécanismes de rétention assimilables à ceux observés sur des phases stationnaires à polarité de phase inversée, bien que l'hydrophobie ne soit pas le seul mécanisme de séparation mis en jeu. En effet, pour des composés chargés, des interactions ioniques avec les charges présentes à la surface de la phase stationnaire peuvent se produire et ainsi conduire à des modes de séparation mixte [20].

En électrochromatographie, la séparation des solutés chargés est basée sur leur mobilité électrophorétique et sur leur distribution entre la phase stationnaire et la phase mobile : la rétention. Du fait de l'électromigration, la prédiction des phénomènes de rétention est difficile car cela suppose de pouvoir dissocier les phénomènes d'électromigration des phénomènes chromatographiques. Ainsi, l'expression du facteur de rétention servant à quantifier la

rétenion en chromatographie en phase liquide, ne peut pas être utilisé en électrochromatographie dans le cas de composés chargés. Différents modèles ont été proposés pour définir un paramètre indicateur de la rétenion en électrochromatographie [21,22]. Cependant, pour les composés neutres, utilisés lors de ces travaux, il est possible d'utiliser l'expression classique et chromatographique du facteur de rétenion, leur mobilité électrophorétique étant nulle (chapitre 1, partie 6).

Les variations du facteur de rétenion en fonction de la teneur en acétonitrile de la phase mobile ont été précédemment étudiées en ECC sur des phases stationnaires particulières et monolithiques. Dans les deux cas il ressort que la majeure partie des situations étudiées est constituée d'études sur des composés tests analogues neutres ne permettant de mettre en évidence que des mécanismes de séparation de type hydrophobe quel que soit le degré d'hydrophobie des groupements fonctionnels de ces phases stationnaires [7,23]. Des phases stationnaires monolithiques présentant des mécanismes d'interactions de type hydrophiles ont aussi été étudiées [20], le mode de rétenion mis en jeu est alors hydrophile mais présente également des mécanismes d'échange d'ions selon la nature des composés tests et la composition de la phase mobile.

Les phases stationnaires que nous avons synthétisées pour cette étude, représentées Figure 65, présentent d'autres mécanismes que l'hydrophobie pouvant intervenir entre les solutés et ces phases : de type liaisons hydrogènes, hydrophobes, ioniques ou encore dipolaires. Les monomères utilisés sont l'hexylacrylate (HA), le butanedioldiacrylate (BDDA) et l'acide 2,2'-acrylamidopropane sulfonique (AMPS).

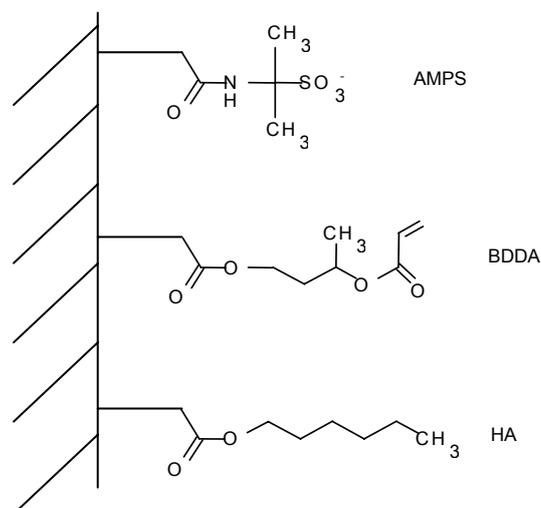


Figure 65 : Schéma représentant les groupements fonctionnels disponibles se situant à la surface de la phase stationnaire monolithique synthétisée pour cette étude.

Les groupements issus des monomères BDDA et AMPS sont en moindre proportion à la surface du monolithe de par leur plus faible pourcentage dans la composition du mélange réactionnel.

### 3. 2. 1 Influence du pourcentage de solvant de la phase mobile sur les phénomènes rétentifs

#### 3. 2. 1. 1 – Allure des courbes

Au cours de cette étude, l'influence du pourcentage d'acétonitrile contenu dans la phase mobile (de 80/20 à 20/80 ACN – tampon phosphate pH 6,8, force ionique constante de  $1,75 \cdot 10^{-3}$  M) sur les valeurs du facteur de rétention de différents composés neutres a été étudiée. Deux mélanges de composés analogues, décrits dans le Tableau 7, ont fait l'objet de cette étude. L'un comporte des composés benzéniques et l'autre comporte des composés phénoliques :

Composition du mélange test de dérivés benzéniques et log P associés		Composition du mélange test de dérivés phénoliques et log P associés	
benzène	2.06	phénol	1.54
toluène	2.59	3-4 diméthylphénol	2.49
éthylbenzène	3.12	2-5 diméthylphénol	2.49
benzonitrile	1.68	triméthyl 2,4,6 phénol	3.11
alcool benzylique	0.93	p-krésol	2.05
		4n-propylphénol	3.02

Tableau 7 : Composition et log P des composés des deux mélanges tests utilisés lors de cette étude. Concentration du benzène, toluène et de l'éthylbenzène :  $7,08 \cdot 10^{-4}$  M. Concentration du benzonitrile, alcool benzylique :  $4,40 \cdot 10^{-4}$  M. Concentration des dérivés phénoliques :  $2,86 \cdot 10^{-4}$  M.

Notre choix s'est porté sur ces deux mélanges de composés car ils contiennent des composés hydrophiles et hydrophobes. Ces composés présentent des groupements alkyle plus ou moins ramifiés et d'hydrophobies variées. L'objectif étant alors de déterminer le ou les types d'interaction permettant la rétention sur la phase stationnaire utilisée qui comporte des chaînes hydrophobes (fonction hexyle) et des groupements polaires (fonction ester des acrylates, groupements chargés). Le marqueur de flux électroosmotique utilisé est le formamide. Par ailleurs, ces expériences ont été réalisées sur une colonne polymérisée dans sa totalité dont les caractéristiques ont été précédemment décrites dans ce chapitre, paragraphe 2. 2.

Les résultats présentés sur les Figure 66 A et B montrent qu'une augmentation de la proportion en acétonitrile de la phase mobile entraîne une diminution du temps de rétention de chacun des composés lorsque l'on travaille avec une colonne entièrement polymérisée.

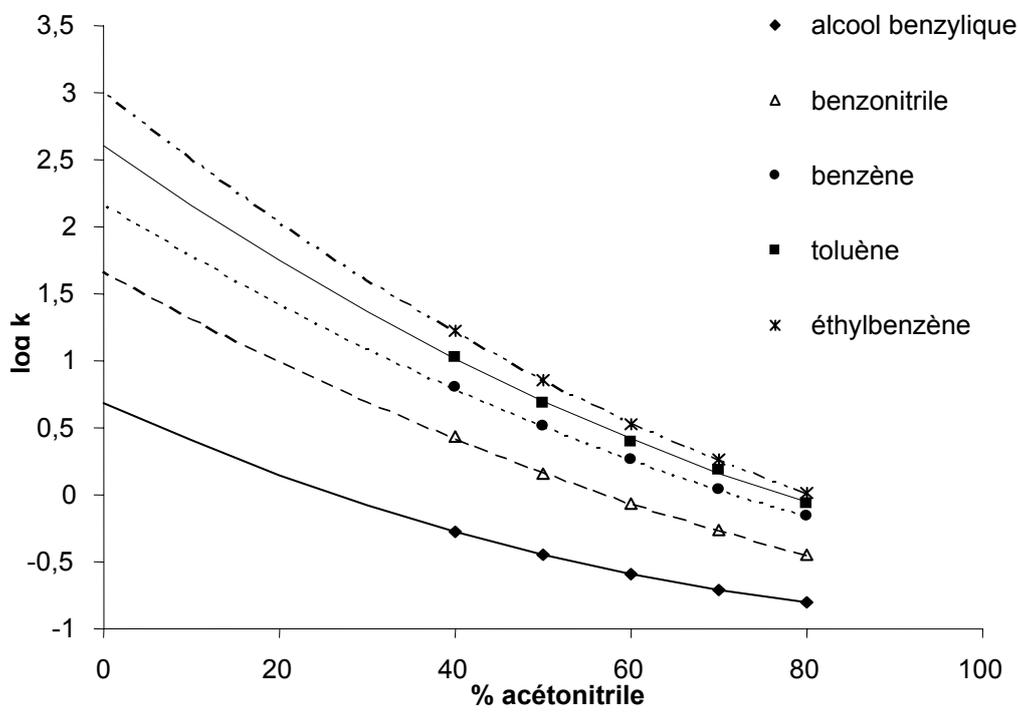
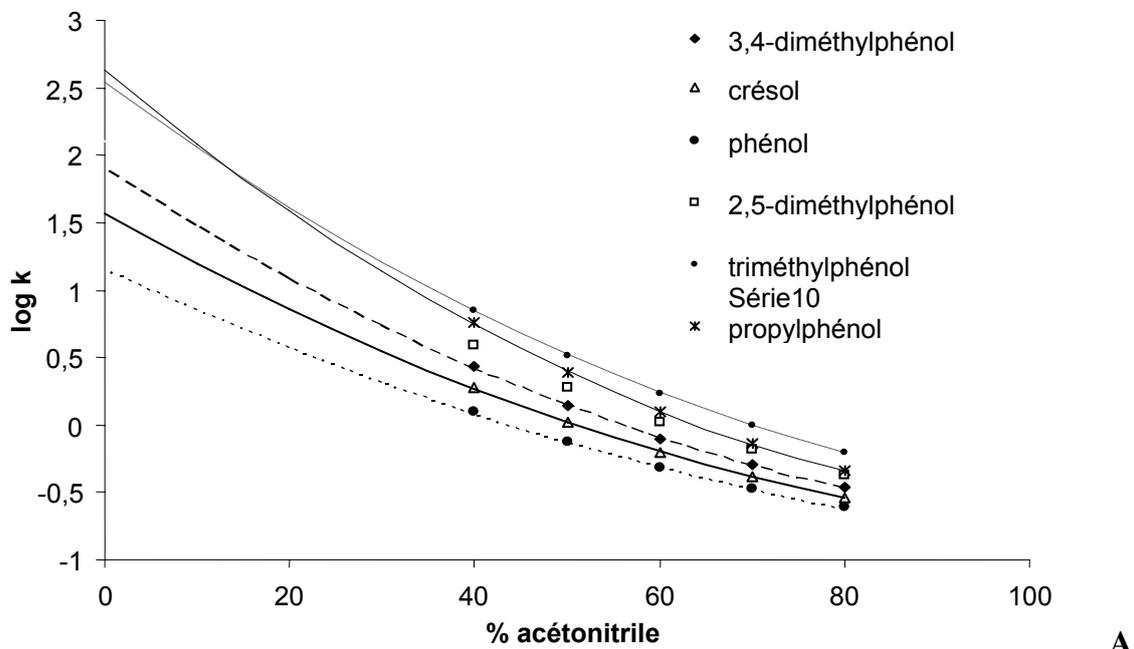


Figure 66 : Evolution du logarithme du facteur de rétention des composés benzéniques (A) et des composés phénoliques (B) en fonction de la proportion en acétonitrile de la phase mobile. Colonne entièrement polymérisée : 75 $\mu$ m x 35,5 cm, détection à 27 cm, phase mobile : acétonitrile - tampon phosphate 5 mM, pH 6,8 (v/v variable), force ionique = 1,75.10<sup>-3</sup> M, tension : + 25 kV. Température : 25 °C. Détection par absorbance UV à 200 nm. Injection électrocinétique : 4 kV / 4s

Plusieurs remarques ressortent de l'observation des caractéristiques séparatives de ces mélanges. Tout d'abord, la rétention des composés suit l'ordre croissant des log P comme en chromatographie liquide de partage à polarité de phase inversée, et ce quel que soit le pourcentage en acétonitrile contenu dans la phase mobile. De plus, sur les diagrammes de la Figure 66 un écart à la linéarité est observé pour les courbes des différents composés ce qui rejoint les observations faites en CPL à polarité de phase inversée en milieu eau-acétonitrile. En effet, en CPL, il a été largement démontré dans les années 70 – 80 que les variations du logarithme des facteurs de rétention varient en général linéairement avec la fraction volumique,  $x$ , de la phase mobile ( $\log k = a.x + b$ ). Par contre, dans les mélanges eau – acétonitrile, cette relation n'est plus tout à fait linéaire mais plutôt de la forme  $\log k = a.x^2 + b.x + c$  [24]. C'est exactement ce que nous observons Figure 66, ainsi la variation de la rétention dans les mélanges eau-acétonitrile est semblable à celle observée en CPL à polarité de phase inversée.

Grâce à la relation quadratique entre le pourcentage en acétonitrile et les logarithmes des facteurs de rétention, il est possible d'estimer les facteurs de rétention dans l'eau pure,  $k_w$ , extrapolés sur la Figure 66 et dont les valeurs sont données dans le Tableau 8. Les valeurs de  $k_w$  obtenues sont très importantes dans l'eau pure, supérieure à 1000 pour l'éthylbenzène.

		Ordonnée à l'origine estimée ou $k_w$
dérivés benzéniques	Ethylbenzène	1045
	Toluène	403
	Benzène	146
	Benzonitrile	47
	Alcool benzylique	4,8
dérivés alkylphénoliques	Triméthyl 2,4,6 phenol	351
	4n-propylphénol	428
	2-5 diméthylphénol	131
	3-4 diméthylphénol	81
	p-krésol	36,72
	Phenol	14,6

Tableau 8: Facteurs de rétention dans l'eau pure pour les composés étudiés dans les deux mélanges

La Figure 67 représente l'évolution du  $\log k_w$  des composés phénoliques en fonction de leur  $\log P$ . Une droite de pente égale à 1 est obtenue, ce qui est généralement observé en CPL à polarité de phase inversée pour une phase apolaire greffée par des groupements octadécyle.

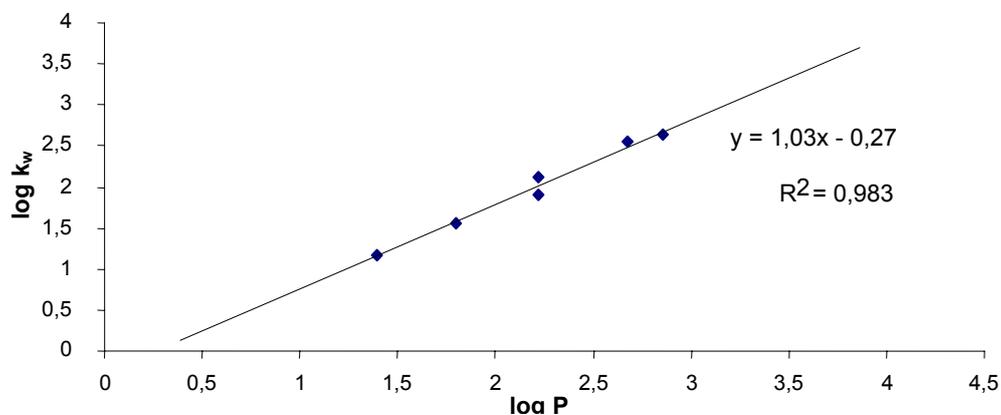


Figure 67 : Evolution du logarithme du facteur de rétention des composés phénoliques en fonction de leur  $\log P$ . Colonne entièrement polymérisée :  $75\mu\text{m} \times 35,5 \text{ cm}$ , détection située à 27 cm. Electrolyte : tampon phosphate pH 6,8 en milieu eau - acétonitrile (30:70, v/v), force ionique =  $1,75 \cdot 10^{-3}$  M. Tension : +25 kV. Température : 25 °C. Détection par absorbance UV à 200 nm. Injection électrocinétique : 4 kV/ 4s.

Par conséquent, la tendance globale reste identique à celle observée en CPL à polarité de phase inversée pour ce mélange de composés.

### 3. 2. 2. 2 – Etude de la corrélation rétention – hydrophobie des composés

Afin d'évaluer l'aptitude de nos phases monolithiques à engendrer des mécanismes de rétention autre que par interactions hydrophobes, un ensemble de solutés présentant des hydrophobies variées et parfois proches mais surtout des groupements fonctionnels de nature et de polarité différentes a été étudié. Le Tableau 9 présente les divers composés en fonction du  $\log P$  croissant ainsi que les valeurs obtenues des facteurs de rétention sur une colonne à base d'HA-AMPS avec une phase mobile composée d'acétonitrile - tampon phosphate, 5mM, pH 7,2 ; (70 :30, v/v).

Nom du composé	Valeur du log P	Facteur de rétention, k
Alcool benzylique	0,92	0,18
Aniline	1,03	0,39
Phénol	1,54	0,31
Acétophénone	1,75	0,42
Benzonitrile	1,68	0,51
Nitrobenzène	1,81	0,77
1-phényl-2-propanol	1,86	0,22
1-phényl-1-propanol	1,86	0,34
3-phényl-1-propanol	1,86	0,22
Benzoate de méthyle	2,16	0,67

Tableau 9 : Nom, constante de partage eau-octanol croissante et facteur de rétention de chaque composé du mélange de polarités variées

La séparation de ce mélange de composés présente un ordre d'éluion ne correspondant pas à l'ordre croissant des log P. En effet, plusieurs composés inversent leur ordre d'éluion par rapport à un mécanisme d'interactions purement hydrophobes, comme le nitrobenzène qui est le composé le plus retenu bien que son log P soit de 1,68. L'étude du facteur de rétention en fonction du log P des composés a été menée sur une gamme plus large de composés tests, Figure 68. L'étude a ainsi été réalisée avec une phase mobile constituée de 40% d'acétonitrile et de 60% d'électrolyte. Le Tableau 10 présente l'ensemble des composés étudiés ainsi que leur hydrophobie, estimée par leur log de P.

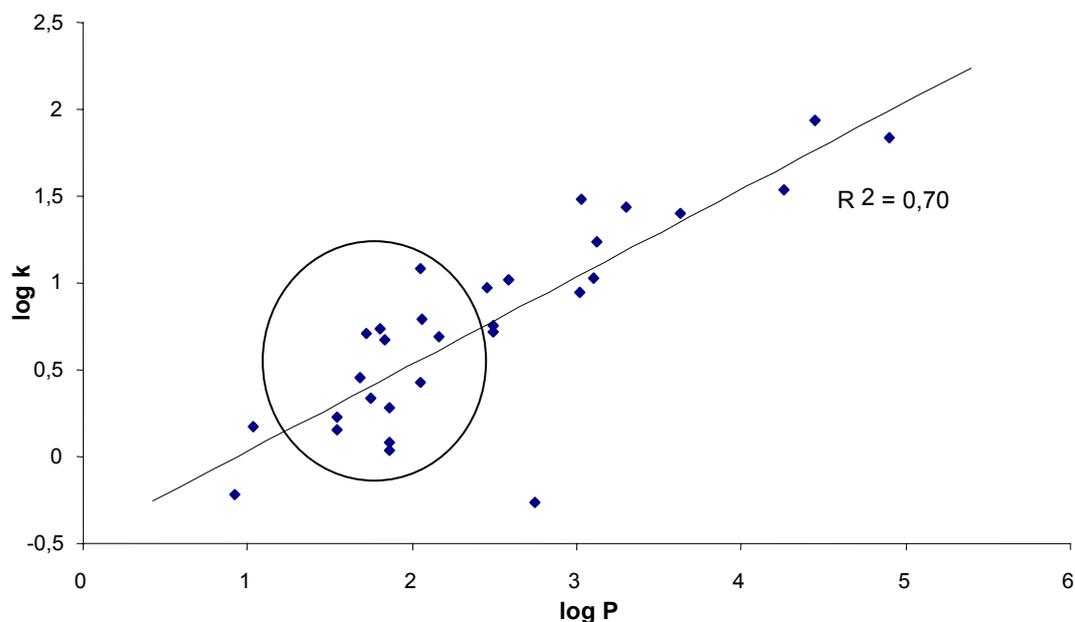


Figure 68 : Evolution du logarithme du facteur de rétention des composés du Tableau 10 en fonction de leur log P. Colonne partiellement polymérisée : 75 $\mu$ m x 35,5 cm, détection située à 27 cm. Electrolyte : tampon phosphate pH 7,1 en milieu eau - acétonitrile (60:40, v/v). Tension : +30 kV. Température : 25 °C. Détection par absorbance UV à 200 nm. Injection électrocinétique : 3 kV/ 3s.

Composés tests	Log P	Composés tests	Log P
benzène	2,06	benzoate de méthyle	2,16
toluène	2,59	crésol	2,05
éthylbenzène	3,12	3-4diméthylphénol	2,49
propylbenzène	3,63	2-5 diméthylphénol	2,49
butylbenzène	4,26	4n-propylphénol	3,02
pentylbenzène	4,9	triméthyl 2,4,6 phénol	3,11
alcool benzylique	0,93	2,4-dinitroaniline	1,72
phénol	1,54	4-chloroaniline	1,83
benzonitrile	1,68	3-nitrotoluène	2,45
acétophénone	1,75	4-chloro-2- nitroaniline	2,05
nitrobenzène	1,81	2,5- dichloronitrobenzène	3,03
1-phényl-1-propanol	1,86	2,5-dichloroaniline	2,75
1-phényl-2-propanol	1,86	aniline	1,03
3-phényl-1-propanol	1,86		

Tableau 10 : Liste des composés étudiés et de leur log P afin de réaliser le diagramme de variation des facteurs de rétention en fonction du log P

Il nous faut rappeler ici que l'utilisation de la constante de partage eau – octanol pour prédire la rétention n'est qu'un guide. Cependant, une tendance se dégage de la Figure 68, le facteur de rétention augmente avec le log P des composés bien que le coefficient de corrélation présente une valeur faible. Dans la zone entourée, une dispersion des composés ayant des log P proches mais avec des groupements fonctionnels différents indique l'existence certaine d'interactions secondaires avec la phase stationnaire. Diverses interactions sont possibles :

- des effets donneurs – accepteurs d'électrons, variables selon les substituants du benzène qui influent sur les interactions de type  $\pi$ -  $\pi$  entre les électrons  $\pi$  du noyau benzénique et les doubles liaisons du monolithe.
- des interactions de types dipôle ( des solutés) – dipôle des monolithes (groupement acrylate)
- des interactions dipôles (des solutés) – ions dus aux charges permanentes du monolithe

Nos résultats ne nous permettent pas d'approfondir le mécanisme de rétention. Il faudrait certainement faire les mêmes mesures avec le méthanol comme solvant organique et comparer les résultats avec ceux de la CPL. En effet, en CPL sur silice greffée par des groupements octadécyles, les bonnes relations obtenues entre le facteur de rétention et la constante de partage eau – octanol sont issues de mesures réalisées avec le méthanol et peu de relations ont été reportées dans la littérature avec l'acétonitrile, hors études de solutés homologues.

### *3. 2. 3 Influence de la force ionique sur les phénomènes de rétention*

Dans un second temps, l'influence de la force ionique de la phase mobile (de  $3,5 \cdot 10^{-3}$  à  $35 \cdot 10^{-3}$  M, acétonitrile – tampon phosphate pH 6,8, (60:40, v/v) sur les valeurs du facteur de rétention des composés phénoliques a été étudiées (3. 3. 2.). Le marqueur de flux utilisé est le formamide.

Les résultats indiquent qu'une variation de la force ionique de la phase mobile n'entraîne pas de variation du facteur de rétention des composés. Une augmentation de la force ionique de la phase mobile n'influe pas sur le mécanisme de rétention des composés neutres étudiés ni sur les groupements hydrophobes de la phase stationnaire. Par ailleurs, aucun phénomène d'écrantage des charges, modifiant la solvation de la phase stationnaire n'intervient.

## 4. Comparaison avec la chromatographie électrocinétique micellaire capillaire (CEMC)

### 4. 1 Description de la CEMC

La chromatographie électrocinétique micellaire capillaire, décrite pour la première fois il y a plus de 20 ans [25], a permis d'étendre la séparation par électrophorèse capillaire aux molécules neutres. Le principe consiste à séparer les analytes par leur différence de distribution entre une pseudo-phase micellaire et la phase aqueuse environnante [25]. Pour cela, un tensioactif est dissous dans l'électrolyte de séparation à une concentration supérieure à sa concentration micellaire critique permettant la formation de la pseudo-phase stationnaire, dont le cœur est hydrophobe

En présence d'un flux électroosmotique cathodique, les micelles chargées négativement migrent en mode contre-électroosmotique et ne sont détectées uniquement dans le cas où le

flux électroosmotique est supérieur (en valeur absolue) à la mobilité électrophorétique des micelles, illustré sur la Figure 69.

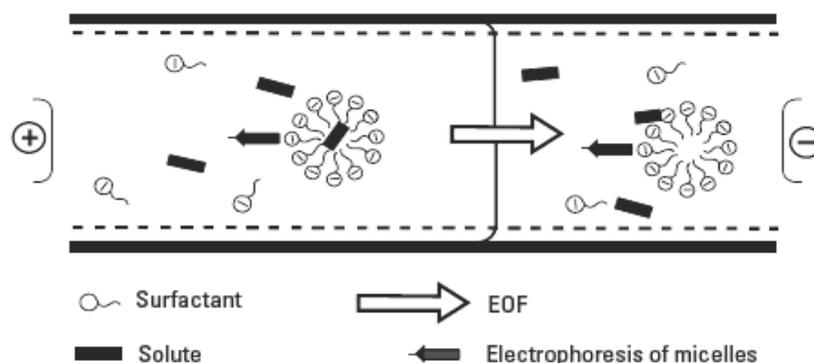


Figure 69 : Principe de séparation de la CEMC, d'après [26]

Un soluté neutre, ne présentant aucune interaction avec les micelles, est uniquement entraîné par le FEO et permet de repérer le temps de rétention nulle, le  $t_0$  ou  $t_{eo}$  de l'analyse. A l'inverse, un soluté entièrement associé aux micelles se déplace à la même vitesse que celles-ci et permet de déterminer le temps de migration des micelles,  $t_{mc}$ . Les autres solutés neutres, plus ou moins associés aux micelles par interactions hydrophobes, sont eux détectés dans l'intervalle de temps compris entre  $t_0$  et  $t_{mc}$ , représentant la fenêtre de séparation. Plus cette fenêtre est importante, plus la capacité de pics, c'est-à-dire le nombre de pics pouvant être séparés lors d'une analyse, est élevée. Des paramètres similaires à ceux utilisés en chromatographie peuvent être décrits [25], comme le facteur de rétention, défini comme le rapport de la quantité de soluté composé dans la phase micellaire sur la quantité de soluté dans la phase aqueuse :

$$k = K \frac{V_{mc}}{V_{aq}} \quad (14)$$

avec  $K$  coefficient de distribution du soluté entre les deux phases,  $V_{mc}$  et  $V_{aq}$  les volumes des phases micellaire et aqueuse, respectivement.

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0 (1 - t_r / t_{mc})} \quad (15)$$

avec  $t_r$  temps de rétention du soluté  $i$ . La différence entre cette équation et celle utilisée en CPL est due à l'existence de la fenêtre de séparation limitée.

Un autre paramètre important des séparations est la résolution. En chromatographie électrocinétique micellaire, elle est définie ainsi [25] :

$$R_s = \frac{\sqrt{N_2}}{4} \cdot \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left( \frac{k_2}{1 + k_2} \right) \cdot \left( \frac{1 - t_0 / t_{mc}}{1 + (t_0 / t_{mc})k_1} \right) \quad (16)$$

avec  $\alpha$  la sélectivité définie par le rapport ( $k_2/k_1$ ).

La présence du troisième terme entre parenthèse de l'équation 16 est à la base d'une stratégie d'optimisation de la résolution assez différente de celle que l'on rencontre habituellement en présence d'une phase stationnaire. Dans l'hypothèse où la sélectivité est faible, soit  $k_1 \approx k_2$ , alors on considère la fonction suivante  $f(k)$  :

$$f(k) = \left( \frac{k}{1 + k} \right) \cdot \left( \frac{1 - t_0 / t_{mc}}{1 + (t_0 / t_{mc})k} \right) \quad (16)$$

Les courbes  $f(k)$  en fonction de  $k'$  paramétrées avec le rapport  $t_{e0}/t_{mc}$  présentent un maximum pour  $k = k_{opt} = \sqrt{t_{mc}/t_{e0}}$  dont la valeur ne dépend que de  $t_{e0}$  et  $t_{mc}$ , représentées sur la Figure 70.

Le rapport  $t_{e0} / t_{mc}$  est représentatif de la taille de la fenêtre d'éluion en CEMC. Ce rapport variant typiquement entre 0,1 et 0,5. Lorsque  $t_{mc}$  tend vers l'infini, la valeur de ce rapport tend vers zéro, on retrouve alors la relation classique de la résolution en chromatographie.

Le système séparatif sera d'autant plus résolutif que les facteurs de rétention des composés se situeront de part et d'autre et à des valeurs proches du  $k_{opt}$ , dont la valeur peut être modulée en faisant varier la concentration en micelle.

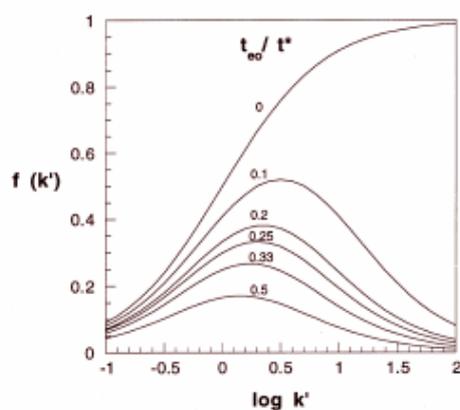


Figure 70 : Exemple d'influence des facteurs de rétention sur la résolution pour différentes valeurs de  $t_0/t_{mc}$ , avec  $f(k) = (k / 1+k) \cdot (1-t_0/t_{mc}) / (1+(t_0/t_{mc}) \cdot k)$ , en supposant  $k_1 \approx k_2$  [25,27].

Le facteur de capacité optimal,  $k_{opt}$ , est d'ailleurs défini ainsi :

$$k_{opt} = \left( \frac{t_{mc}}{t_0} \right)^{1/2} \quad (17)$$

En CEMC, il existe un grand nombre de tensioactifs pouvant être utilisés pour la formation de micelles. Plusieurs tensioactifs présentant des fonctionnalités différentes (ioniques, non-ioniques, zwitterioniques...) peuvent être combinés pour former des micelles mixtes [28,29]. Les efficacités de ces séparations sont très élevées et les temps d'analyse sont généralement courts. La sélectivité des pseudo phases stationnaires est principalement contrôlée par la ou les fonctionnalité(s) présente(s) à la surface des tensioactifs utilisés lors de la formation de micelles. Les variations de longueurs des chaînes hydrophobes des micelles interviennent peu dans les phénomènes de distribution des solutés.

L'ECC et la CEMC sont des méthodes présentant des similitudes de par la présence d'une (pseudo) phase stationnaire et les phénomènes d'électromigration mis en jeu, et nous avons voulu les comparer afin de déterminer quels sont leurs intérêts et leurs limitations.

## **4.2 Comparaison des séparations de mélanges tests en CEMC et en ECC**

### *4.2.1 Présentation des composés des mélanges tests.*

Le Tableau 11 indique la composition du mélange étudié et la valeur des log P associée à chaque composé.

L'intérêt du premier mélange est de réunir des composés dont l'hydrophobie varie sur une large gamme, les log P sont compris entre 1 et 5. Le deuxième mélange test présente l'intérêt de réunir des composés dont les fonctionnalités sont variées mais d'hydrophobies proches, les valeurs des log P variant de 1 à 2. Nous avons ainsi deux types de mélanges complémentaires.

1 <sup>er</sup> mélange		2 <sup>ème</sup> mélange	
Nom du composé	Valeur de log P	Nom du composé	Valeur de log P
alcool benzylique	0,92	alcool benzylique	0,92
aniline	1,03	aniline	1,03
benzaldéhyde	1,38	phénol	1,54
phénol	1,54	benzonnitrile	1,68
acide benzoïque	1,63	acétophénone	1,75
benzène	2,04	nitrobenzène	1,81
toluène	2,66	1-phényl-2-propanol	1,86
éthylbenzène	3,13	1-phényl-1-propanol	1,86
naphtalène	3,40	3-phényl-1-propanol	1,86
propylbenzène	3,63	benzoate de méthyle	2,16
butylbenzène	4,13		
pentylbenzène	4,66		
anthracène	4,65		
pyrène	5,21		

Tableau 11 : composition des mélanges étudiés en ECC et CEMC

Le marqueur de FEO est le formamide tant en ECC qu'en chromatographie électrocinétique micellaire. Le marqueur micellaire est du soudan III pour les mélanges étudiés. Le surfactant utilisé est le sodium dodécyle sulfate, SDS, dont la concentration micellaire critique est de 8,1mM à 25°C.

#### 4. 2. 2 Discussions sur les séparations obtenues

##### 4. 2. 2. 1 - Premier mélange test :

Après optimisation de la séparation en ECC, la séparation obtenue, Figure 71, présente des caractéristiques séparatives intéressantes. En effet, la séparation est très bien résolue et le temps d'analyse est faible : inférieur à 12 minutes pour l'analyse du mélange contenant l'anthracène et le pyrène. Les efficacités des pics vont de 240 000 à 385 000 plateaux/m, avec une moyenne d'environ 300 000 plateaux/m. L'ordre d'élution suit l'hydrophobie croissante des composés soit l'ordre des log P. Les facteurs de rétention, k, sont compris entre 0,21 pour l'alcool benzylique et 3,9 pour le pyrène.

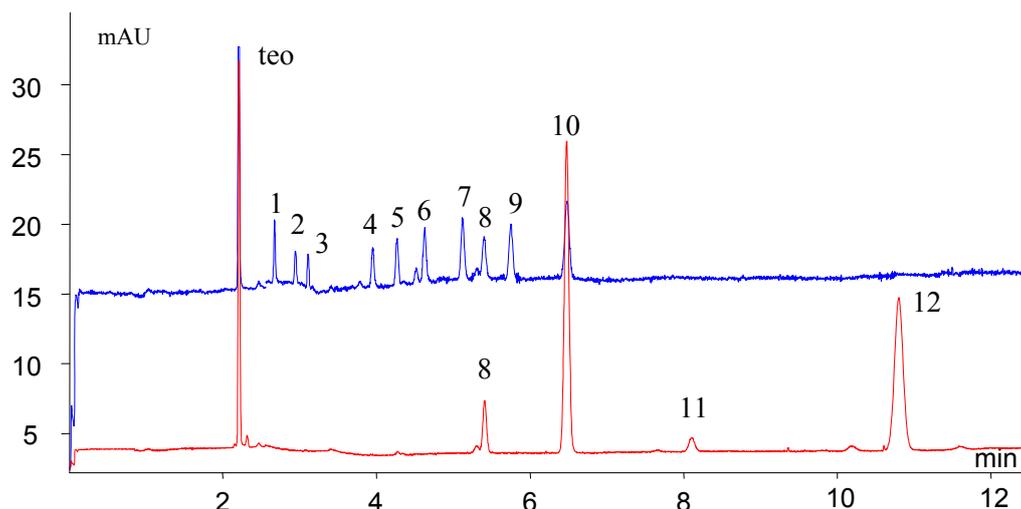


Figure 71 : Séparations du premier mélange de composés tests par ECC. Colonne monolithique à base de BA-AMPS,  $l = 22,5\text{cm}$ ,  $L = 31\text{cm}$ . Phase mobile : acétonitrile - tampon phosphate, 5mM, pH 7,1 ; 80 :20, v/v. Tension : +25 kV. Température : 25 °C. Détection par absorbance UV à 200 nm. Injection électrocinétique : 3 kV/ 3s. teo : formamide, 1 : alcool benzylique, 2 : aniline, 3 : benzaldéhyde, 4 : Benzène, 5 : toluène, 6 : éthylbenzène, 7 : Butylbenzène, 8 : Naphtalène, 9 : penylbenzène, 10 : fluorène, 11 : anthracène, 12 : pyrène.

La séparation optimisée de ces mêmes composés réalisée en CECM est représentée sur la Figure 72. Il faut tout d'abord remarquer que la séparation n'est pas bien bien résolue pour les composés les plus hydrophobes. En effet dans le massif 11 se trouvent quatre solutés en plus du marqueur micellaire. De plus, le temps d'analyse est un peu long mais reste raisonnable. Les efficacités mesurées sont comprises entre 495 000 et 1 200 000 plateaux/m, la majorité des composés présente des efficacités entre 600 000 et 800 000 plateaux/m.

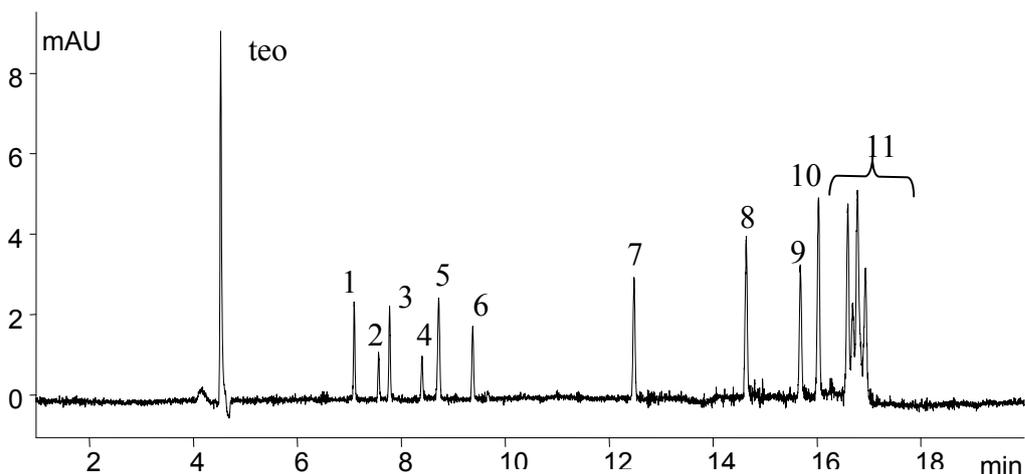


Figure 72 : Séparation optimisée du premier mélange de composés tests par CECM. Capillaire de silice vierge  $l = 41.5\text{ cm}$ ,  $L = 50\text{ cm}$ . Tension de + 20 kV. Electrolyte : tampon borate 25mM pH=8.5, contenant 110 mM SDS. Injection : 30 mbars, 3 s. teo : formamide, (1) aniline, (2) phénol, (3) alcool benzylique, (4) benzaldéhyde, (5) acide benzoïque, (6) benzène, (7) toluène, (8) éthylbenzène, (9) naphtalène, (10) propylbenzène, (11) butylbenzène, pentylbenzène, anthracène, pyrène, soudan III : tmc

Après avoir vérifié quel était le temps de sortie des micelles seules, les facteurs de rétention des composés ont été déterminés et les valeurs sont comprises entre 1 pour l'aniline et 48 pour le propylbenzène, pic 10, dernier composé résolu du mélange. Les composés contenus dans le massif ont des facteurs de rétention entre 133 et 297. Or, dans ces conditions optimisées, le  $k_{opt}$  a une valeur de 1,93. Les valeurs des facteurs de rétention sont donc trop éloignées de la valeur du  $k_{opt}$  pour obtenir une séparation bien résolue pour l'ensemble des composés, ce qui est observable pour les composés les plus retenus.

Sachant qu'il est possible de modifier les valeurs des facteurs de rétention et du  $k_{opt}$  en faisant varier la concentration en surfactant, des expériences ont été menées à différentes concentrations en SDS : 22,5 - 55 - 77,5 - 132,5 mM. Cependant aucune des séparations obtenues n'a présenté d'améliorations au niveau de la résolution du massif 11 mais plutôt des détériorations de la séparation obtenue en terme de résolution et d'efficacité. L'addition d'un modificateur polaire, le méthanol, à diverses concentrations (5, 10, 15 %) a également été envisagé. L'ajout d'un modificateur polaire permet généralement une augmentation de la fenêtre de séparation par l'augmentation du  $t_{e0}$  et une diminution des facteurs de rétention des composés par la modification de leur coefficient de distribution,  $K$ . Cet ajout doit donc favoriser une meilleure résolution des composés les plus hydrophobes d'un mélange. Néanmoins, les séparations obtenues avec les pourcentages en modificateur polaire testés n'ont pas permis d'améliorer la résolution quel que soit le pourcentage ajouté. La séparation obtenue en CEMC présente le même ordre d'élution que celui obtenu en ECC. Un seul type de micelle a été envisagé lors de cette étude, cependant une modification de la nature des micelles permettrait peut-être d'améliorer la résolution entre les pics du massif.

L'optimisation de la résolution d'un tel mélange en chromatographie électrocinétique micellaire est très complexe de par la large gamme d'hydrophobie couverte par les solutés. Cette méthode d'analyse sépare plus difficilement des composés très hydrophobes qui restent totalement inclus dans les micelles [26].

#### 4. 2. 2. 2 - Deuxième mélange test :

La Figure 73 représente la séparation optimisée du deuxième mélange test, séparation optimisée par le groupe du Pr Gareil.

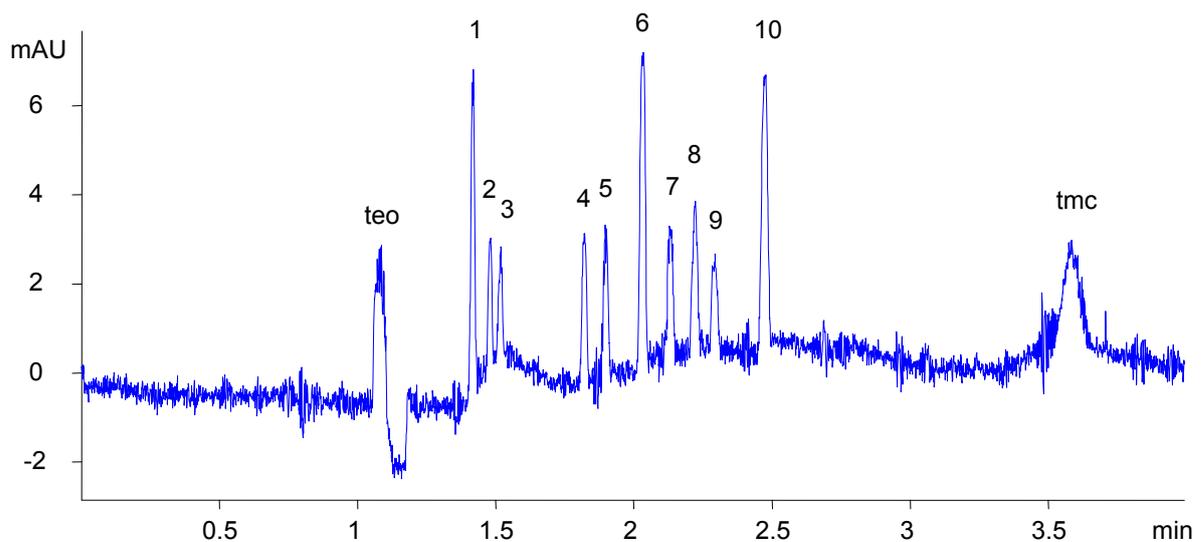


Figure 73 : Séparation optimisée du deuxième mélange de composés tests par CEMC. Capillaire de silice vierge  $l = 26.5$  cm,  $L = 35$  cm. Tension de + 20 kV. Electrolyte : tampon borate 24 mM pH=8.5, contenant 62 mM SDS. Injection : 30 mbars, 3 s. Température : 30°C. teo : formamide, (1) aniline, (2) alcool benzylique, (3) phénol, (4) benzonitrile, (5) acétophénone, (6) nitrobenzène, (7) 1-phényl-2-propanol, (8) 1-phényl-1-propanol, (9) 3-phényl-1-propanol, (10) benzoate de méthyle, soudan III : tmc

La séparation est bien résolue pour l'ensemble des solutés et le temps d'analyse est très court : moins de 4 minutes. Les efficacités sont comprises entre 165 000 et 210 000 plateaux/m.

L'ordre de rétention suit l'hydrophobie des solutés et donc les valeurs de  $\log$  de  $P$  excepté pour l'aniline et l'alcool benzylique dont l'ordre d'élution est inversé.

Le système séparatif est bien choisi car les solutés présentent des valeurs du facteur de rétention, comprises entre 0,51 et 4,14, bien réparties autour du  $k_{opt}$ , égal à 1,82. Les conditions d'analyses sont alors bien optimisées pour la séparation de ce mélange. D'autres concentrations en tensioactifs avaient d'abord été testées et il apparaissait que les facteurs de rétention des composés différaient de façon importante du facteur de rétention optimal. C'est pourquoi la concentration en tensioactif a été augmentée jusqu'à obtenir des facteurs de rétention des solutés et un  $k_{opt}$  qui soient suffisamment proches.

La séparation des composés tests a ensuite été mise au point en ECC, sur une colonne monolithique à base d'hexylacrylate. Après optimisation des conditions d'analyse, le mélange est séparé en moins de 3 minutes mais présente une co-élution du 1-phényl-2-propanol et du 3-phényl-1-propanol, pic 2 de la Figure 74.

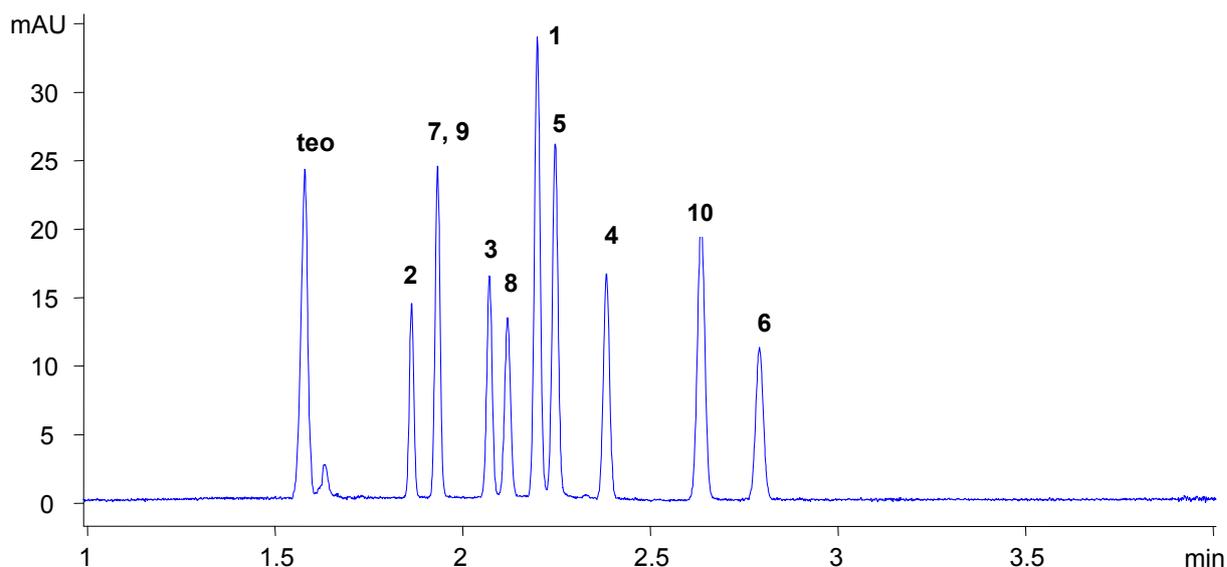


Figure 74 : Séparation optimisée du deuxième mélange de composés tests par ECC. Colonne monolithique composée de HA-AMPS,  $l = 27,5$  cm,  $L = 36$  cm,  $d_c = 75$   $\mu$ m. Phase mobile : acétonitrile - tampon phosphate, 5mM, pH 7,2 ; (70 :30, v/v). Tension : +25 kV. Température : 25 °C. Détection par absorbance UV à 200 nm. Injection électrocinétique : 3 kV/ 3s. teo : formamide, (1) aniline, (2) alcool benzylique, (3) phénol, (4) benzonitrile, (5) acétophénone, (6) nitrobenzène, (7) 1-phényl-2-propanol, (8) 1-phényl-1-propanol, (9) 3-phényl-1-propanol, (10) benzoate de méthyle.

Les efficacités sont élevées : comprises entre 305 000 pour le benzoate de méthyle et 420 000 plateaux/m pour l'alcool benzylique, les autres composés ayant des efficacités d'environ 320 000 plateaux/m. Les facteurs de rétentions sont peu élevés : compris entre 0,18 à 0,77. Le point le plus remarquable concernant cette séparation est la différence d'ordre d'élution par rapport à la CEMC, comme cela vient d'être présenté et qui montre que la rétention des composés n'est pas uniquement gouvernée par des mécanismes d'interactions hydrophobes.

### 4.3 Comparaison de ces deux techniques analytiques

Lors de l'analyse du premier mélange, la chromatographie électrocinétique micellaire s'est révélée moins performante que l'ECC. En effet, l'existence d'une fenêtre de séparation limite l'analyse des composés très hydrophobes. Cette remarque a d'ailleurs été faite dans plusieurs publications [26,30]. Cependant des solutions spécifiques à ces composés peuvent être envisagées mais nécessitent des surfactants et des modificateurs polaires appropriés qui ne permettent pas toujours l'analyse de composés moins hydrophobes [29]. D'autres solutions permettant l'analyse de composés ayant des hydrophobies très variées peuvent être envisagées mais requièrent une mise au point et des conditions d'analyses contraignantes [31]. Ainsi, en chromatographie électrocinétique micellaire, pour obtenir une bonne résolution, les analytes doivent appartenir à une gamme d'hydrophobie suffisamment restreinte et donc à une gamme

de facteur de rétention bien définie autour du  $k'_{opt}$ . C'est en cela que cette méthode peut être limitante. Par ailleurs, en ECC, comme en CPL, il n'y a pas de fenêtre de séparation et donc aucune limitation concernant le temps d'analyse.

Néanmoins, la chromatographie électrocinétique micellaire capillaire permet d'obtenir de très hautes efficacités, plus d'un million de plateaux/m pour certains composés, ce qui peut compenser les limitations dues à l'existence de la fenêtre de séparation. De plus, l'optimisation des conditions d'analyse présente un grand nombre de paramètres grâce auxquels il est possible d'obtenir une séparation satisfaisante. En effet, l'ajout et le choix d'un modificateur polaire peuvent aussi modifier les conditions séparatives ainsi que la composition de la phase aqueuse, le grand nombre de tensioactifs disponibles permet d'adapter la composition de la pseudo-phase micellaire. Le tensioactif utilisé pour réaliser cette comparaison a été choisi de façon à représenter la chromatographie électrocinétique micellaire, le SDS restant un des surfactant les plus employés. Cependant il existe d'autres types de surfactants, tels que des copolymères d'acrylates [32], qui permettraient d'effectuer une comparaison plus juste entre les performances d'une pseudo phase stationnaire et d'une phase stationnaire à base d'acrylate. Par ailleurs, la CEMC n'utilise qu'un seul capillaire car les changements de pseudo-phases stationnaires sont réalisés par de simples rinçages et conditionnements ce qui simplifie la mise en œuvre de cette méthode.

L'analyse en ECC présente une meilleure séparation du premier mélange que celle réalisée en CEMC. En effet, tous les pics sont bien résolus et la séparation bénéficie de hautes efficacités. De plus, le temps d'analyse est plus court qu'en chromatographie électrocinétique micellaire. Concernant le deuxième mélange en CEMC, les composés sont très bien répartis autour du facteur de rétention optimal. D'ailleurs la séparation est entièrement résolue et présente des efficacités élevées. Le temps d'analyse est très court, moins de 4 minutes. Ce même mélange, analysé en ECC, présente de hautes efficacités, un temps d'analyse plus court, moins de 3 minutes, mais il subsiste une co-élution de deux isomères. De plus l'ordre d'élution des composés ne suit pas l'hydrophobie croissante des composés, les modes de rétention n'étant pas encore parfaitement définis. Cependant une optimisation plus poussée des conditions d'analyse en ECC permettrait certainement d'éliminer cette co-élution et donc de rendre cette méthode au moins aussi performante que la chromatographie électrocinétique micellaire. Ces deux méthodes permettent d'obtenir des performances séparatives très intéressantes en terme d'efficacité, de résolution, de temps d'analyse et peuvent être considérées comme complémentaires au niveau des mécanismes de rétention.

## 5. Annexes

5-1 : Composition du mélange réactionnel utilisé pour la synthèse des colonnes lors des études réalisées dans le paragraphe 2.

### **Mélange à base d'hexylacrylate :**

Le mélange de monomères comprend : (% en volume)

- 30 % de 1, 3 – butanediol diacrylate (BDDA) en tant qu'agent réticulant
- 69,5 % de hexylacrylate (HA) comme monomère fonctionnel
- 0,5 % d'acide 2-acrylamido-2-méthyl-1-propanesulfonique (AMPS)

Le mélange de solvants est constitué de : (% en volume)

- 20 % d'éthanol
- 20 % de tampon phosphate 5mM, pH = 7,1
- 60 % d'acétonitrile

Le mélange à polymériser est finalement constitué d'un rapport (33 : 67) du mélange de monomères et du mélange de solvants

L'initiateur radicalaire le 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) est ajouté à raison de 0,5 % (en masse) par rapport au mélange de monomères.

### **Mélange à base d'AETA :**

Le mélange de monomères comprend : (% en volume)

- 30 % de 1, 3 – butanediol diacrylate (BDDA) en tant qu'agent réticulant
- 69,5 % de butylacrylate (BA) comme monomère fonctionnel
- 0,5 % de chlorure de [2-(acryloyloxy)ethyl]triméthylammonium] (AETA)

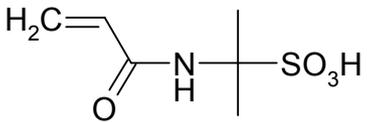
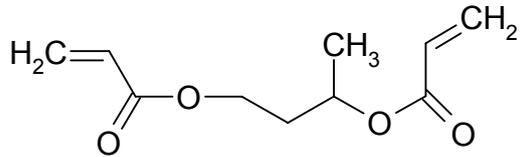
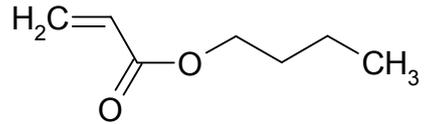
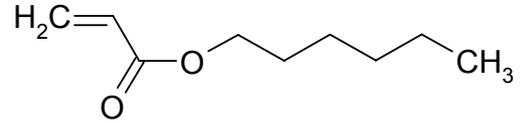
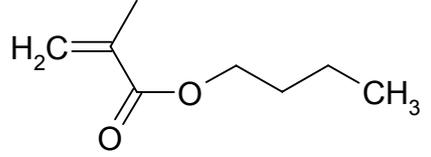
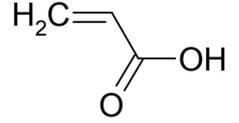
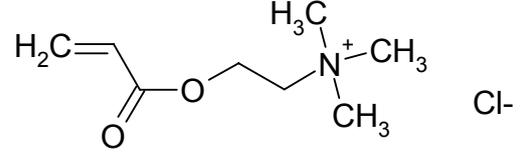
Le mélange de solvants est constitué de : (% en volume)

- 20 % d'éthanol
- 20 % de tampon phosphate 5mM, pH = 2,8
- 60 % d'acétonitrile

Le mélange à polymériser est finalement constitué d'un rapport (33 : 67) du mélange de monomères et du mélange de solvants

L'initiateur radicalaire le 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) est ajouté à raison de 0,5 % (en masse) par rapport au mélange de monomères.

5-2 : Tableau des divers monomères utilisés au cours de ces travaux.

Nom du monomère	Formule associée
Acide 2-acrylamido-2-méthylpropanesulfonique	
1,3-butanediol diacrylate	
Butylacrylate	
Hexylacrylate	
Butylméthacrylate	
Acide acrylique	
Chlorure de [2-(acryloyloxy)ethyl]triméthylammonium]	

## 6. Références bibliographiques

- [1] I. Gusev, X. Huang, C. Horvath, *Journal of Chromatography A* 855 (1999) 273-290.
- [2] A.S. Rathore, E. Wen, C. Horvath, *Analytical Chemistry* 71 (1999) 2633-2641.
- [3] A.S. Rathore, C. Horvath, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 3069-3077.
- [4] L. Chen, L. Chen, X. Yan, Q.-H. Wan, *Analytical Chemistry* 74 (2002) 5157-5159.
- [5] G. Choudhary, C. Horvath, *Journal of Chromatography A* 781 (1997) 161-183.
- [6] A.S. Rathore, Y. Li, J. Wilkins, *Journal of Chromatography A* 1079 (2005) 299-306.
- [7] N. Delaunay-Bertoncini, C. Demesmay, J.-L. Rocca, *Electrophoresis* 25 (2004) 3204-3215.
- [8] F. Progent, N.T. Tran, M. Taverna, *Electrophoresis* accepté.
- [9] C. Schwer, E. Kenndler, *Analytical Chemistry* 63 (1991) 1801-1807.
- [10] I.E. Valkó, H. Sirén, M.-L. Riekkola, *Journal of Microcolumn Separations* 11 (1999) 199-208.
- [11] C. Yan, D. Schaufelberger, F. Erni, *Journal of Chromatography A* 670 (1994) 15-23.
- [12] S. Zhang, X. Huang, J. Zhang, C. Horvath, *Journal of Chromatography A* 887 (2000) 465-477.
- [13] H.S. Dearie, V. Spikmans, N.W. Smith, F. Moffatt, S.A.C. Wren, K.P. Evans, *Journal of Chromatography A* 929 (2001) 123-131.
- [14] M.M. Dittmann, G.P. Rozing, *Journal of Chromatography A* 744 (1996) 63-74.
- [15] X. Cahours, P. Morin, M. Dreux, *Journal of Chromatography A* 845 (1999) 203-216.
- [16] F. Progent, in, Paris XI, Châtenay-Malabry, 2005, p. 245.
- [17] M. Bedair, Z. El Rassi, *Journal of Chromatography A* 1013 (2003) 35-45.
- [18] E.C. Peters, M. Petro, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 2288-2295.
- [19] M. Zhang, Z.E. Rassi, *Electrophoresis* 22 (2001) 2593-2599.
- [20] D. Hoegger, R. Freitag, *Journal of Chromatography A* 1004 (2003) 195-208.
- [21] M.M. Dittmann, K. Masuch, G.P. Rozing, *Journal of Chromatography A* 887 (2000) 209-221.
- [22] A.S. Rathore, C. Horváth, *Electrophoresis* 23 (2002) 1211-1216.
- [23] M. Bedair, Z. El Rassi, *Electrophoresis* 23 (2002) 2938-2948.
- [24] R. Rosset, M. Caude, A. Jardy, *Manuel pratique de chromatographie en phase liquide*, Masson, Paris, 1982.
- [25] S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando, *Analytical Chemistry* 57 (1985) 834-841.
- [26] S. Terabe, *Analytical Chemistry* 76 (2004) 240A-246A.
- [27] J. Collet, P. Gareil, *Journal of chromatography A* 792 (1997) 165-177.
- [28] C.P. Palmer, *Electrophoresis* 21 (2000) 4054-4072.
- [29] P.G. Muijselaar, K. Otsuka, S. Terabe, *Journal of chromatography A* 780 (1997) 41-61.
- [30] U. Pyell, *Journal of chromatography A* 1037 (2004) 479-490.
- [31] P. Gareil, *Analisis* 18 (1990) 221-241.
- [32] C.P. Palmer, *Journal of chromatography A* 780 (1997) 75-92.

# CHAPITRE 4 : UTILISATION DES PHASES MONOLITHIQUES POUR LA PRECONCENTRATION

## 1. Introduction

L'ECC est une technique miniaturisée de format identique à l'EC et présente donc les mêmes limitations, à savoir de faibles volumes injectés associés à un faible trajet optique en CE-UV impliquant une sensibilité de la détection limitée. C'est pourquoi il est nécessaire de trouver des solutions permettant de détecter des composés se trouvant à de très faibles concentrations. Une des solutions pouvant être envisagée consiste à intégrer une étape de préconcentration à la chaîne analytique. De nombreuses techniques de préconcentration très performantes ont été décrites tant en CPL qu'en EC. Néanmoins en EC, seules les injections directes sont réalisables de par l'absence de vannes avec des appareils commerciaux d'électrophorèse capillaire. C'est pourquoi des techniques de préconcentration en tête de colonne ont été adoptées, bien qu'elles ne soient pas toujours favorables en ECC à l'analyse d'échantillons réels.

Avec le matériel de CPL, les systèmes de préconcentration en ligne utilisent des vannes permettant de découpler la colonne analytique de la précolonne permettant ainsi la percolation de grand volume, l'élimination d'interférents et la possibilité d'utiliser une précolonne dont la spécificité peut être différente de celle de la colonne analytique. Toutes ces caractéristiques qui font les avantages d'un système en ligne en chromatographie peuvent être reproduits et adaptés en format microsystème.

L'objectif de ces travaux est, dans un premier temps, d'évaluer le potentiel de préconcentration en tête de colonne des phases monolithiques en électrochromatographie capillaire.

## 2. Principe de préconcentration

### 2.1 En électrophorèse capillaire

Améliorer la faible sensibilité de l'EC a été l'objet de nombreuses études et un certain nombre de techniques ont été développées afin de préconcentrer les échantillons sans dégrader leur séparation en choisissant judicieusement leurs milieux de dilution et la nature des électrolytes

de séparation. Les approches développées peuvent être classées en deux catégories en fonction des phénomènes physiques intervenant dans la préconcentration des analytes. La première catégorie est basée sur les différences de mobilités électrophorétiques des solutés dans certaines conditions et comprend les techniques dites de stacking par amplification de champ, de stacking par jonction de pH dynamique, d'isotachophorèse. Ces techniques sont bien adaptées à la préconcentration de composés chargés mais ne sont pas applicables aux composés neutres puisqu'ils n'ont pas de mobilité électrophorétique. La deuxième catégorie fait intervenir des différences de distribution des analytes entre une pseudo-phase ou phase stationnaire et l'électrolyte et comprend les techniques de préconcentration de type chromatographique dont le sweeping. Ces techniques sont utilisables pour des composés neutres et chargés.

- Les méthodes de préconcentration par amplification de champ reposent sur la différence de champ électrique local de part et d'autre de la frontière entre la zone de l'échantillon et la zone d'électrolyte de séparation. En effet, lorsqu'un soluté est dissous dans un milieu échantillon dont la conductivité électrique est moindre par rapport à celle de l'électrolyte de séparation, alors un phénomène de concentration intervient lors de l'application de la tension. Dans ces conditions, le champ électrique présent au niveau de la zone de migration de l'échantillon est plus important que celui existant dans l'électrolyte de séparation. Les ions migrent alors très rapidement jusqu'à l'interface entre les zones de faible et de forte conductivité puis ralentissent dès qu'ils atteignent la frontière entre ces deux zones, créant ainsi leur accumulation dans une zone de plus faible largeur. Les diverses techniques de stacking présentent des variations de mises en œuvre et jouent sur les phénomènes de migration des ions à partir du principe décrit. [1]. Des facteurs de préconcentration de plusieurs dizaines à plusieurs milliers ont été atteints grâce à ces techniques.

Les techniques d'isotachophorèse utilisent la discontinuité de composition des électrolytes de séparation. En effet, le capillaire est constitué de trois zones de conductivité différente : un électrolyte dont la mobilité électrophorétique est plus importante que celle de la zone échantillon car il contient un co-ion de haute mobilité, électrolyte meneur, un électrolyte dont la mobilité électrophorétique est plus faible, électrolyte terminal, et la zone échantillon comprise entre ces deux zones d'électrolytes. Lorsque la tension est appliquée sur le capillaire, un gradient de potentiel se développe entre les deux zones d'électrolyte, donc dans la zone échantillon, où chaque soluté constitue alors sa propre zone, migrant toutes à la même

vitesse, dictée par l'électrolyte leader. Cette technique est particulièrement utile lorsque les échantillons présentent des ions conducteurs. [2,3].

- Le sweeping met à profit la présence d'une pseudo-phase permettant ainsi de préconcentrer les composés neutres. Le sweeping a été décrit initialement dans des conditions de CEMC mettant en œuvre une pseudo phase stationnaire micellaire. La préconcentration par sweeping correspond à l'accumulation des analytes via des interactions avec une pseudo phase stationnaire qui pénètre dans la zone échantillon sous l'application d'une tension [4]. Les pseudo phases peuvent être des micelles ou des agents de complexation tels que le borate. Des augmentations de la sensibilité de 80 à 5000 ont été observées.

Les techniques chromatographiques en EC utilisent la présence d'une phase stationnaire sur une faible longueur du capillaire, s'assimilant ainsi à de l'extraction sur phase solide couplée en ligne à de l'EC. La technique consiste donc à remplir l'entrée du capillaire par une phase stationnaire de CPL. La solution échantillon est introduite hydrodynamiquement et l'élution a lieu à l'aide d'une phase mobile plus éluante que le milieu d'injection. Cette technique a été développée sur diverses phases stationnaires plus ou moins spécifique et des augmentations du facteur de sensibilité de 500 à 7000 ont été observées. Cependant, elle présente des inconvénients non négligeables tels que des temps d'analyse longs, des traînées de pics, des pertes d'efficacités comparées à des méthodes purement électrophorétiques.

## **2. 2 Préconcentration couplée en ligne avec la chromatographie en phase liquide**

Les techniques de préconcentration en CPL permettent d'étudier des composés à l'état de traces et l'avantage des méthodes en ligne est leur automatisation simple à réaliser. En chromatographie en phase liquide la préconcentration en ligne est mise en œuvre grâce à un système de précolonne reliée à une colonne analytique par un système de vannes et de pompes permettant ainsi de percoler les volumes importants d'échantillon sur la précolonne seule puis après piégeage de ceux-ci, de les entraîner vers la colonne analytique avec une phase mobile de force éluante suffisante en vue de la séparation, ceci étant représenté sur la Figure 75.

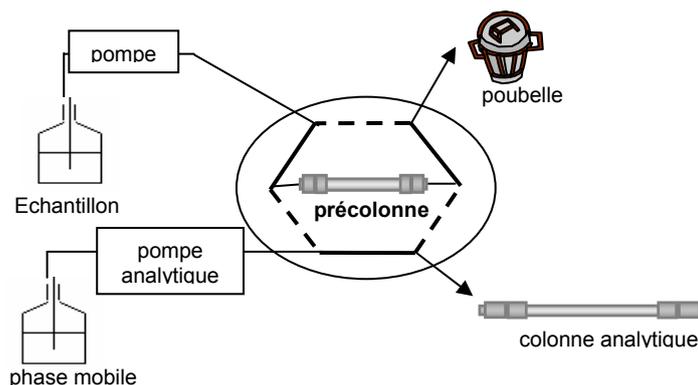


Figure 75 : Schéma d'un système d'extraction, de préconcentration en ligne couplé à la CPL par une vanne 6 voies à deux positions.

Un tel système permet le choix des phases stationnaires utilisées, elles peuvent être de fonctionnalités différentes entre la précolonne et la colonne en fonction des besoins analytiques. Selon les solutés à étudier, elles peuvent être adaptées pour répondre à des extractions et séparations plus ou moins spécifiques. Pour la recherche de composés neutres plus ou moins hydrophobes dans des échantillons aqueux, les phases stationnaires permettant de bien retenir ces composés doivent présenter des groupements apolaires. L'élution des composés préconcentrés a ensuite lieu par un gradient eau - acétonitrile qui permet à la fois de désorber, de transférer les solutés de la précolonne à la colonne analytique, tout en assurant la séparation de ces composés sur cette dernière colonne [5]. De par la configuration du montage, il est possible de faire varier le volume percolé sur la précolonne et ainsi connaître quel est le volume de fin de fixation du composé sur la phase stationnaire sélectionnée. Ce volume est défini comme étant le volume maximum percolable permettant un rendement d'extraction (rapport entre la quantité récupérée après élution en ligne et la quantité percolée sur la précolonne) de 100%. Ce volume de fin de fixation dépend de l'hydrophobie des composés et peut être facilement calculé à partir de la valeur estimée du facteur de rétention dans l'eau pure.

Lors du transfert des solutés de la précolonne vers la colonne il peut y avoir un phénomène d'élargissement de bande. C'est pourquoi l'analyse quantitative se fait à partir de solution étalon dopée subissant la préconcentration en ligne, en utilisant les hauteurs ou les aires des pics. Quand l'extraction liquide – solide a lieu sur une cartouche d'extraction, on définit usuellement un facteur d'enrichissement en volume qui est égal au rapport entre le volume percolé sur la cartouche et le volume de l'extrait. Quand l'extraction liquide – solide est suivie d'une analyse chromatographique en ligne, le facteur d'enrichissement exprimé en volume

n'a plus de sens. On définit plutôt une concentration minimale détectable qu'on peut calculer à partir du volume maximal percolable et de la limite de détection du système colonne analytique – détecteur.

Il n'est pas usuel de définir un facteur FES dans ce cas, cependant s'il était utilisé, il serait plus correct de le définir avec le rapport des aires des pics et non des hauteurs pour tenir compte de l'élargissement de bande possible.

## **2.3 En électrochromatographie capillaire**

### *2.3.1 Techniques développées pour la préconcentration*

Des méthodes de préconcentration en tête de colonne ont été développées sur plusieurs types de phase stationnaire : particulières [6,7], sol-gel [8,9] et monolithiques [10,11]. Etant donné que l'ECC fait intervenir une phase stationnaire et l'application d'un champ électrique, les principes de préconcentration décrits dans les paragraphes précédents peuvent être adaptés. En effet, il est possible d'utiliser des techniques de préconcentration sous champ, issues des méthodes électrophorétiques [3]. Il est aussi possible de développer des méthodes de préconcentration utilisant la présence d'une phase stationnaire, issue des méthodes employées en CPL. Ce sont ces dernières qui ont été le plus développées en ECC. Des composés neutres ont d'abord été étudiés et préconcentrés grâce à cette technique mais aussi des composés chargés. Elle utilise ainsi une phase stationnaire apolaire et un milieu échantillon de composition moins éluante que celui de la phase mobile, ce qui permet d'observer un phénomène de préconcentration en tête de colonne [7,9]. Ensuite, les composés sont élués avec une phase mobile plus éluante qui permet à la fois une bonne rétention et une bonne résolution des composés [7,10]. C'est pourquoi des pourcentages en solvant organique compris entre 75 et 95 % en volume sont généralement utilisés. Par ailleurs, comme cette technique s'apparente à celle de la CPL en ligne, le volume percolé peut être supérieur à la colonne tant qu'il ne dépasse pas le volume de fin de fixation défini pour un composé.

L'influence de la longueur de la zone injectée, c'est-à-dire du volume percolé, sur la largeur du pic obtenu sur des colonnes à base de sol-gel photopolymérisé [8,9] ou de particules d'ODS [6,7] a été évaluée, et ce sur des composés très divers. Au-delà d'un certain volume de zone injectée, dépendant du composé étudié, l'élargissement des pics devient trop important, et il n'y a plus de phénomène d'enrichissement, la phase stationnaire semble saturée, sa capacité limite ayant été atteinte pour ces conditions de percolation et d'éluion. Les facteurs d'enrichissement sont d'ailleurs importants : jusqu'à 1000 pour le pyrène et la dodécaphénone

[9] et même 22 000 pour la benzoïne [11]. Par ailleurs, les facteurs d'enrichissement augmentent avec la valeur du facteur de rétention.

De par la présence d'une phase stationnaire, le volume mesuré par la longueur injectée n'est pas un paramètre facilement accessible, c'est pourquoi le temps d'injection et la tension appliquée sont généralement utilisés pour indiquer l'importance de l'étape de préconcentration mise en oeuvre. Cependant, Quirino et al [9] calculent la longueur de la zone injectée connaissant le temps de percolation de la solution échantillon et la vitesse linéaire d'un marqueur de flux dans les conditions d'élution. Or, ce calcul ne tient pas compte des conditions de l'étape de préconcentration. En effet, la composition de la zone injectée étant différente de celle de la phase mobile contenue initialement et lors de l'élution, cela induit une modification du flux électroosmotique, donc de la vitesse linéaire lors de l'analyse. Cette modification du FEO varie avec l'importance de la zone d'injection et fait donc varier la vitesse linéaire de la phase mobile lors de l'étape d'élution. C'est pourquoi leur calcul de la zone échantillon doit être pris à titre indicatif.

Le mode d'injection, hydrodynamique ou électrocinétique, n'a pas d'influence sur l'enrichissement des composés lorsqu'ils sont neutres, comme dans la plupart des cas décrits. Quelques études récentes ont porté sur les composés chargés et des facteurs de préconcentration de l'ordre de 24 000 pour la caféine [11] ont été déterminés. Pour obtenir de tels facteurs de préconcentration il faut associer des méthodes de préconcentration dues aux interactions avec la phase stationnaire à celles utilisant les champs électriques lors de la séparation. En effet, la concentration en électrolyte dans la matrice de l'échantillon est plus faible que celle de la phase mobile. Ainsi, lors de l'application d'une tension, le champ électrique mesuré sur cette zone échantillon est plus important que celui de la zone d'élution. Par conséquent, les analytes chargés migrent rapidement à l'intérieur de la zone échantillon jusqu'à la frontière avec une des zones de phase mobile où leur vitesse se trouve alors réduite. La zone d'analytes se trouve alors réduite, condensée et la préconcentration est ainsi plus importante.

### *2. 3. 2 Evaluation d'un facteur d'enrichissement en signal*

L'évaluation de l'importance du phénomène de préconcentration se mesure par le facteur d'enrichissement en signal (FES) qui est théoriquement défini par le rapport entre le signal obtenu après préconcentration et avant préconcentration (par injection directe). Le facteur

d'enrichissement en signal (FES) peut être mesuré par le rapport des hauteurs ou par le rapport des aires.

$$FES = \frac{h}{h_0}$$

$$FES = \frac{A}{A_0}$$

$h$  et  $A$  étant la hauteur et l'aire du pic après concentration et  $h_0$  et  $A_0$  étant la hauteur et l'aire du pic par injection directe. S'il n'y a pas d'élargissement de bande lors de la préconcentration alors  $FES(h)$  et  $FES(A)$  sont égaux.

Dans la pratique, si on a besoin d'enrichir c'est qu'aucun signal n'est obtenu pour l'échantillon. Dans ce cas, l'utilisation d'une solution de référence diluée, qui donne un signal au-delà de la limite de détection, peut être utilisée pour calculer le FES.

Pour la mesure du  $FES(A)$  on utilise l'aire corrigée des pics (rapport de l'aire sur le temps de rétention du composé) car elle permet de corriger les modifications de flux électroosmotique dues aux variations de la composition des phases liquides dans le capillaire. Le facteur d'enrichissement en signal est le moyen de chiffrer l'enrichissement lors de la préconcentration. Il n'est pas utilisé pour l'analyse quantitative, cette dernière étant réalisée par des solutions étalons subissant tout le protocole de préconcentration afin de tenir compte d'éventuels élargissements de bandes ayant lieu lors de la préconcentration en tête de colonne. Ces derniers sont parfois difficiles à éviter et sont fonction des caractéristiques des solutés. On définit la concentration minimale détectable qui correspond à la concentration de la solution qui une fois préconcentrée donne un signal égal à trois fois le bruit de fond autrement dit la limite de détection par injection directe.

### 3. Méthodes et conditions utilisées pour la préconcentration en ECC

Les méthodes de préconcentration que nous avons développées ont porté sur des échantillons sous forme neutres et d'hydrophobie variée : des chlorophénols et des HAP. Après une première étape de percolation des composés à l'état de traces dans un milieu totalement ou partiellement aqueux, une étape d'élution est effectuée sur la phase stationnaire, ce processus est représenté sur la Figure 76:

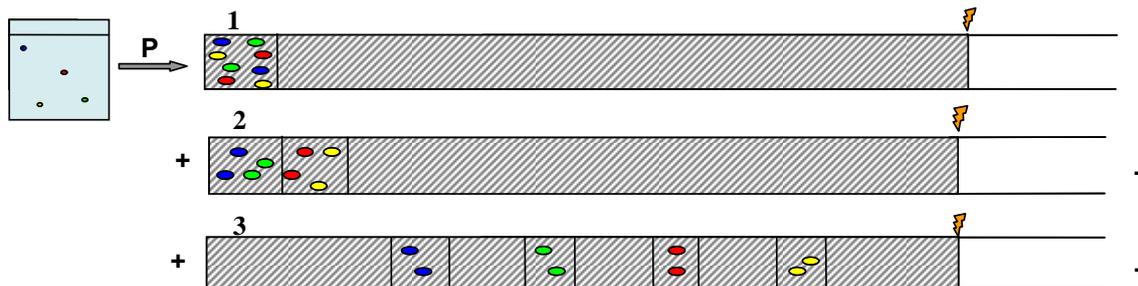


Figure 76 : schéma décrivant les différentes étapes du processus de préconcentration. 1 : percolation sous pression des échantillons dilués. 2 et 3 : séparation sous champ électrique en milieu éluant des espèces préconcentrées.

Les composés étudiés lors de ces expériences sont des pesticides et des HAP dont les caractéristiques sont les suivantes :

Composés	Log P	pKa
2-Chlorophénol	2,16	8,5
3-Chlorophénol	2,16	9,0
2, 4-Dichlorophénol	2,8	7,8
Naphtalène	3,3	-
Anthracène	4,45	-
Pyrène	4,88	-
Chrysène	5,5	-

Tableau 12 : Structure et valeurs de pKa ainsi que des log P des composés étudiées.

Ces divers composés ont été préparés à des concentrations de 100 mg/L ou ppm pour les solutions mères dans un mélange acétonitrile-eau ultrapure (50:50, v/v) pour les chlorophénols et dans 100% d'acétonitrile pour les HAP. Les dilutions ont été effectuées à partir de la solution mère dans de l'eau ultrapure et ont pour concentration 10, 1 mg/L ou ppm et 100 µg/L ou ppb.

Les phases stationnaires employées lors de ces analyses sont constituées de monomères d'hexylacrylate (HA), d'acide acrylamidopropanesulfonique (AMPS) et de butanediol diacrylate (BDDA).

## 4. Augmentation de la sensibilité en ECC par augmentation du volume injecté

Lors d'une étude préliminaire, nous avons déterminé jusqu'où il était possible d'augmenter la longueur de la zone échantillon de composition identique à la phase mobile d'éluion, sans pour autant perdre en efficacité, donc en résolution. Pour cela nous avons procédé à des injections de plus en plus prolongées, ces injections étaient de type hydrodynamique et ont eu lieu sous 2, 4, 6 et 8 bars pendant un temps variant de 3 à 40 secondes. La Figure 77 présente une superposition des électrophérogrammes obtenus pour des injections sous 8 bars pendant des temps variables. La surcharge volumique de la phase devient réellement apparente à partir de 24 secondes.

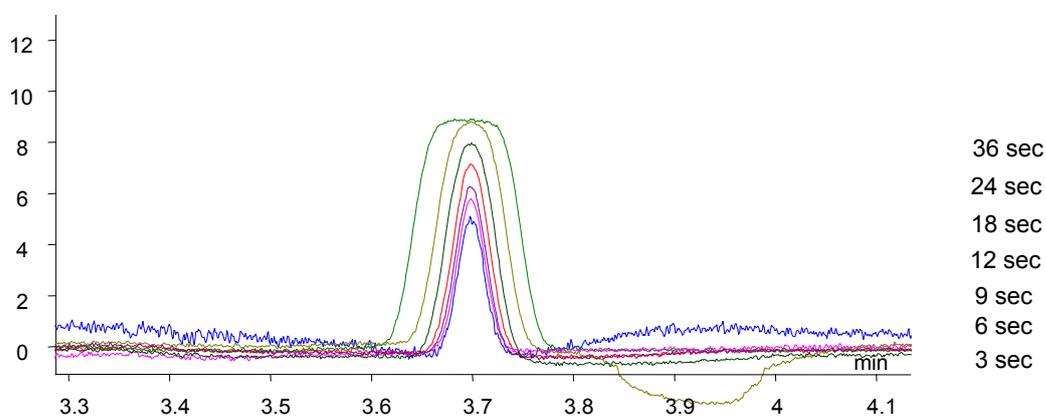


Figure 77 : 3-Chlorophénol à 4ppm, milieu de l'échantillon de composition identique à la phase mobile : acétonitrile - tampon acétate à 5mM, pH = 7,1 (80:20, v/v). Injection hydrodynamique : 8 bars, durée de l'injection : de 3 à 36 secondes. Tension : 20 kV, à 25 °C. Colonne à base d'hexylacrylate, longueur de la colonne 27,5 cm, longueur totale du capillaire : 36 cm.

Une augmentation de la hauteur des pics obtenus sans une perte trop importante d'efficacité est observée jusqu'à 12 secondes. Au-delà, l'efficacité diminue significativement mais la hauteur du pic continue à augmenter. Il n'est donc pas possible de surcharger trop en volume car on perd en efficacité et donc en résolution, c'est pourquoi une étape de préconcentration est inévitable.

## 5. Préconcentration des échantillons aqueux

Nous avons évalué le potentiel de nos phases monolithiques pour la préconcentration de composés neutres dans des matrices aqueuses.

## 5.1 Calculs théoriques

Afin d'évaluer l'affinité des composés étudiés avec la phase stationnaire monolithique, leur facteur de rétention peut être extrapolé dans le milieu de l'échantillon, l'eau pure. Ce facteur de rétention est alors noté  $k_w$ . Dans le chapitre précédent, nous avons souligné que le mécanisme de rétention prépondérant de ces phases stationnaires est généralement des interactions hydrophobes. En milieux aqueux, ces interactions hydrophobes sont exaltées et les composés sont fortement retenus.

La Figure 78 présente l'extrapolation du facteur de rétention dans l'eau pure pour deux composés de structure et d'hydrophobie proche à ceux étudiés, le phénol de  $k_w$  d'environ 10 et le 3,4-diméthylphénol dont la valeur extrapolée de  $k_w$  est de 81. Nos valeurs étant extrapolées, elles sont approximatives et peut-être inférieures aux valeurs vraies.

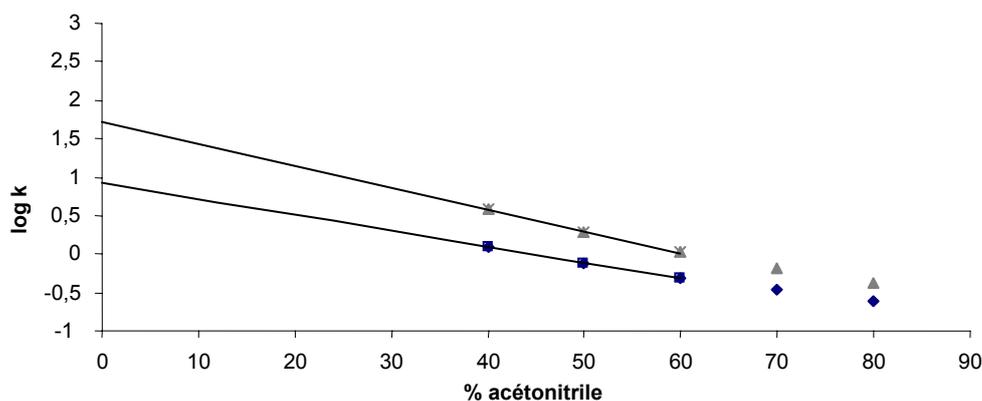


Figure 78 : variation du facteur de rétention du phénol et du 3,4-diméthylphénol en fonction du pourcentage en acétonitrile, extrapolation du facteur de rétention du phénol dans l'eau pure,  $k_w$ , d'environ 1. Colonne entièrement polymérisée : 75 $\mu$ m x 35,5 cm, détection à 27 cm, phase mobile : acétonitrile - tampon phosphate 5 mM, pH 6,8 (v/v variable), force ionique = 1,75.10<sup>-3</sup> M, tension : + 25 kV. Température : 25 °C, détection par absorbance UV à 200 nm, injection électrocinétique : 4 kV / 4s

Etant donné que l'extraction solide – liquide permet de calculer le volume maximal percolable afin d'obtenir un rendement de 100%,  $V_R$ , à partir du  $k_w$  selon la relation ci-dessous, nous avons entrepris de déterminer le  $V_R$  de nos composés.

$$V_R = V_0(1 + k_w)$$

Avec  $V_0$  le volume mort de la colonne,  $k_w$  le facteur de rétention du soluté dans l'eau pure.

Etant donné que nous connaissons la valeur de la porosité totale de nos phases stationnaires (chapitre 3), soit 0,6 pour les phases à base d'hexylacrylate utilisée lors de cette étude, il est

tout à fait possible d'évaluer le volume mort de la colonne utilisée et ainsi d'estimer son volume maximal percolable avec la valeur estimée du  $k_w$ . Ainsi, pour nos composé dont le  $k_w$  est estimé à 81, le volume maximal percolable est de 59,7  $\mu\text{L}$ , ce qui équivaut à environ 50 fois le volume total de la colonne.

## 5.2 Etude de l'élargissement de bande, choix du composé le plus polaire

### 5.2.1 Milieu de l'échantillon aqueux

Etant donné que les composés les plus retenus sont les plus apolaires, leur volume de fin de fixation, c'est-à-dire le volume à partir duquel les composés ne sont plus retenus, est élevé et permet d'obtenir des facteurs d'enrichissement importants. Nous avons préféré nous intéresser à l'étude de composés moins hydrophobes, les chlorophénols, afin de pouvoir estimer les limites de la phase stationnaire en tant que matériau servant à la préconcentration. Les composés sont préparés dans l'eau pure et la phase mobile contient 80% d'acétonitrile et permet d'éluer les composés préconcentrés rapidement tout conservant une séparation bien résolue des composés chlorophénoliques en mélange.

Les premières analyses ont été menées sur les composés tests : le 2 et 3-chlorophénols à une concentration de 4 ppm. La Figure 79 présente une superposition d'électrophorogrammes obtenus à cette concentration après des temps de percolation allant de 2 à 96 minutes sous 8 bars.

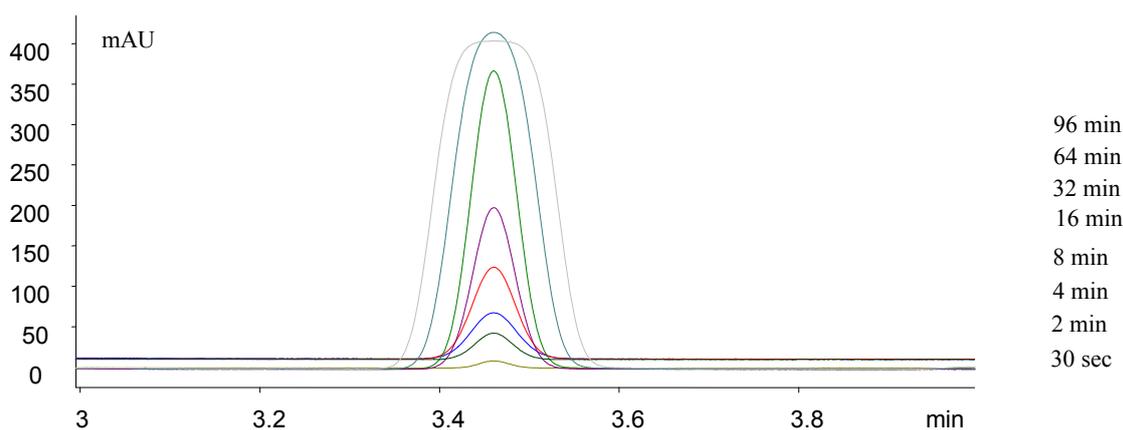


Figure 79 : Electrophérogrammes superposés de 3-Chlorophénol à 4 ppm, milieu de l'échantillon aqueux. Phase mobile : mélange composé d'acétonitrile et de tampon acétate à 5mM, pH = 7,1 (80:20, v/v). Durée de l'injection : de 2 à 64 minutes sous 8 bars. Séparation sous 20 kV, à 25 °C. Colonne à base d'hexylacrylate, longueur de la colonne : 27,5 cm, longueur totale du capillaire : 36 cm.

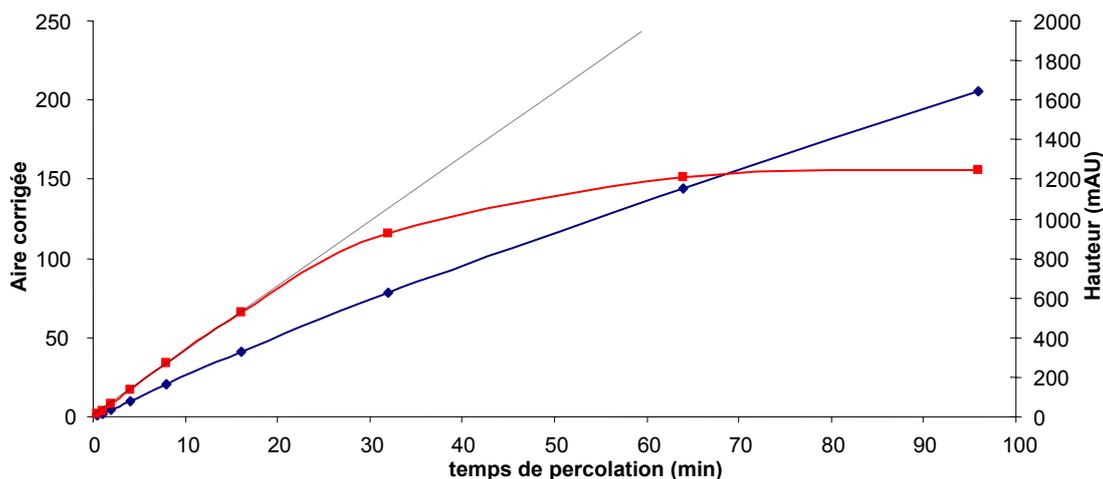


Figure 80 : Evolution de la hauteur (■) et de l'aire (◆) du pic de 3-chlorophénol en fonction de la durée de préconcentration réalisée sous une pression de 8 bars. Milieu de l'échantillon aqueux, séparation avec une phase mobile composée d'un mélange hydroorganique d'acétonitrile et de tampon acétate 5 mM, pH 7,1 (80:20, v/v). Analyses réalisées sous 20 kV à 25 °C. Colonne à base d'hexylacrylate, longueur de la colonne 27,5 cm, longueur totale du capillaire : 36 cm.

La Figure 80 rend compte de l'évolution de l'aire et de la hauteur du pic en fonction des temps de percolation du 3-chlorophénol à 4 ppm. Elle indique une différence de comportement entre les variations de la hauteur ou de la surface en fonction du temps de préconcentration, proportionnel au volume injecté. En effet, l'évolution de l'aire des pics est linéaire sur toute la gamme des temps de percolation testée. La quantité détectée est donc toujours proportionnelle au temps de percolation, soit à la quantité percolée, et le rendement de l'extraction est bien de 100%.

Par contre, cette figure permet de voir qu'au-delà d'un temps de percolation égal à 20 min la hauteur de pic ne varie plus linéairement avec la quantité injectée et donc l'efficacité du pic diminue. La hauteur de pic atteint un palier pour des valeurs de temps de préconcentration supérieures à 60 minutes. Un effet de surcharge massique intervient certainement à partir de ce temps de percolation pour obtenir un tel élargissement de pic. Il est donc inintéressant de percoler pendant des temps supérieurs à 60 minutes pour cette concentration puisqu'on augmente plus la hauteur du pic, qui par conséquent s'élargit. Par contre, augmenter la hauteur de pic en perdant un peu d'efficacité peut s'avérer intéressant dans certains cas où la résolution n'est pas critique.

Les pertes en efficacité sont de 15% pour un temps de percolation de 20 minutes et 75% pour un temps de percolation de 64 minutes. L'analyse quantitative ayant lieu par l'aire des pics dès que l'efficacité n'est pas constante, il peut être intéressant d'accepter de perdre en efficacité si la résolution des pics n'est pas critique.

Ainsi, la Figure 81 représente les électrophorégrammes obtenus montrant la séparation des 2- et 3-chlorophénols pour des temps de percolation variant entre 2 secondes et 64 minutes. Les deux pics sont bien résolus. Dans ce cas, même avec la perte d'efficacité de 75% mesurée sur cette série d'analyse pour un temps de percolation de 64 minutes, la résolution reste acceptable, supérieure à 1,6 ayant subi une perte de 30%.

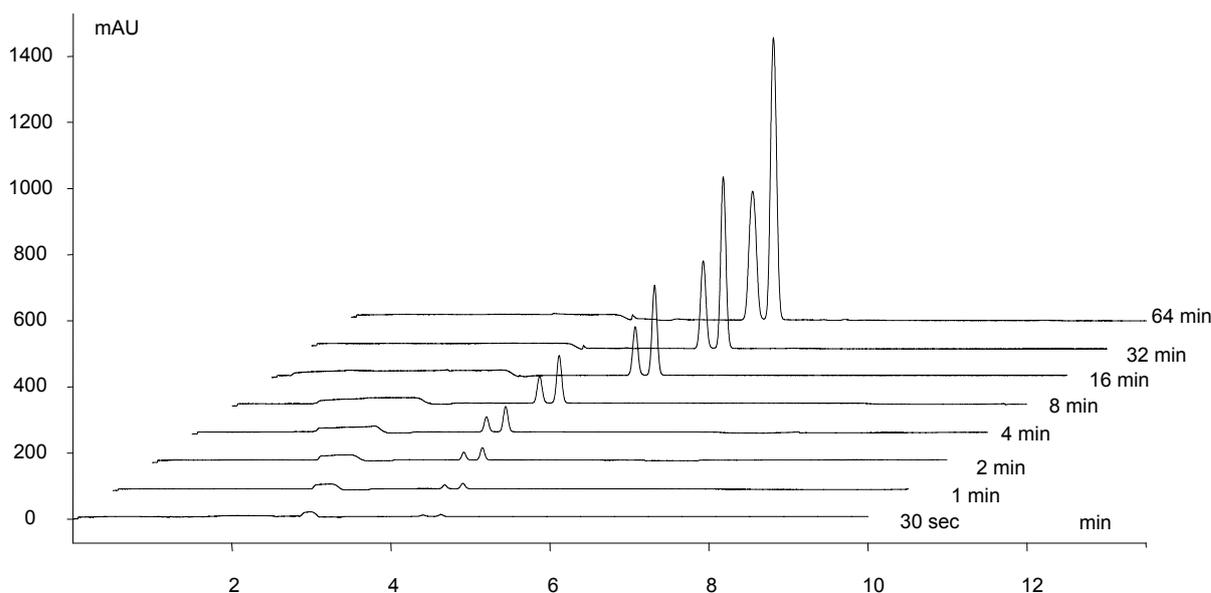


Figure 81 : Electrophorégrammes superposés d'un mélange de 2- et de 3- chlorophénol à une concentration de 4 ppm en milieu aqueux, le 3chlorophénol et le 2-chlorophénol respectivement, préconcentrés pendant une durée de 30 secondes à 64 minutes sous 8 bars de pression. Séparation sous 20 kV, à 25 °C. Phase mobile : acétonitrile - tampon acétate à 5mM, pH = 7,1 (80:20, v/v). Colonne à base d'hexylacrylate, longueur de la colonne : 27,5 cm, longueur totale du capillaire : 36 cm. Ordre d'élution : (1) 2-chlorophénol, (2) 3-chlorophénol.

Cette figure illustre bien que le choix des conditions de préconcentration dépend de la séparation. Notamment si la résolution est critique, les pertes en efficacité ne peuvent pas être tolérées et la limite est alors de 20 minutes pour le temps de percolation.

### 5. 2. 2 Milieu de l'échantillon de force ionique égale à la phase mobile

Des expériences similaires ont ensuite été menées avec un milieu de l'échantillon de concentration identique en composé, 4 ppm, mais de force ionique identique à la phase mobile éluante,  $I = 1,75 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ . Ces expériences arrivent aux mêmes conclusions que précédemment, ainsi, cette variation n'engendre pas d'effets quand au facteur d'enrichissement obtenu, au efficacités et hauteur des pics du système. Etant donné que les composés étudiés sont neutres dans les conditions expérimentales employées, il n'est pas étonnant que la différence de composition entre le milieu échantillon et la phase mobile

interviennent peu quand à l'élargissement ou la compression des bandes de solutés. Cependant, pour des composés chargés cette différence de composition peut se révéler un avantage certain, car des effets de stacking peuvent s'ajouter aux phénomènes de préconcentration existants.

### *5. 2. 3 Conséquences de l'élargissement de bandes lors de la préconcentration sur le FES et sur l'analyse quantitative*

Les courbes indiquant les variations du FES(h) et du FES(A) en fonction de la quantité percolée ont de par leur définition la même allure que les courbes de la Figure 80. Autrement dit, le FES(h) a une valeur limite alors que le FES(A) n'en a pas et dès que l'efficacité diminue (au-delà de 20 minutes) la valeur du FES calculé par les aires sera supérieure à celle calculée par les hauteurs.

Le FES n'est en fait qu'un chiffrage de l'augmentation de la sensibilité et n'a aucune utilité dans l'analyse quantitative, but ultime de l'analyse. Pour l'analyse quantitative, il est évident que l'étalonnage doit se faire avec des solutions standards préconcentrées dans les mêmes conditions que l'échantillon à analyser. L'élargissement de bande devrait être constant d'une expérience à l'autre si bien que hauteur et surface peuvent être utilisées théoriquement. Pratiquement, l'utilisation des aires corrigées est préconisée car on s'affranchit de l'élargissement de bande due à des variations de la vitesse.

Ainsi, pour une solution de 3-chlorophénol de concentration 4 ppm, avec un temps de percolation de 64 minutes, les facteurs d'augmentation de sensibilité sont d'environ 500 s'il est mesuré avec par les hauteurs de pics et d'environ 1000 s'il est mesuré par les aires. L'expérience nous donnant le  $h_0$  et le  $A_0$  a été réalisée avec des paramètres d'injection de 2 bars pendant 6 secondes. Pour une solution de 2-chlorophénol de concentration 4 ppm, avec un temps de percolation de 64 minutes, les facteurs d'augmentation de sensibilité sont d'environ 300 s'il est mesuré avec par les hauteurs de pics et d'environ 750.

L'étude a été réalisée à 4 ppm pour pouvoir mesurer réellement le FES, c'est-à-dire disposer d'une injection directe exploitable. Néanmoins à cette concentration des effets de surcharge massique semblent intervenir et afin de vérifier cette hypothèse, une solution moins concentrée a été préparée à 40 µg/L ou ppb.

#### 5. 2. 4 Recherche de la concentration minimale détectable

Théoriquement, la concentration minimale détectable est celle qui après préconcentration fournit un signal équivalent à la limite de détection obtenue par injection directe, et définie ici comme trois fois le rapport intensité du signal sur intensité du bruit de fond. Des solutions de 2- et de 3-chlorophénol ont été préparées à 40 ppb, à 4 ppb et à 1ppb ou  $\mu\text{g/L}$  ont ainsi été préparées dans le but de déterminer leur concentration minimale détectable.

Dans l'exemple de la Figure 82, des temps de percolation croissants permettent de détecter le 3-chlorophénol à une concentration de 40 ppb alors que par injection directe cela n'est pas possible à cette concentration.

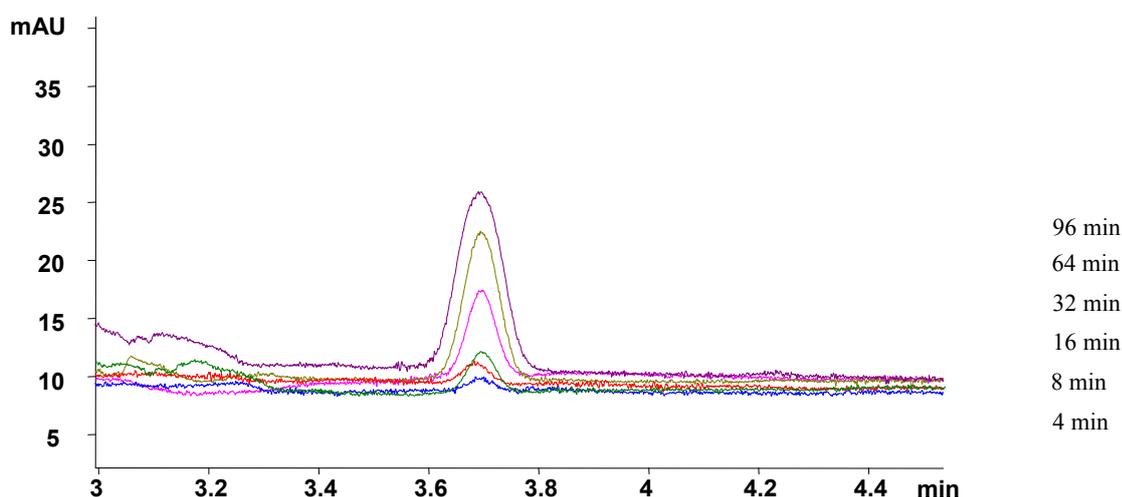


Figure 82: Superposition d'électrophorogrammes de 3-Chlorophénol percolé à 40 ppb, milieu de l'échantillon aqueux, phase mobile : mélange composé d'acétonitrile et de tampon acétate à 5mM, pH = 7,1 (80:20, v/v). Durée de l'injection : de 4 à 96 minutes sous 8 bars. Séparation sous 20 kV, à 25 °C. Colonne à base d'hexylacrylate, longueur de la colonne 27,5 cm, longueur totale du capillaire : 36 cm.

Sur la Figure 82, on peut observer la perte en efficacité des pics lorsque le temps de percolation augmente comme observé à 4 ppm sur la Figure 79. Cependant, le pourcentage de 75% de perte n'est atteint qu'après 96 minutes de percolation, l'effet de surcharge massive observé à 4 ppm n'intervient pas à 40 ppb. Cela signifie bien que la solution à 4 ppm est trop concentrée et que la limite de linéarité du détecteur était alors dépassée pour des longs temps de préconcentration. Par contre, l'augmentation des temps de percolation au-delà de 60

minutes pour des solutions plus diluées que 4 ppm est réalisable sans surcharger la colonne en masse.

La Figure 83 présente l'évolution de la hauteur et de l'efficacité obtenue pour le 3-chlorophénol à 40 ppb.

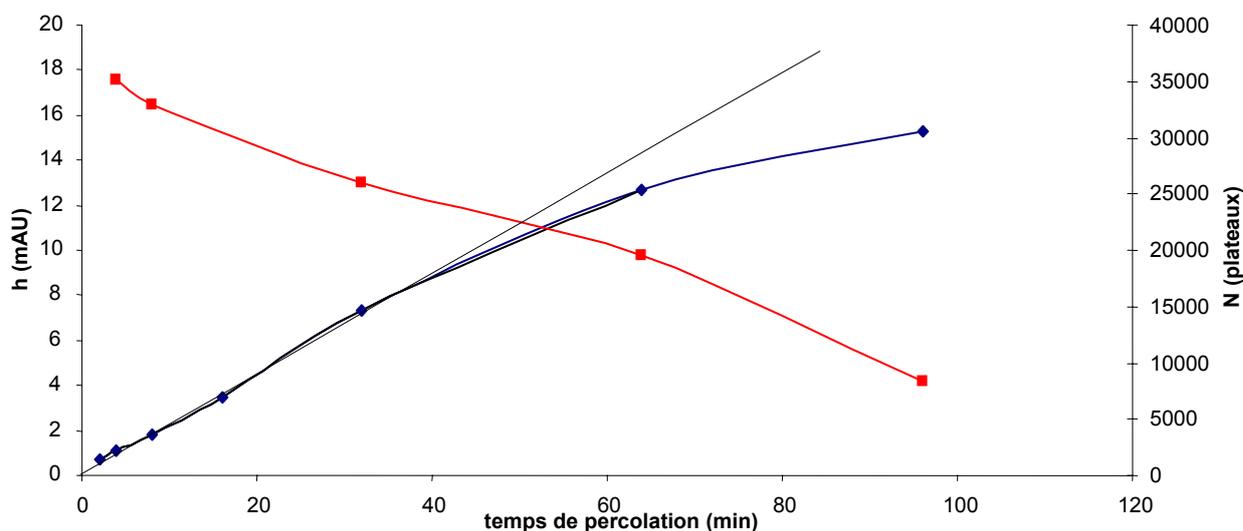


Figure 83 : Evolution de l'efficacité (■) et de la hauteur (◆) pour le 3-chlorophénol fonction du temps de percolation. Milieu de l'échantillon aqueux, séparation avec une phase mobile composée d'un mélange hydroorganique d'acétonitrile et de tampon acétate 5 mM, pH 7,1 (80:20, v/v). Analyses réalisées sous 20 kV à 25 °C. Colonne à base d'hexylacrylate, longueur de la colonne 27,5 cm, longueur totale du capillaire : 36 cm.

La perte en efficacité de 75% intervient seulement à partir d'un temps de percolation de 96 minutes à cette concentration (Figure 83). Il est ainsi envisageable de percoler des solutions diluées pendant des temps encore long afin de déterminer la concentration minimale détectable. L'augmentation de l'aire des pics est toujours linéaire jusqu'à 96 minutes et l'évolution de la hauteur représentée sur Figure 83, s'écarte de la linéarité à partir de 30 minutes mais continue à augmenter jusqu'à 96 minutes, le plateau étant atteint pour des valeurs supérieures à 96 minutes. Afin de rechercher la concentration minimale détectable, on s'est permis d'aller au-delà de 96 minutes de temps de percolation.

Les solutions diluées ne permettent pas de réaliser des injections directes pour la détermination du FES, c'est pourquoi l'injection directe de solutions à 4 ppm (sous 2 bars pendant 6 secondes) est utilisée comme  $h_0$  et  $A_0$  en supposant que le signal obtenu à 40 ppb est 100 fois plus faible.

Pour les solutions à 40 ppb, des FES de 1900 et de 1300 ont été déterminés après 96 minutes de percolation lorsque l'aire du pic est utilisée pour les 2- et 3-chlorophénol respectivement. Les FES ont également été déterminés après 64 minutes de percolation et des valeurs similaires à celles décrites pour des temps de percolation de 64 minutes de solutions à 4 ppm ont été observés. Cela traduit bien le fait que le FES dépend du volume percolé sur la colonne analytique.

Des solutions de plus en plus diluées ont ensuite été percolées jusqu'à des temps de 128 minutes et la concentration minimale détectable pour le 3-chlorophénol se situe à 0,4 ppb après 128 minutes de percolation sous 8 bars, le FES atteint alors une valeur de 18960, le rapport des hauteurs conduit, lui à des facteurs de préconcentration de 11 219, (Figure 84). La perte en efficacité à cette concentration est de 80%, mais sa valeur reste correcte comparée aux valeurs discutées précédemment.

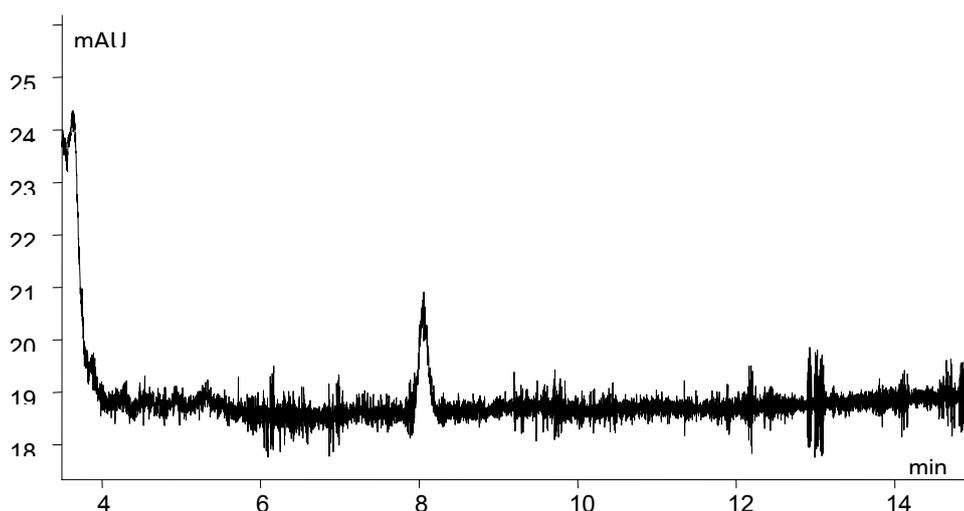


Figure 84 :Electrophérogramme de 3-Chlorophénol percolé à 0,4 ppb, milieu de l'échantillon aqueux, phase mobile : mélange composé d'acétonitrile et de tampon acétate à 5mM, pH = 7,1 (80:20, v/v). Durée de l'injection : de 128 minutes sous 8bars. Séparation sous 20 kV, à 25 °C. Colonne à base d'hexylacrylate, longueur de la colonne 27,5 cm, longueur totale du capillaire : 36 cm.

L'étude précédente a été réalisée avec un soluté relativement polaire. L'élargissement de bande est dû au fait qu'il migre un peu en tête de colonne lors de la préconcentration. Il est évident que des solutés apolaires seront beaucoup mieux retenus en tête de colonne et que l'élargissement de bande sera moindre.

La conservation des caractéristiques résolutive d'une séparation comportant une étape de préconcentration est très intéressante ; elle ouvre des perspectives nouvelles pour ces phases

monolithiques quand à l'analyse en ligne de mélanges complexes dilués, issus d'échantillons biologiques par exemple.

### 5.3 Applications aux HAP et à d'autres composés

#### 5.3.1 Les HAP

Des mélanges de HAP ont également été étudiés. Ces composés sont peu sensibles en UV et leur concentration doit être assez élevée afin de pouvoir les détecter, or ils se trouvent généralement à l'état de traces dans les matrices environnementales. Afin d'évaluer ces phases stationnaires comme matériau de préconcentration pour des HAP, une étude préliminaire a été menée. Dans le chapitre précédent des séparations de HAP ont été présentées sur des colonnes de butylacrylate ou d'hexylacrylate. Ces séparations ont été réalisées avec des mélanges à des concentrations de 100 à 500 ppm, pour des conditions d'injections habituelles. Afin de réaliser une étape de préconcentration les échantillons ont été dilués à 40ppm dans de l'eau purifiée. Le milieu de l'échantillon contient alors 25% d'acétonitrile, pour pouvoir bien solubiliser ces composés apolaires et éviter leur adsorption sur les parois des flacons. La Figure 85 présente des électrophorégrammes issus d'un mélange dilué de neuf HAP à la concentration de 40 ppm après avoir subi une injection directe et 8 minutes de percolation.

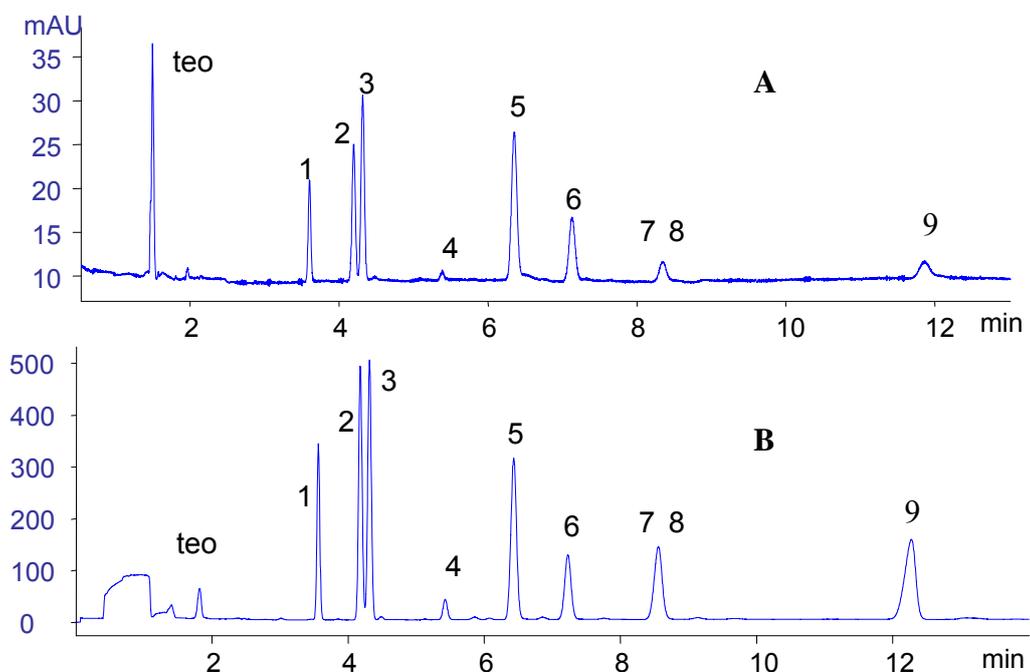


Figure 85 : Electrophérogrammes d'un mélange dilué de 9 HAP à la concentration de 40 ppm dans un milieu aqueux contenant 25 % d'acétonitrile. Séparation sous 30 kV à 25 °C avec une phase mobile constituée d'un mélange acétonitrile - tampon acétate, 5mM, pH 7,1 (80:20, v/v). Colonne à base

d'hexylacrylate, longueur de la phase monolithique : 27 cm, longueur totale du capillaire : 35,5 cm. Electrophorégramme **A** : injection électrocinétique sous 5 kV, pendant 5 sec. Electrophorégramme **B** : préconcentration sous 8 bars pendant 8 minutes. Composés : teo : formamide, 1 : naphthalène, 2 : acénaphthylène, 3 : fluorène, 4 : anthracène, 5 : fluoranthène, 6 : pyrène, 7 : benzo(a)anthracène, 8 : chrysène), 9 : benzoapyrène.

Aucune perte significative en résolution n'est observable entre les deux séparations présentées sur la Figure 85. L'efficacité moyenne des pics sur cette colonne à base de butylacrylate est de l'ordre de 130 à 150 000 plateaux/m en moyenne, sans préconcentration et de l'ordre de 110 000 plateaux/m avec une étape de préconcentration. L'évaluation du FES mesuré par l'aire corrigée des pics et est compris entre 20 et 95 selon les composés. En utilisant la hauteur des pics, le FES(h) est estimé entre 20 et 85 selon les composés. Notons que le FES est plus important pour les composés dont le facteur de rétention est le plus important. Ces résultats sont en bon accord avec un mécanisme de préconcentration selon l'affinité des composés avec la phase stationnaire, ce qui signifie que les composés les moins retenus ont fui lors de la percolation. Etant donné que l'échantillon est composé d'un pourcentage non négligeable en acétonitrile, 25%, il est possible que les HAP les moins hydrophobes du mélange aient été entraînés lors de cette phase de percolation et que le rendement de préconcentration soit alors inférieur à 100%.

Ces travaux démontrent bien la possibilité d'obtenir une réelle préconcentration en tête de colonne associée à une séparation efficace et bien résolue. Cependant, il est difficile de déterminer la longueur d'onde la plus appropriée pour un tel mélange de HAP. En effet, ceux-ci présentent des maxima d'absorption très divers en UV, ce qui peut engendrer des erreurs sur la détermination de facteur d'enrichissement pour certains composés. Cependant, une seule longueur d'onde, 200 nm, a été fixée pour l'estimation des facteurs de préconcentration quel que soit le composé.

### *5. 3. 2 Les pesticides et les acides aminés*

D'autres composés de nature diverse, des pesticides et leurs métabolites, des acides aminés, ont été préconcentrés en tête de colonne puis séparés. Ces expériences exploratoires ont permis de montrer la grande polyvalence de ces phases quant à leur aptitude à préconcentrer des composés d'hydrophobie variées. La Figure 86 présente les électrophorégrammes obtenus selon une injection directe, 3 kV – 3 sec et après percolation sous 8 bars, 8 minutes.

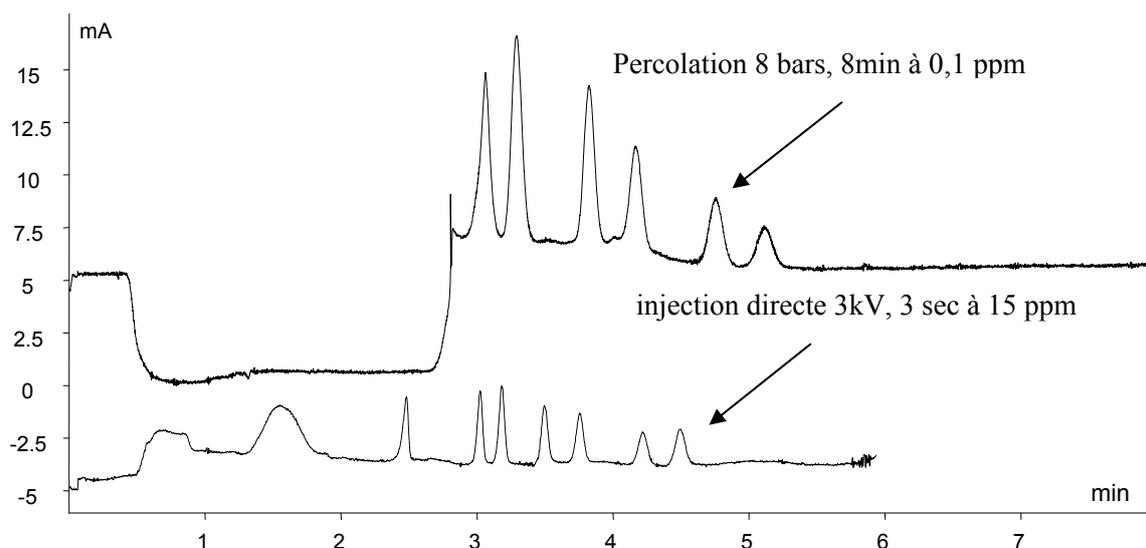


Figure 86 : Electrophéogrammes d'un mélange de pesticides et de leurs métabolites à 15 ppm et d'un mélange à 0.1 ppm. Séparation à 15kV, phase mobile : acétonitrile-tampon phosphate 5mM, pH=7,1 (80:20, v/v). Composés suivant l'ordre d'élution : formamide, DIA, DEA, atrazine, simazine, terbutylazine, terbutryne, échantillon dans du méthanol pour le mélange à 15 ppm et dilué dans l'eau pure pour celui à 0,1ppm.

Cette application démontre également la possibilité de préconcentrer significativement puis séparer des composés peu hydrophobes en tête de colonne sans pour autant détériorer des caractéristiques séparatives telles que l'efficacité et la résolution. Pour cet exemple, les facteurs de préconcentration présentent des valeurs comprises entre 450 et 150 selon les composés lorsque l'aire corrigée des pics est utilisée. Lorsque la hauteur est employée pour déterminer les facteurs de préconcentration, alors leurs valeurs sont comprises entre 115 et 270.

Nous nous sommes ensuite intéressés à un autre type d'application, des dérivés phénylthiohydantoïnes d'acides aminés (PTH-acides aminés). La Figure 87 présente la superposition de deux électrophorégrammes issus d'un même échantillon d'acide aminé, l'alanine, à 50 ppm. Une injection électrocinétique usuelle ainsi qu'une préconcentration sous 8 bars pendant 30 secondes y sont représentés. Un gain en sensibilité d'un facteur 10 a été déterminé en comparant les hauteurs de pic, 15 en comparant les aires corrigées.

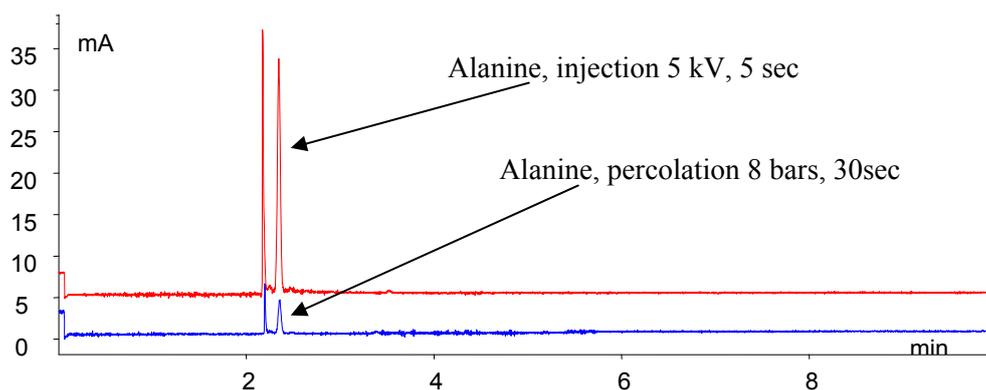


Figure 87 : Electrophérogrammes de l'alanine à 50 ppm et à 0.1 ppm. Séparation à 20 kV, phase mobile : acétonitrile-tampon borate à 5mM, pH= 9.2, (80:20, v/v). Composés : marqueur de FEO : formamide, alanine-PTH, échantillon préparé dans de l'eau pure.

L'application à des composés d'origine biologique non dérivé permettrait de déterminer le potentiel et l'intérêt des phases monolithiques pour la préconcentration et la séparation dans des domaines tels que la protéomique.

## 6. Conclusion

L'importance d'une étape de traitement de l'échantillon, telle que la préconcentration en ligne, lors d'analyse sur des systèmes miniaturisés a souvent été mise en exergue. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés tant dans le but d'évaluer la capacité de nos phases que de développer une méthode qui puisse être compatible avec des échantillons aux caractéristiques physico-chimiques variées. La méthode choisie favorise les interactions chromatographiques entre la phase stationnaire et les composés par le choix d'un milieu de l'échantillon peu éluant. Dans ces conditions, l'affinité du composé pour la phase stationnaire est exacerbée et permet de l'enrichir en tête de colonne.

Les travaux effectués ont porté sur des composés tests moyennement hydrophobes, les 2- et 3-chlorophénols et les résultats obtenus ont permis de déterminer leur concentration minimale détectable, à 0,4ppb pour le 3-chlorophénol. Des facteurs d'augmentation du signal de l'ordre de 18 000 ont ainsi pu être déterminés pour le 3-chlorophénol. Pour certains composés étudiés de façon exploratoire, les HAP, les résultats sont prometteurs mais demandent de mieux étudier le milieu de l'échantillon. Cependant, l'inconvénient majeur de la méthode utilisée reste les temps très longs de percolation, une alternative consiste à utiliser l'injection électrocinétique qui permet d'injecter des volumes plus importants que l'injection hydrodynamique lorsque le capillaire est rempli par une phase stationnaire.

## 7. Références bibliographiques

- [1] M. Bedair, Z. El Rassi, *Electrophoresis* 23 (2002) 2938.
- [2] J.L. Beckers, P. Bocek, *Electrophoresis* 21 (2000) 2747.
- [3] D.M. Osbourn, D.J. Weiss, C.E. Lunte, *Electrophoresis* 21 (2000) 2768.
- [4] J.P. Quirino, S. Terabe, *Science* 282 (1998) 465.
- [5] M.-C. Hennion, V. Pichon, *Environmental Science Technology* 28 (1994) 576A.
- [6] D.A. Stead, R.G. Reid, R.B. Taylor, *Journal of Chromatography A* 798 (1998) 259.
- [7] T. Tegeler, Z.E. Rassi, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 3365.
- [8] J.P. Quirino, M.T. Dulay, B.D. Bennett, R.N. Zare, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 5539.
- [9] J.P. Quirino, M.T. Dulay, R.N. Zare, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 5557.
- [10] Y. Zhang, J. Zhu, L. Zhang, W. Zhang, *Analytical Chemistry* 72 (2000) 5744.
- [11] G. Ping, Y. Zhang, W. Zhang, L. Zhang, L. Zhang, P. Schmitt-Kopplin, A. Kettrup, *Electrophoresis* 25 (2004) 421.

## CHAPITRE 5 : ADAPTATION DES TECHNOLOGIES ET METHODES DEVELOPPEES EN CAPILLAIRE AU FORMAT MICROSYSTEME.

### 1. Introduction

L'évolution des systèmes analytiques vers la miniaturisation a engendré le développement des formats microsystèmes dès la deuxième moitié des années 90. Cette nouvelle génération de systèmes miniaturisés utilise majoritairement des techniques électrophorétiques et semble ouvrir une nouvelle voie face à certains défis des sciences analytiques. En effet, ces dispositifs offrent la possibilité de réaliser des analyses dans des délais très courts en consommant de faibles quantités d'échantillons, la miniaturisation permettant de diminuer de façon considérable les temps d'analyse. La diminution des quantités nécessaires de réactifs, tels que des enzymes, des récepteurs ou des anticorps, permet la mise en œuvre de réactions spécifiques tout en maintenant des coûts d'analyse relativement bas. Un des objectifs des microsystèmes analytiques est d'intégrer les différentes étapes de la chaîne analytique, du prétraitement des analytes à leur séparation et leur détection, dans un très petit volume, entièrement automatisé.

Les techniques séparatives généralement mises en œuvre dans les microsystèmes sont issues de l'électrophorèse de zone en milieu libre. Bien que cette approche électrophorétique donne de bonnes efficacités séparatives pour les composés chargés, la séparation de composés neutres reste un problème. Pour le surmonter il est indispensable d'apporter des mécanismes de séparation supplémentaires tels que la rétention sur une phase stationnaire. Cet apport de sélectivité peut donc être acquis avec une approche électrochromatographique. De plus, l'introduction plus ou moins partielle d'une phase stationnaire dans le canal séparatif permettrait de diversifier les étapes analytiques mises en œuvre.

Or, comme nous l'avons rappelé dans le chapitre 1, la plupart des phases stationnaires développées commercialement sont des phases particulières dont l'introduction et l'immobilisation dans des microcanaux ne sont pas aisées, bien que certaines applications aient été développées sur des microsystèmes. Une autre solution consiste à réaliser des phases greffées aux parois des canaux, mais là encore, des limitations importantes ont été mises en évidence. Les phases monolithiques photopolymérisées, elles, sont simples à introduire et la localisation de la zone polymérisée est modulable selon les besoins analytiques. C'est

pourquoi ce type de phases stationnaires est très bien adapté à ce format séparatif, en plus de leurs très bonnes performances séparatives.

Après avoir développé et évalué nos phases monolithiques pour la séparation et la préconcentration en format capillaire, la dernière étape a consisté à transposer et adapter ces travaux au format microsystème. Un autre objectif a été le développement de phases stationnaires spécifiques permettant de conjuguer préconcentration et extraction sélective, nous en présenterons les premiers développements et résultats.

## 2. Mise en oeuvre et adaptation du procédé de synthèse

### 2.1 Caractéristiques des microsystèmes

Le premier matériau à avoir été utilisé pour fabriquer les microsystèmes était le verre. Il présente l'avantage d'être optiquement transparent et permet de générer facilement un flux électroosmotique. De plus, ses propriétés de surface ont été étudiées et sa fabrication se fait selon les techniques de photolithographies utilisées dans l'industrie microélectronique. Cependant, ces techniques de fabrication comportent quelques difficultés de mise en oeuvre et dans certains cas, les analytes peuvent s'adsorber sur les parois en verre chargées négativement. Ainsi, l'émergence d'autres matériaux tels que le polyméthylméthacrylate (PMMA) ou encore le polydiméthylsiloxane (PDMS) dont la fabrication est plus simple et le coût moins élevé a été observée. Ces matériaux ont d'ailleurs démontré leur potentiel pour des séparations en électrophorèse de zone, en milieu aqueux. Cependant, l'utilisation de milieux hydroorganiques, nécessaire en ECC, ne semble pas être compatible avec des matériaux tels que le PDMS. C'est pourquoi les microsystèmes utilisés lors de ces travaux sont à base de verre borosilicaté. Leurs caractéristiques dimensionnelles sont résumées dans l'annexe 1.

La majorité des microsystèmes analytiques utilisés jusqu'à présent, dont ceux utilisés lors de ces travaux, mettent en oeuvre des phénomènes électrocinétiques. Une séparation électrocinétique sur microsystème comporte deux étapes : la première consiste au chargement de l'échantillon dans le canal séparatif et la seconde à la séparation proprement dite. La variation des potentiels électriques appliqués entre ces deux étapes provoque l'injection de l'échantillon dans le canal séparatif.

Contrairement à l'électrophorèse capillaire où l'injection peut se faire de façon hydrodynamique ou électrocinétique, l'injection dans les microsystèmes se fait dans la grande

majorité des cas par application d'une différence de potentiel. L'injection électrocinétique dans les microsystèmes se déroule différemment d'une injection électrocinétique en électrophorèse capillaire, qui peut se rapporter à une approche en une dimension. Dans les microsystèmes, la « chambre d'injection » se trouvant à l'intersection de deux canaux, le flux de l'échantillon ne peut pas être modélisé par une approche en une dimension. Les différentes techniques d'injection existantes dans les microsystèmes sont l'injection en mode pincé et celle en mode « gated » (annexe 2). Lors de l'injection en mode pincé, le volume d'échantillon injecté est indépendant du temps de la phase de chargement. Le volume injecté est donc approximativement toujours le même. Au contraire, le volume d'échantillon injecté lors de l'injection en mode « gated » dépend du temps de la phase de chargement. Il est donc possible de moduler le volume d'échantillon injecté. Différentes géométries de « chambre d'injection » peuvent être utilisées : une forme en croix ou simple cross (la plus courante), une forme en double T...

Concernant la détection, le mode le plus utilisé dans les microsystèmes est la fluorescence induite par laser (LIF) qui présente une forte sensibilité. Cependant ce mode de détection présente quelques inconvénients notamment liés au fait que la majorité des composés chimiques ne fluoresce pas sous leur forme native. Cependant des méthodes de dérivation existent et peuvent être mises en œuvre afin de marquer les composés. D'autres modes de détection peuvent être utilisés : la spectrométrie de masse, la spectrométrie Raman, la détection électrochimique, et plus rarement la détection par absorbance UV. Au laboratoire, notre dispositif permet une détection par fluorescence grâce à l'utilisation d'un microscope inversé Olympus, équipé d'une lampe à mercure possédant différents cubes filtres utilisés pour fixer la gamme de longueurs d'onde d'excitation.

## **2.2 Adaptation des procédures développées en format capillaire au format microsysteme**

Le protocole de synthèse de la phase stationnaire en capillaire, décrit dans le chapitre 2, a nécessité peu d'adaptation pour sa transposition au format microsysteme. Ce procédé comporte toujours deux étapes, tout d'abord le prétraitement des canaux puis la polymérisation in situ à partir du mélange de monomères. Le mélange de monomères n'a pas subi de variation quant à sa composition. Il est composé d'hexylacrylate, de butanedioldiacrylate et d'acide 2-acrylamido-2-méthyl-1-propanesulfonique. Les étapes de prétraitement du capillaire, optimisées et décrites dans le chapitre 2, ont été adaptées au traitement de surface des canaux des microsystèmes afin de permettre un bon attachement du

polymère aux parois des canaux. En effet, il est difficile d'obtenir un système qui permet de boucher les puits de façon hermétique sans les contaminer. C'est pourquoi ces protocoles ont nécessité quelques modifications. Le traitement à chaud est toujours réalisé avec de la soude 1 M mais seulement pendant une heure à 60°C, ensuite un traitement à chaud est mené par de l'acide chlorhydrique 0,1 M là aussi seulement pendant une heure à 60°C. Enfin, la fonctionnalisation à chaud se déroule pendant deux heures à 60°C, au lieu de 4 heures en capillaire. Ainsi, la plupart des temps de réaction ont été réduits afin d'éviter tout assèchement des puits et des canaux.

Après avoir prétraité les canaux d'un microsystème, celui-ci est ensuite rempli par le mélange réactionnel à polymériser. Afin de limiter la formation du monolithe au canal séparatif, des caches sont disposés sur les zones du microsystème où la polymérisation n'est pas souhaitée, c'est-à-dire dans les différents réservoirs, dans les canaux menant de ceux-ci à la croix, dans la croix servant de dispositif d'injection. La Figure 89 montre l'allure d'une phase stationnaire ainsi synthétisée. La localisation de la phase stationnaire dans le microsystème est reportée en grisé sur la Figure 88.

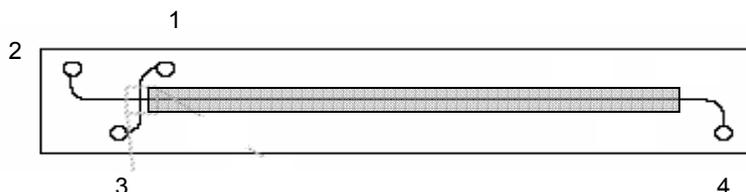


Figure 88 : Schéma d'un microsystème comportant une phase stationnaire monolithique dans le grand canal. Les puits sont numérotés de 1 à 4, le canal reliant les puits 1 et 3 est le canal d'injection et celui reliant les puits 2 et 4 est le canal de séparation (Annexes 2 et 3). La partie grisée représente la part du canal irradiée sous UV.

Le mélange réactionnel du microsystème est mis à réagir sous irradiation UV à 365 nm avec une énergie totale appliquée de 8 J/cm<sup>2</sup>. Lors de cette étape, on effectue la polymérisation in situ par initiation radicalaire photochimique de la phase stationnaire monolithique. La phase stationnaire ainsi obtenue est immédiatement rincée par un mélange acétonitrile/tampon phosphate 5 mM pH 6,8 (80/20, v/v) via l'application d'un champ électrique.

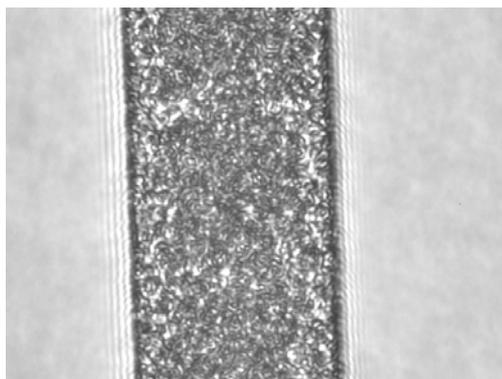


Figure 89 : Phase stationnaire monolithique synthétisée dans le canal de séparation d'un microsystème (gros 40 fois, largeur du canal = 50  $\mu\text{m}$ )

Les caractéristiques spatiales des trois phases stationnaires synthétisées sont reportées dans le Tableau 13 et sont différentes d'un microsystème à l'autre. De plus, on observe une inhomogénéité de la phase stationnaire en début et en fin de chaque zone monolithique sur quelques millimètres. Ceci est principalement dû à l'utilisation de caches dont l'adaptation sur les microsystèmes n'est pas encore parfaite. En effet ceux-ci peuvent se soulever lors de la polymérisation et laisser le rayonnement pénétrer la zone censée être protégée. Certaines améliorations peuvent être apportées en utilisant un masque véritablement adapté à cette forme de microsystèmes, et ne laissant accessible que la zone à polymériser.

Phase stationnaire du microsystème	Longueur totale de la phase stationnaire (cm)	$l_i$ (cm)	$l_f$ (cm)
1	7,4	0,5	7,9
2	7,3	0,7	8
3	7,9	0,1	8

Tableau 13 : Caractéristiques spatiales des différentes phases stationnaires synthétisées (le zéro étant situé au niveau de la chambre d'injection),  $l_i$  représentant la distance entre la chambre d'injection et le début de la phase stationnaire monolithique et  $l_f$  la distance entre la chambre d'injection et l'extrémité de la phase stationnaire monolithique

Les observations réalisées à l'aide d'un microscope optique montrent une bonne homogénéité du polymère d'une colonne à l'autre et sur l'ensemble de la longueur des canaux polymérisés, à part les extrémités. La synthèse dans des microcanaux produit donc un matériau poreux, homogène. Il reste maintenant à déterminer si ce polymère a des propriétés séparatives suffisantes pour pouvoir être utilisé en tant que phase stationnaire et produire des séparations performantes.

## 3. Séparations analytiques d'hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP) dans les microsystèmes

### 3.1 Description des composés étudiés

Afin de tester sur microsystèmes analytiques les performances séparatives de la phase stationnaire ainsi polymérisée, nous nous sommes intéressés à la séparation d'un mélange test d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Le montage utilisé lors de la séparation est décrit en annexe 1.

Le choix des composés à séparer s'est porté sur les HAP pour différentes raisons. Tout d'abord, il s'agit de composés neutres et hydrophobes dont la séparation efficace a déjà été mise au point en ECC sur le même type de phase stationnaire que celle utilisée pour ces travaux (chapitre 3 et 4). Puisqu'ils sont neutres, ils ne seront séparés que du fait de leur différence de rétention vis-à-vis de la phase stationnaire. Plus particulièrement, le principal avantage de ces composés est leur fluorescence naturelle aux longueurs d'ondes imposées par le détecteur utilisé ( $\lambda_{\text{ex}}$  de 310/390 nm). Il n'est donc pas nécessaire de passer par une étape de dérivation. Notre montage microfluidique ne dispose pas de laser mais d'une lampe à mercure et de filtres permettant de choisir la gamme de longueurs d'ondes utilisées. Le mélange étudié est constitué d'anthracène ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$  de 253/402 nm), de fluoranthène (360/460 nm), de benzo(a)anthracène (288/390 nm), de benzo(k)fluoranthène (308/414 nm) et de benzo(a)pyrène (296/408 nm).

La Figure 90 montre la première séparation obtenue dans le microsystème n°1. Le temps d'analyse est d'environ 9 min pour une longueur utile du canal de 2,5 cm. La résolution entre les pics de benzo(k)fluoranthène et de benzo(a)pyrène n'est pas tout à fait satisfaisante et les intensités des pics d'anthracène et de benzo(a)anthracène sont très faibles par rapport à celle des autres composés. Néanmoins, la séparation est réalisée en moins de dix minutes, présentant ainsi un temps d'analyse inférieur aux séparations effectuées en capillaire. Cette séparation a été faite dans les trois microsystèmes précédemment décrits. Pour des conditions expérimentales identiques, l'ordre d'élution reste le même mais les temps de rétention et les efficacités sont différents. Cette différence de comportement peut être expliquée par des variations du polymère et de son homogénéité pour chacune des phases stationnaires étudiées.

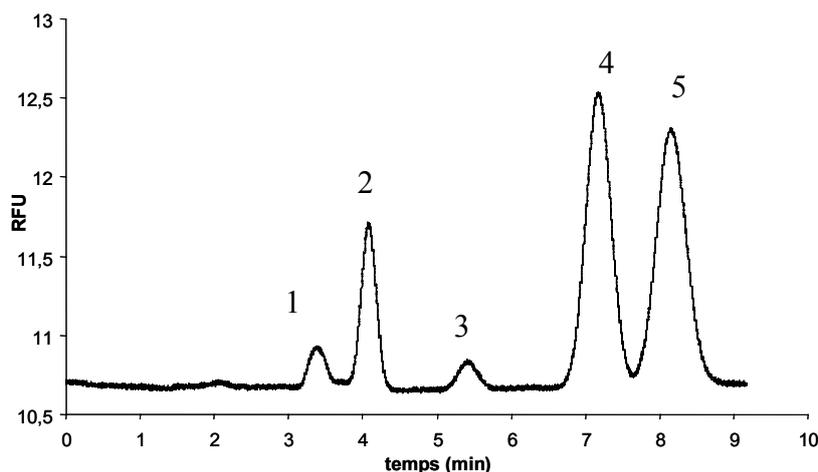


Figure 90 : Séparation du mélange de 5 HAP en microsystème séparatif. Phase mobile : acétonitrile - tampon phosphate 5mM, pH 6,8 (80:20, v/v), force ionique =  $1,75 \cdot 10^{-3}$  M. Microsystème n°1 : voir Tableau 1. Injection en mode pincé : 1 : -790 V, 2 : 500 V, 3 : 600 V, 4 : 550 V. Volume injecté : 50 pL. Champ électrique :  $91 \text{ V.cm}^{-1}$ . Détection par fluorescence  $\lambda_{\text{exc}} = 310\text{-}390 \text{ nm}$  à 2,5 cm, fréquence d'acquisition 15pts/s. Largeur de la fenêtre de détection 50  $\mu\text{m}$ . Echantillon injecté : (1) anthracène  $41,9 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  ; (2) fluoranthène  $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  ; (3) benzo(a)anthracène  $6,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  ; (4) benzo(k)fluoranthène  $1,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  ; (5) benzo(a)pyrène  $1,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  dans l'acétonitrile.

Les paramètres de cette séparation tels que le mode d'injection et la valeur des potentiels ont été déterminés pour des raisons pratiques. En effet, le mode pincé présente moins de contraintes que le mode dit « gated ». Le mode pincé permet d'obtenir des volumes d'injection du même ordre de grandeur, tandis que le mode « gated » permet d'injecter des volumes plus ou moins importants selon la durée de l'application de certains potentiels. Quant au choix des potentiels appliqués pour ce type d'injection, il a fait l'objet d'une étude préalable pour qu'aucune fuite (diffusion non souhaitée de l'échantillon) ne vienne troubler la séparation. Ce choix est limité par le potentiostat utilisé dont le voltage maximal ne peut pas dépasser 3000 V. Dans les études suivantes un potentiostat délivrant un voltage maximal de 6000 V a pu être utilisé.

### 3.2 Optimisation des séparations observées

Les conditions expérimentales utilisées lors des premières séparations nécessitent néanmoins quelques améliorations. En effet, les efficacités et la résolution méritent d'être optimisées ainsi que le temps d'analyse qui est un peu long. Pour ce faire, l'étude de plusieurs paramètres expérimentaux a été entreprise tels que le champ électrique appliqué lors de la séparation, la taille de la fenêtre de détection et sa position sur le canal de séparation. Ces études ont été effectuées avec le microsystème n°3 (caractéristiques résumées dans le Tableau 13).

### 3. 2. 1 Influence du champ électrique sur la séparation

Dans un premier temps, nous avons étudié l'influence du champ électrique calculé comme indiqué dans l'annexe 3 (de 91 à 247 V.cm<sup>-1</sup>) appliqué dans le canal de séparation (de la zone d'injection au puits 4, précisé sur la Figure 88) sur le temps de rétention, l'efficacité et la résolution de la séparation des cinq HAP précédemment cités. Les résultats obtenus sont présentés dans les Tableau 14 et 15.

E (V.cm <sup>-1</sup> )	Anthracène (1)		Fluoranthène (2)		Benzo(a)anthracène (3)		Benzo(k)fluoranthène (4)		Benzo(a)pyrène (5)	
	tr (min)	N/m	tr (min)	N/m	tr (min)	N/m	tr (min)	N/m	tr (min)	N/m
91	3,18	44 700	4,04	103 800	5,77	80 300	8,32	99 200	9,81	89 700
124	2,28	57 600	2,86	113 500	4,06	107 200	5,68	138 900	6,58	128 300
227	1,66	123 100	2,12	159 200	3,09	176 600	4,32	186 300	4,91	168 700
247	1,16	131 800	1,45	172 000	2,02	188 100	2,78	169 700	3,21	180 700

Tableau 14

E (V.cm <sup>-1</sup> )	R <sub>12</sub>	R <sub>23</sub>	R <sub>34</sub>	R <sub>45</sub>
91	1,9	3,2	3,3	1,5
124	2,0	3,5	3,6	1,6
227	2,9	4,7	4,4	1,7
247	2,7	4,3	4,1	1,8

Tableau 15

Tableau 14 et 15 : Evolution de la résolution, du temps de rétention et de l'efficacité de chacun des composés en fonction du champ électrique appliqué. Microsystème n°3 : voir Tableau 13. Phase mobile : acétonitrile - tampon phosphate 5mM, pH 6,8 (80:20 v/v), force ionique = 1,75.10<sup>-3</sup> M. Injection en mode pincé : 1 : -790 V, 2 : 500 V, 3 : 600 V, 4 : 550 V. Volume injecté : 50 pL environ. Champ électrique de 91 à 247 V.cm<sup>-1</sup>. Détection par fluorescence  $\lambda_{exc}$  = 310-390 nm à 1,5 cm, fréquence d'acquisition 15pts/s. Largeur de la fenêtre de détection : 50  $\mu$ m.

Il est intéressant de remarquer que les champs électriques appliqués correspondent à des différences de potentiels (entre les puits 1 et 3, 2 et 4) dont le rapport est constant. Ce dernier est gardé constant pour ne pas générer de fuite de l'échantillon lors du passage à l'étape de la séparation.

Les résultats obtenus sur cette étude montrent que plus le champ électrique appliqué est élevé, plus le temps de rétention de chacun des composés et donc le temps d'analyse diminue, ce à quoi l'on pouvait s'attendre. De plus, l'efficacité des pics de chacun des composés et la résolution entre deux pics augmentent lorsque le champ électrique appliqué augmente. Ceci peut être expliqué par le fait que plus le champ électrique appliqué est élevé, plus le phénomène de diffusion est faible, ce qui entraîne une diminution de la largeur des pics et donc une augmentation de leur efficacité et de la résolution. Il est ainsi préférable de travailler avec le champ électrique le plus élevé possible. Lors de cette étude, le champ électrique appliqué ne dépasse pas  $247 \text{ V.cm}^{-1}$ , car le potentiostat utilisé ne nous permet pas d'atteindre des valeurs supérieures.

### 3.2.2 Influence de la largeur de la fenêtre de détection sur l'électrophorégramme expérimental

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux valeurs des temps de rétention des composés et à leur efficacité lorsque la largeur de la fenêtre de détection varie (de 0,05 à 0,20 cm). Les résultats obtenus sont présentés dans les Tableau 16 et 17.

Largeur de la fenêtre ( $\mu\text{m}$ )	Anthracène (1)		Fluoranthène (2)		Benzo(a)anthracène (3)		Benzo(k)fluoranthène (4)		Benzo(a)pyrène (5)	
	tr (min)	N/m	tr (min)	N/m	tr (min)	N/m	tr (min)	N/m	tr (min)	N/m
67	1,30	12 1600	1,60	202 500	2,18	181 300	2,95	207 300	3,38	205 300
50	1,21	78 200	1,51	144 400	2,10	153 300	2,87	175 500	3,27	178 300
17	1,22	62 400	1,53	129 100	2,18	112 800	3,00	160 700	3,43	163 900

Tableau 16

Largeur de la fenêtre ( $\mu\text{m}$ )	R <sub>12</sub>	R <sub>23</sub>	R <sub>34</sub>	R <sub>45</sub>
67	2,5	4,1	4,1	1,9
50	2,3	3,9	3,9	1,7
17	2,1	3,7	3,7	1,7

Tableau 17

Tableau 17 : Evolution de la résolution, du temps de rétention et de l'efficacité de chacun des composés en fonction de la largeur de la fenêtre de détection. Microsystème n°3 : voir Tableau 13. Phase mobile : acétonitrile - tampon phosphate 5mM, pH 6,8 (80:20, v/v), force ionique =  $1,75 \cdot 10^{-3}$  M. Injection en mode pincé : 1 : -790 V, 2 : 500 V, 3 : 600 V, 4 : 550 V. Volume injecté : 50 pL. Champ électrique : 247 V.cm<sup>-1</sup>. Détection par fluorescence  $\lambda_{\text{exc}} = 310\text{-}390$  nm à 1,5 cm, fréquence d'acquisition 15pts/s. Largeur de la fenêtre de détection de 17 à 67  $\mu\text{m}$ . Composition du mélange de HAP (dans l'acétonitrile) : anthracène  $36,2 \cdot 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> ; fluoranthène  $1,3 \cdot 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> ; benzo(a)anthracène  $11,4 \cdot 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> ; benzo(k)fluoranthène  $1,6 \cdot 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> ; benzo(a)pyrène  $0,8 \cdot 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>.

Les variations observées pour les temps de rétention ne paraissent pas significatives. Elles peuvent toutefois s'expliquer par le fait que le centre de la fenêtre de détection a pu être déplacé lors de la modification de sa taille entre deux analyses et par les variations de la répétabilité de l'injection d'une analyse à l'autre.

En ce qui concerne la résolution, les différences observées ne permettent pas de dégager de tendance significative. L'efficacité de chacun des composés diminue lorsque la largeur de la fenêtre de détection diminue. Cette diminution provient de la constance de la fréquence d'acquisition au cours de cette étude. Ainsi, lorsque la largeur de la fenêtre de détection diminue, le nombre de points d'acquisition enregistré par le détecteur durant le temps de passage du composé diminue. En effet, plus la largeur de la fenêtre est faible, moins le composé met de temps à passer devant celle-ci. Le pic d'un composé étant alors défini avec moins de points, l'efficacité du système diminue. Les résultats de cette étude permettent de conclure que si la fréquence d'acquisition utilisée est de 15 points par seconde, alors la largeur de la fenêtre de détection ne doit pas être trop faible afin de conserver des efficacités suffisantes. C'est pourquoi un compromis entre la largeur de la fenêtre de détection et la fréquence d'acquisition doit être envisagé pour maintenir des efficacités satisfaisantes. Nous

avons donc choisi une largeur de fenêtre de 50  $\mu\text{m}$  avec une fréquence d'acquisition de 15 points par seconde afin d'obtenir des efficacités suffisantes.

La répétabilité des analyses a également fait l'objet d'une étude. La séparation de deux composés a été répétée cinq fois de suite dans des conditions identiques et nous a permis d'évaluer la répétabilité de deux paramètres : le temps de rétention et l'efficacité du système. Les résultats sont donnés dans le Tableau 18 :

Analyses	Fluoranthène		Benzo(k)fluoranthène	
	tr	N/m	Tr	N/m
moyenne	1,40	179 840	2,66	174 547
écart type	0,05	476 83	0,10	23 851
CV (%)	3,35	26, 51	3,84	13,66

Tableau 18 : Répétabilité des temps de rétention et des efficacités effectuée sur cinq analyses en microsystème.

Microsystème n°3 : voir Tableau 13. Echantillon : mélange de fluoranthène ( $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) et de benzo(k)fluoranthène ( $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ) préparé dans l'acétonitrile. Electrolyte : tampon phosphate pH 6,8 en milieu eau-acétonitrile (80/20, v/v), force ionique =  $1,75 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ . Injection en mode pincé : 1 : -790 V, 2 : 500 V, 3 : 600 V, 4 : 550 V. Volume injecté : 50 pL. Champ électrique :  $247 \text{ V.cm}^{-1}$ . Détection par fluorescence  $\lambda_{\text{exc}} = 310\text{-}390 \text{ nm}$  à 1,5 cm, fréquence d'acquisition 15pts/s. Largeur de la fenêtre de détection de 50  $\mu\text{m}$ .

Le coefficient de variation observé lors du test de répétabilité des temps de rétention des composés est satisfaisant. En revanche, le coefficient de variation observé lors du test de répétabilité des efficacités paraît très élevé par rapport aux valeurs obtenues pour le même genre de test en électrophorèse capillaire (CV < 6%). Ce comportement peut s'expliquer par les variations du volume injecté pouvant provenir du mode d'injection manuel utilisé et du choix des potentiels de confinement.

### 3. 2. 3 Longueur utile

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'influence de la longueur sur laquelle s'effectue la séparation (longueur utile) des cinq HAP précédemment cités. Ce type d'étude est réalisable grâce aux caractéristiques du montage utilisé. En effet, il est possible de déplacer le microsystème en x, y par rapport au point de détection via la plateforme du microscope. Cette spécificité permet donc de déplacer à volonté le point de détection sur le canal de séparation et sur l'ensemble du microsystème. Les résultats sont donnés dans les Tableau 19 et les électrophérogrammes obtenus sont présentés sur la Figure 91.

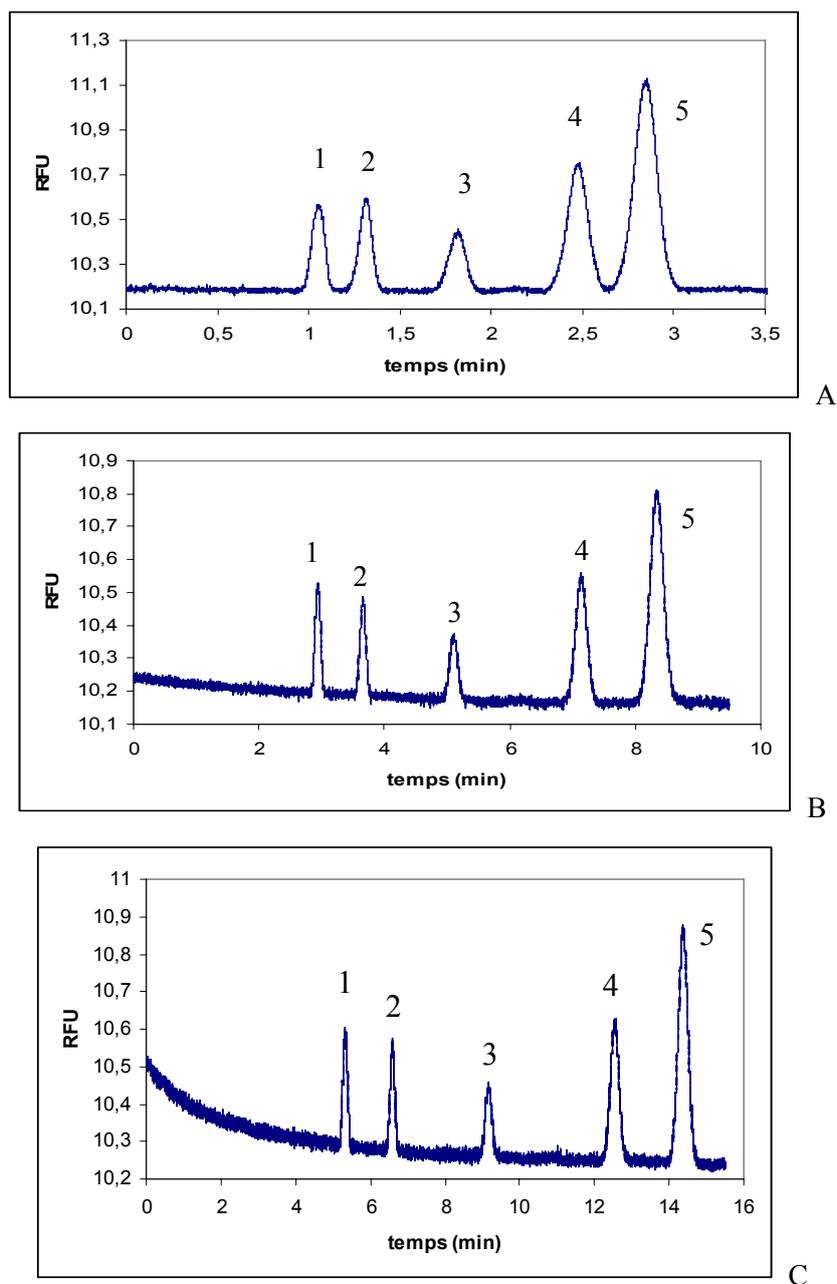


Figure 91 : Séparation du mélange de cinq HAP en fonction de la position de la fenêtre de détection. Microsystème n°3 : voir Tableau 13. Phase mobile : acétonitrile - tampon phosphate 5 mM, pH 6,8 (80:20, v/v), force ionique =  $1,75 \cdot 10^{-3}$  M. Champ électrique :  $247 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Injection en mode pincé. Volume injecté : 50 pL environ. Détection par fluorescence  $\lambda_{\text{exc}} = 310\text{-}390 \text{ nm}$  à 1,5 cm (A), 4 cm (B) et 6 cm (C), fréquence d'acquisition 15pts/s. Largeur de la fenêtre de détection : 50  $\mu\text{m}$ . Ordre d'élution : (1) anthracène, (2) fluoranthène, (3) benzo(a)anthracène, (4) benzo(k)fluoranthène, (5) benzo(a)pyrène).

En augmentant la longueur de séparation, on augmente la résolution, le nombre de plateaux mais aussi le temps d'analyse. Les Tableau 19 et 20 présentent les grandeurs chromatographiques mesurées à partir de ces trois séparations obtenues à 1,5 4 et 6 cm de la zone d'injection.

	Anthracène		Fluoranthène		Benzo(a)anthracène		Benzo(k)fluoranthène		Benzo(a)pyrène	
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
Détection à (cm)	tr (min)	N/m	tr (min)	N/m	tr (min)	N/m	tr (min)	N/m	tr (min)	N/m
1,5	1,06	61200	1,32	106667	1,82	102867	2,48	140667	2,85	150867
4	2,94	107550	3,65	168725	5,11	155200	7,14	167725	8,35	158625
6	5,34	121157	6,59	213500	9,16	184917	12,56	220467	14,37	220433

Tableau 19

Détection à (cm)	R <sub>12</sub>	R <sub>23</sub>	R <sub>34</sub>	R <sub>45</sub>
1,5	1,9	3,2	3,3	1,6
4	3,9	6,7	6,7	3,2
6	5,2	8,9	8,7	3,9

Tableau 20

Tableau 20 : Evolution de la résolution, du temps de rétention et de l'efficacité de chacun des composés en fonction de la position de la fenêtre de détection. Microsystème n°3 : voir Tableau 13. Electrolyte : acétonitrile - tampon phosphate 5 mM, pH 6,8 (80:20, v/v), force ionique =  $1,75 \cdot 10^{-3}$  M. Injection en mode pincé : 1 : -790 V, 2 : 500 V, 3 : 600 V, 4 : 550 V. Volume injecté : 50 pL. Champs électrique :  $247 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Détection par fluorescence  $\lambda_{\text{exc}} = 310\text{-}390 \text{ nm}$  à 1,5 cm, fréquence d'acquisition 15pts/s. Largeur de la fenêtre de détection de 50  $\mu\text{m}$ . Composition du mélange de HAP (dans l'acétonitrile) : anthracène  $36,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ; fluoranthène  $1,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ; benzo(a)anthracène  $11,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ; benzo(k)fluoranthène  $1,6 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ; benzo(a)pyrène  $0,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Le temps de rétention de chacun des composés et la résolution entre les pics augmentent lorsque la longueur utile augmente, conformément à ce que l'on pouvait attendre. On observe donc un allongement du temps d'analyse et la résolution entre les pics augmente, de façon plus marquée pour les composés les plus retenus.

Les résultats présentés dans les Tableau 19 et 20 indiquent que l'efficacité (en N/m) de chacun des composés augmente significativement lorsque la longueur de séparation

augmente. Ce comportement n'est pas conforme avec ce à quoi l'on pouvait s'attendre, normalement le nombre de plateaux par mètre est constant quelle que soit la longueur de la colonne. La comparaison des efficacités, en nombre de plateaux par mètre, devrait ainsi conduire à l'obtention de valeurs similaires quelle que soit la longueur efficace. Or, les valeurs ont tendance à augmenter avec l'augmentation de la longueur de séparation. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées à partir de ces résultats. Tout d'abord, ce type de comportement peut être relié à des effets extra-colonnes pouvant se produire et modifier les valeurs des efficacités. Par ailleurs des observations ont montré que la phase stationnaire comporte des irrégularités à ses extrémités provoquant une variation certaine de son homogénéité.

L'évaluation des effets extra-colonnes a été menée à partir des résultats de cette étude. La relation permettant de les évaluer est la suivante :

$$\sigma_T^2 = \frac{t_R^2}{N_{app}} = \frac{t_R^2}{N_{réel}} + \sigma_{ext}^2$$

Où  $N_{réel}$  est le nombre de plateaux réel de la colonne,  $N_{app}$  le nombre de plateaux mesurés apparents,  $\sigma_T^2$  est la variance temporelle totale et  $\sigma_{ext}^2$  la variance due aux effets extra-colonnes.

Afin de vérifier la présence d'effets extra-colonne et d'évaluer leur influences, il nous faut tracer la droite  $\sigma_T^2$  en fonction de  $t_R^2$  ayant pour pente l'inverse du nombre de plateaux réel de la colonne et pour ordonnée à l'origine, la variance extra-colonne. Il en résulte une correction des effets extra-colonnes qui n'est pas négligeable car on trouve une efficacité réelle du même ordre de grandeur qu'en capillaire, soit environ 200 000 plateaux/m pour une vitesse analogue à celle du capillaire. Par ailleurs, étant donné que des effets extra-colonnes ont été mis en évidence, il faudrait parler d'efficacité apparente pour l'ensemble des résultats obtenus en microsysteme présentés dans les parties précédentes.

Il faudra donc réduire ces effets extra-colonnes dus en particulier à la portion du canal principal ne comportant pas de polymère entre la zone d'injection et le début de la colonne, 0,1 cm sur ce microsysteme.

### 3. 2. 4 Discussion sur l'optimisation de la séparation

L'optimisation de la séparation nécessiterait l'étude de nombreux autres paramètres, cependant nous pouvons déjà apporter quelques éléments permettant d'améliorer les performances des séparations effectuées. Ainsi, les études sur l'influence du champ électrique, de la largeur de la fenêtre de détection et de la longueur utile nous ont permis de définir des conditions expérimentales permettant de séparer cinq HAP en moins de quatre minutes avec une efficacité pour chacun des composés et une résolution entre les pics correctes. L'électrophérogramme de la Figure 92 illustre les résultats obtenus. Cette séparation est effectuée dans le microsystème n°3 sous un champ électrique de  $247 \text{ V.cm}^{-1}$  avec une détection à 1,5 cm pour limiter le temps d'analyse et une largeur de fenêtre de  $50 \mu\text{m}$  pour avoir de bonnes efficacités sachant que la fréquence d'acquisition utilisée est de 15 points par seconde. Cet électrophorégramme présente la séparation de ces 5 HAP en moins de 4 minutes avec des efficacités réelles de l'ordre de 200 000 plateaux réels /m.

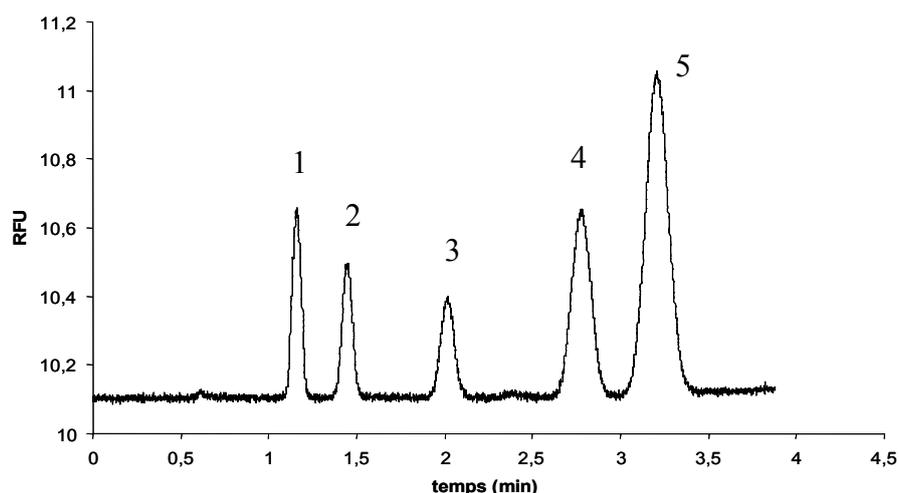


Figure 92 : Séparation optimisée du mélange de cinq HAP sur le microsystème n°3 : voir Tableau 13. Phase mobile : acétonitrile - tampon phosphate 5 mM, pH 6,8 (80:20, v/v), force ionique =  $1,75.10^{-3}$  M. Injection en mode pincé : 1 : -790 V, 2 : 500 V, 3 : 600 V, 4 : 550 V. Volume injecté : 50pL environ. Champ électrique :  $247 \text{ V.cm}^{-1}$ . Détection par fluorescence  $\lambda_{\text{exc}} = 310\text{-}390 \text{ nm}$  à 1,5 cm, fréquence d'acquisition 15pts/s. Largeur de la fenêtre de détection de  $50 \mu\text{m}$ . Composition du mélange de HAP (dans l'acétonitrile) : (1) anthracène  $36,2.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  ; (2) fluoranthène  $1,3.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  ; (3) benzo(a)anthracène  $11,4.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  ; (4) benzo(k)fluoranthène  $1,6.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  ; (5) benzo(a)pyrène  $0,8.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ .

Par ailleurs, une estimation approximative des vitesses électroosmotiques a été réalisée à partir des résultats du paragraphe 3. 2. 1, en faisant l'hypothèse, pour les HAP étudiés, d'un facteur de rétention identique en capillaire et en microsystème. Ces estimations permettent de tracer la courbe de van Deemter utilisant le nombre de plateaux réels du système séparatif. Cette courbe montre ainsi que les vitesses utilisées dans cette étude sont trop faibles par

rapport à des conditions analytiques optimales. Nous nous situons donc sur la partie la moins favorable de la courbe de van Deemter, la partie descendante, comme le montre la Figure 93 :

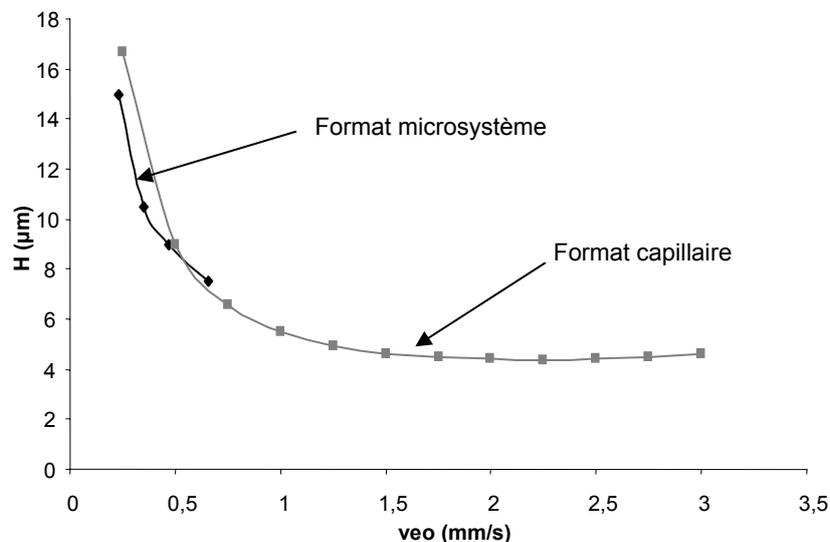


Figure 93 : Courbes de van Deemter obtenues à partir de colonnes monolithiques à base d'HA-BDDA. La courbe obtenue en capillaire est issue des coefficients moyens de van Deemter de l'ensemble des colonnes de l'étude sur l'énergie d'irradiation du chapitre 2.

Si le champ électrique appliqué pouvait être doublé alors les vitesses du FEO seraient également doublées, on atteindrait alors des vitesses comparables à celles obtenues en capillaire et donc des efficacités plus fortes que celles obtenues jusqu'à présent en microsystème. Nous nous trouverions alors dans les conditions optimales de ce type de microsystème pour la séparation de HAP.

## 4. Couplage des étapes : préconcentration et séparation

### 4.1 Mise en œuvre d'une étape de préconcentration dans des microsystèmes

Afin d'étudier la possibilité de mise en œuvre d'une phase de préconcentration dans ces microsystèmes, nous nous sommes d'abord intéressés à la préconcentration d'un échantillon composé d'un seul soluté, du fluoranthène de concentration  $0,075 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans un mélange eau-acétonitrile (75:25, v/v). Ces expériences ont été réalisées sur la phase stationnaire monolithique n°1. Le déroulement d'une telle analyse comprend deux étapes : la première consiste en l'injection et la préconcentration de l'échantillon sur la phase stationnaire et la seconde consiste en l'élution de l'analyte ainsi préconcentré.

La première étape est schématisée sur la Figure 94. Lors de cette première étape une différence de potentiel est appliquée entre les réservoirs 1 et 4 pour permettre à l'échantillon

placé dans le réservoir 1 de se concentrer en tête de colonne. En effet, l'échantillon étant hydrophobe et la force éluante de la matrice de l'échantillon, qui contient 25% d'acétonitrile afin de bien solubiliser le soluté, étant faible, le composé se fixe en tête de colonne et n'est pas élué.

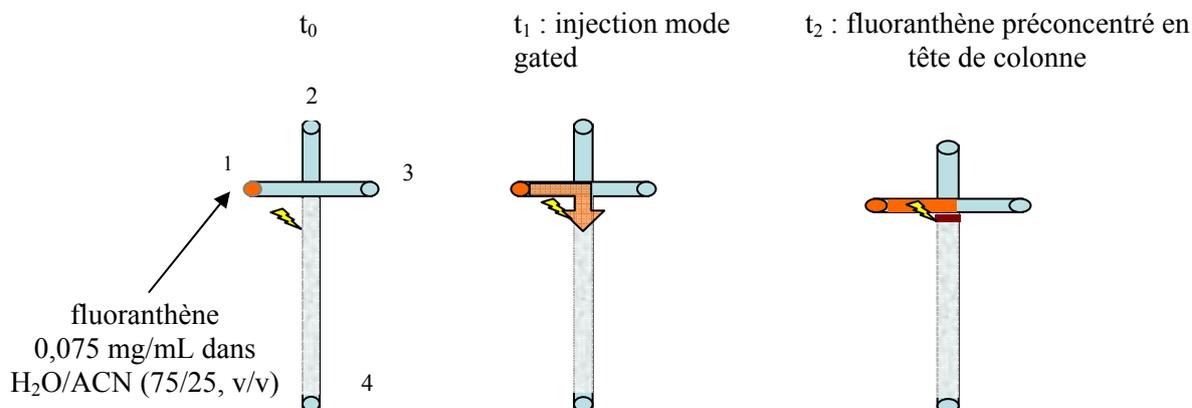


Figure 94 : Schémas résumant l'étape d'injection et de préconcentration de l'échantillon analysé

La Figure 95 montre l'évolution du signal de fluorescence observé en tête de colonne en fonction du temps de préconcentration. Le signal augmente lorsque le temps de préconcentration augmente, ce qui est conforme au modèle de rétention décrit. En effet, plus le temps de préconcentration est long, plus le volume d'échantillon injecté augmente et l'échantillon se fixant en tête de colonne entraîne une augmentation du signal de fluorescence, mesuré en ce point. Ce signal augmente jusqu'à atteindre un plateau, la phase stationnaire étant alors saturée en composé celui-ci ne sera plus retenu au niveau du point de mesure. Dans notre cas, le temps de la phase de préconcentration n'est pas assez long pour observer ce plateau de saturation de la phase stationnaire.

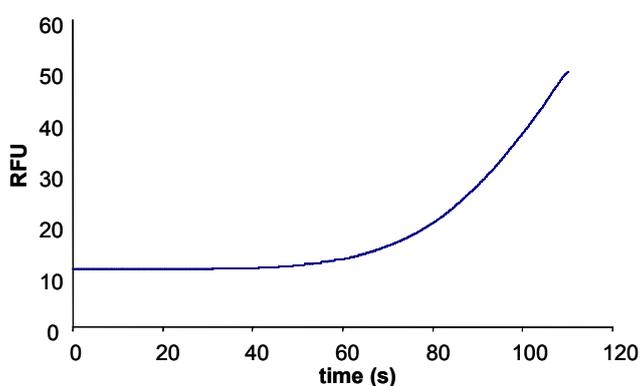


Figure 95 : Evolution du signal de fluorescence en fonction du temps de préconcentration de l'échantillon de fluoranthène (0,075 mg.mL<sup>-1</sup> dans eau/acétonitrile 75/25, v/v). Microsystème n°1 : voir Tableau 13. Phase mobile : tampon phosphate pH 6,8 en milieu eau-acétonitrile (80/20 v/v), force ionique = 1,75.10<sup>-3</sup> M. Injection en mode « gated » : 1 : 500 V, 2 : 500 V, 3 : 3000 V, 4 : -3000 V. Détection par fluorescence  $\lambda_{exc}$  = 310-390 nm à 0,7 mm, fréquence d'acquisition 15pts/s. Largeur de la fenêtre de détection de 0,15 cm.

Lors de l'étape d'éluion, représentée sur la Figure 96, une différence de potentiel est appliquée entre les réservoirs 2 et 4 contenant de la phase mobile (Acétonitrile - tampon phosphate 5 mM, pH 6,8 (80/20, v/v)), et des potentiels de retour sont imposés aux réservoirs 1 et 3 pour éviter une éventuelle entrée de l'échantillon contenu dans ce puits. Contrairement à la première étape la force éluante de la phase mobile est suffisamment importante pour éluier l'échantillon qui est ensuite détecté.

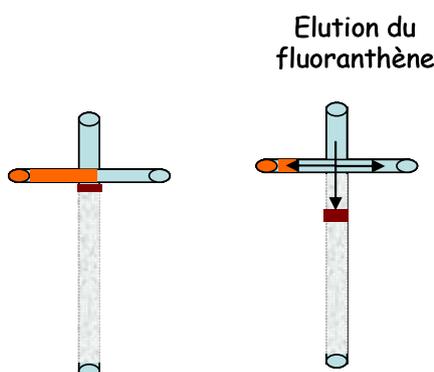


Figure 96 : Schémas résumant l'étape d'éluion de l'échantillon analysé

La Figure 97 montre la performance de l'étape de préconcentration. Ainsi, la hauteur du pic en unité de fluorescence est multipliée par un facteur 140 lorsque l'injection passe d'un mode pincé, soit une injection directe d'environ 50 pL d'échantillon, à une injection mettant en œuvre une étape de préconcentration d'environ 100 s. Dans les deux cas les pics observés ont une allure gaussienne.

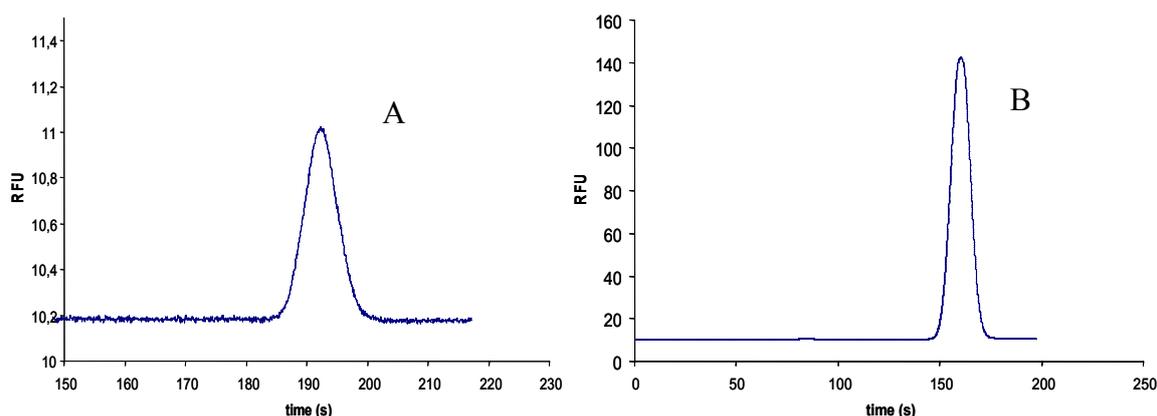


Figure 97 : Comparaison de l'allure du pic de fluoranthène ( $0,075 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans eau-acétonitrile 75:25, v/v) injection en mode pincé (A), injection avec préconcentration de 100 s (B). Microsystème n°3 : voir Tableau 13. Phase mobile : acétonitrile - tampon phosphate 5 mM, pH 6,8 (80:20, v/v), force ionique =  $1,75 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ . Champ électrique :  $247 \text{ V.cm}^{-1}$ . Détection par fluorescence  $\lambda_{\text{exc}} = 310\text{-}390 \text{ nm}$  à 3,5 cm, fréquence d'acquisition 15pts/s. Largeur de la fenêtre de détection de 0,15 cm. A : Volume injecté : 50 pL environ.

Le temps de rétention du fluoranthène est un peu plus faible pour l'étape de préconcentration par rapport à l'étape d'injection directe. Il est possible d'expliquer cette variation par la

différence existant entre les deux modes d'introduction du soluté dans le microcanal séparatif. En effet, lors d'une analyse comprenant une étape de préconcentration, la zone échantillon est dans la phase stationnaire avant le début de l'élution, tandis qu'une injection en mode pincé débute alors que le composé n'a pas encore atteint la colonne proprement dite. En effet, la phase stationnaire étant localisée quelques millimètres après le croisement des canaux, il existe un temps supplémentaire lors de ces analyses, comprenant la migration du soluté de la croix jusqu'en tête de colonne. Le temps de rétention des composés se trouve ainsi affecté par ces différents mode d'injection.

#### **4. 2     Couplage d'une étape de préconcentration à la séparation**

Après avoir démontré la possibilité de préconcentrer en tête de colonne du fluoranthène dans un microsystème, nous avons appliqué cette procédure à un mélange de plusieurs composés, trois HAP, tout d'abord préconcentrés puis séparés en ligne sur la phase contenue dans le microsystème. Ces expériences ont été menées pour des temps de préconcentration croissants de 60 à 250 secondes. La solution échantillon est composée d'eau et d'acétonitrile (50:50, v/v) et les composés sont à une concentration de 3,3 ppm pour le fluoranthène, de 5 ppm pour le benzo(k)fluoranthène, et de 33,3 ppm pour le benzo(k)anthracène. Là encore l'hydrophobie des composés étant importante, il est nécessaire de les solubiliser dans un milieu échantillon contenant 50% de solvant. Néanmoins, leur hydrophobie est telle qu'ils présentent toujours une affinité préférentielle pour la phase stationnaire.

Avant de réaliser une étape de percolation, l'échantillon est injecté selon le mode pincé et la Figure 98 présente l'électrophorégramme correspondant. Un seul pic est détectable sur cet électrophorégramme (composé benzo(k)anthracène). Ce pic nous servira de référence, nous permettant d'estimer la limite de détection bien que celle-ci ne soit pas atteinte (trois fois l'amplitude du bruit de fond).

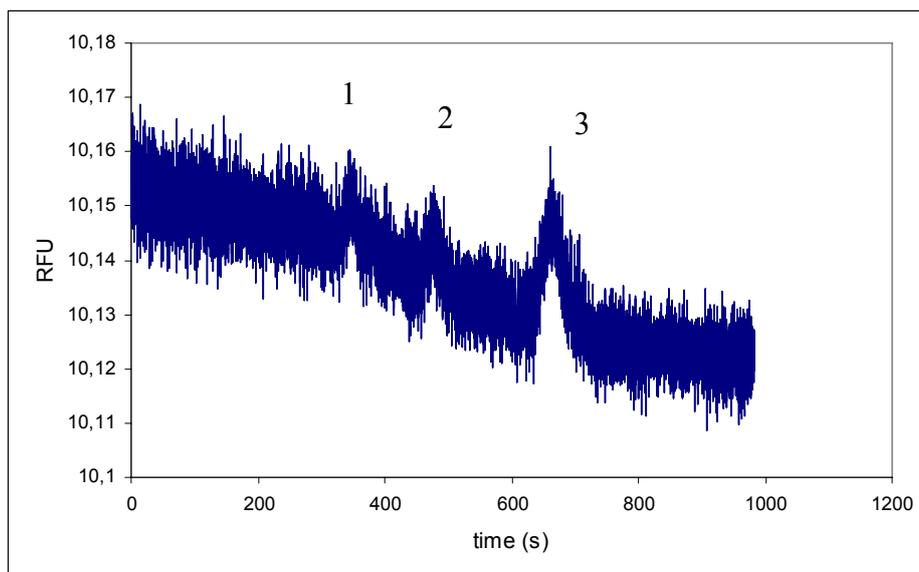


Figure 98 : Injection en mode pincé de trois HAP (fluoranthène (1), benzo(k)fluoranthène (2), benzo(k)anthracène (3)) aux concentrations respectives de 3,3 ; 5 et 33,3 ppm dans un milieu eau/acétonitrile, 50:50 v/v. Microsystème n°1 : voir Tableau 13. Electrolyte : tampon phosphate pH 6,8 en milieu eau-acétonitrile (80/20 v/v), force ionique =  $1,75 \cdot 10^{-3}$  M. Détection par fluorescence  $\lambda_{exc} = 310-390$  nm à 3,5 cm de la zone d'injection, fréquence d'acquisition 15pts/s. Largeur de la fenêtre de détection de 1,5 cm. Volume injecté : 50 pL. Champ électrique :  $247 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Etant donné la concentration utilisée, une injection en mode pincé classique n'est pas suffisante pour analyser correctement les composés du mélange, nous nous situons en dessous de la limite de détection. Bien que la séparation des trois composés semble réalisable, la sensibilité de la détection n'est pas suffisante pour nous assurer de leur présence ou vérifier que la séparation ait bien lieu. En utilisant le mode de préconcentration en « gated », utilisé dans le paragraphe précédent, des volumes plus importants peuvent être percolés au travers de la colonne. Un phénomène de préconcentration par interactions hydrophobes a alors lieu en tête de colonne. Après avoir percolé 100 secondes, la hauteur du pic du benzo(k)anthracène est augmentée très sensiblement, d'un facteur 100, et permet une réelle détection des composés. L'électrophorégramme de la Figure 99 présente la séparation très bien résolue du mélange des trois HAP obtenue après une étape de préconcentration de 100 secondes.

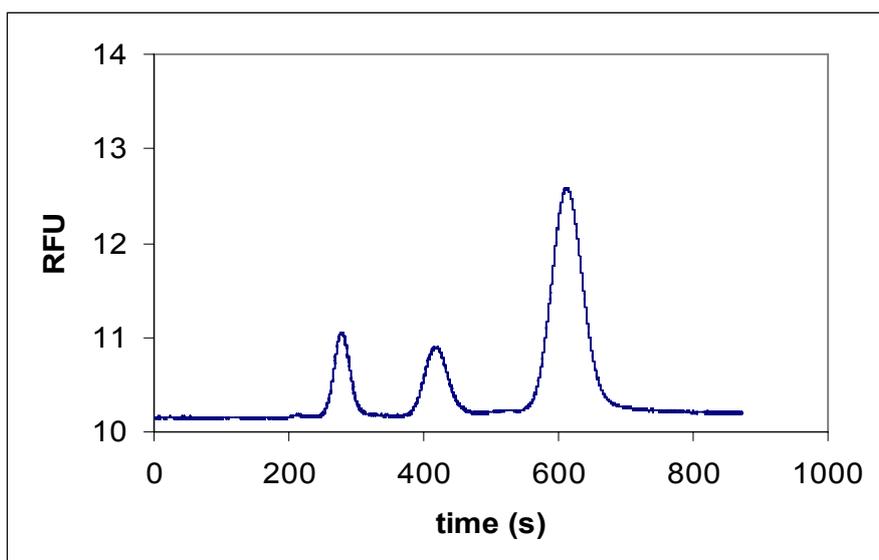


Figure 99 : Préconcentration de 100 secondes en mode « gated » de trois HAP (fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, benzo(k)anthracène) aux concentrations respectives de 3,3 ; 5 et 33,3 ppm dans un milieu eau/acétonitrile, 50:50 v/v. Microsystème n°1 : voir Tableau 13. Phase mobile : tampon phosphate pH 6,8 en milieu eau-acétonitrile (80/20 v/v), force ionique =  $1,75 \cdot 10^{-3}$  M. Détection par fluorescence  $\lambda_{exc} = 310-390$  nm à 3,5 cm, fréquence d'acquisition 15pts/s. Largeur de la fenêtre de détection de 1,5 cm. Champ électrique :  $247 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

L'évolution de plusieurs paramètres, tels que l'aire corrigée, la hauteur et l'efficacité d'un pic en fonction du temps de percolation ont été étudiés sur un composé du mélange, le fluoranthène. La Figure 100 représente l'évolution de l'aire corrigée en fonction du temps de préconcentration. Cette évolution est linéaire sur toute la gamme de temps expérimentée, le rendement est donc de 100%, il n'y a pas de fuite des composés.

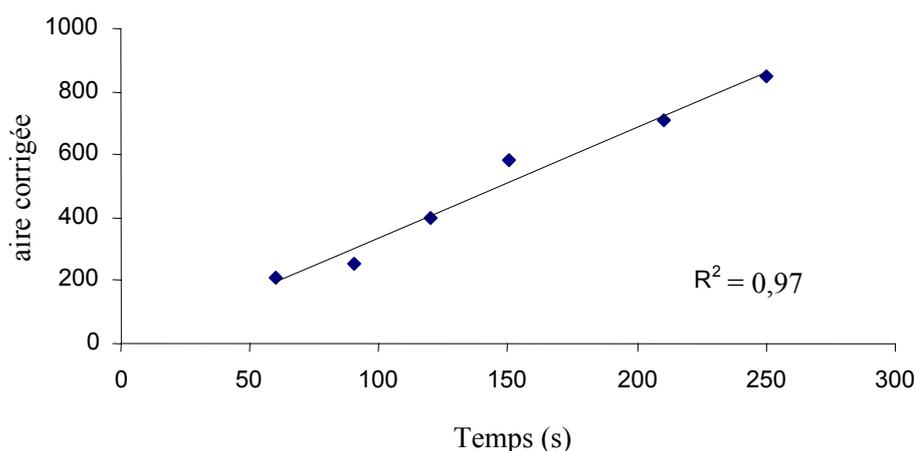


Figure 100 : Effet de la variation du temps de préconcentration sur l'aire corrigée du pic.

Nous nous sommes également intéressés à l'évolution de la hauteur du pic ainsi qu'à son efficacité pour déterminer quel est le temps de percolation optimum afin d'obtenir un

enrichissement maximum sans pour autant perdre trop sur les caractéristiques résolutive de la séparation. Ceci est représenté sur la Figure 101.

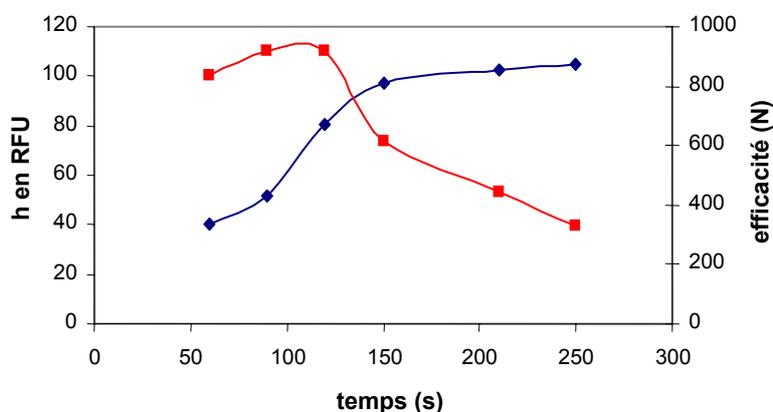


Figure 101 : Effet de la variation du temps de préconcentration sur la hauteur (◆) et sur l'efficacité (■) du pic de fluoranthène.

Sur ce graphique, il est possible d'observer un plateau à partir d'un temps de percolation de 150 secondes. Concernant l'efficacité, elle diminue d'environ 25% par rapport à son niveau initial à partir de 150 secondes également. C'est pourquoi nous considérerons que le phénomène de préconcentration suivi d'une séparation est réalisable jusqu'à un temps de percolation de 150 secondes, dans ces conditions expérimentales. Au-delà de ce temps de percolation, la séparation est de moins en moins performante.

### 4.3 Conclusion - perspectives

En conclusion, le transfert des méthodes séparatives et d'enrichissement a ainsi été réalisé avec succès sur des phases monolithiques photopolymérisées *in situ* en format microsystème. Les expériences réalisées jusqu'à maintenant permettent de montrer la faisabilité de cette étape de préconcentration sur ce format mais il est certain qu'une telle étape en tête de colonne est mal adaptée aux échantillons réels. Pour ces raisons, les développements ultérieurs de ce projet consistent tout d'abord en la localisation d'une phase stationnaire spécifique dans la zone d'injection, permettant ainsi de préconcentrer des composés cibles en percolant des volumes de l'ordre du microlitre, tout en éliminant les composés interférents issus de la matrice de l'échantillon. La Figure 102 présente un schéma de la zone d'injection contenant un monolithe dédié à l'extraction de composés cibles. Une deuxième étape, séparative, fait suite à l'étape de préconcentration et fait intervenir une deuxième phase stationnaire monolithique moins spécifique dans le canal de séparation, vers le puits 4 sur le schéma de la Figure 102.

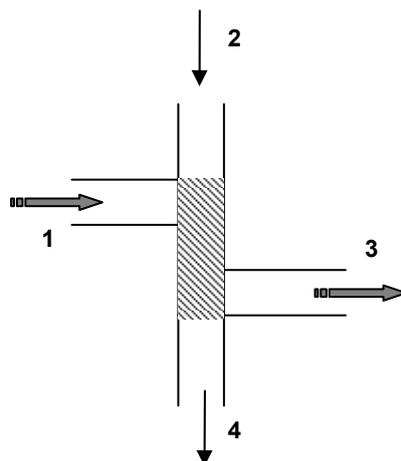


Figure 102 : Schéma de la chambre d'injection en double T d'un microsystème contenant une phase spécifique dans cette zone.

## 5. Vers des phases stationnaires spécifiques : développement de monolithes adaptés au greffage d'anticorps

Les phases monolithiques photopolymérisées possèdent un grand nombre de fonctionnalités disponibles, dépendant des monomères employés. Cependant, le développement de ces dernières nécessite d'être poursuivi pour certaines applications bien définies telles que l'isolement de composés cibles ou la préconcentration d'un composé particulier. Quelques approches ont été décrites afin de modifier la structure de base et l'adapter aux besoins de l'analyste par différents types de greffage. Notre objectif est de réaliser des phases spécifiques, greffées par des anticorps afin de les intégrer dans des microsystèmes, en tant que phase pour l'extraction spécifique de composés cibles.

La méthode développée permet le greffage orienté des anticorps et est réalisée dans des conditions plus douces pour les composés biologiques et plus rapides que celles décrites dans la littérature.

### 5.1 Etude bibliographique de la synthèse des phases monolithiques modifiées

La synthèse de phases monolithiques spécifiques nécessite soit l'utilisation d'un monomère comportant un groupement fonctionnel porteur de la spécificité à apporter, soit le greffage du composé spécifique à partir d'une fonctionnalité présente dans la structure monolithique. C'est cette deuxième méthode qui a été la plus développée car elle permet d'obtenir les groupements spécifiques à la surface de la phase stationnaire, contrairement à la première qui en inclut une partie dans la structure, diminuant ainsi le nombre de groupements accessibles. La première méthode décrite, et la plus employée à ce jour, consiste à synthétiser un

monolithe dont un monomère comporte une fonction époxyde tel que le glycidylméthacrylate. Ce groupement fonctionnel est ensuite ouvert pour former un groupement diol voire un aldéhyde pouvant réagir dans certaines conditions avec de nombreux groupements fonctionnels [1,2] comme l'illustre la Figure 103.

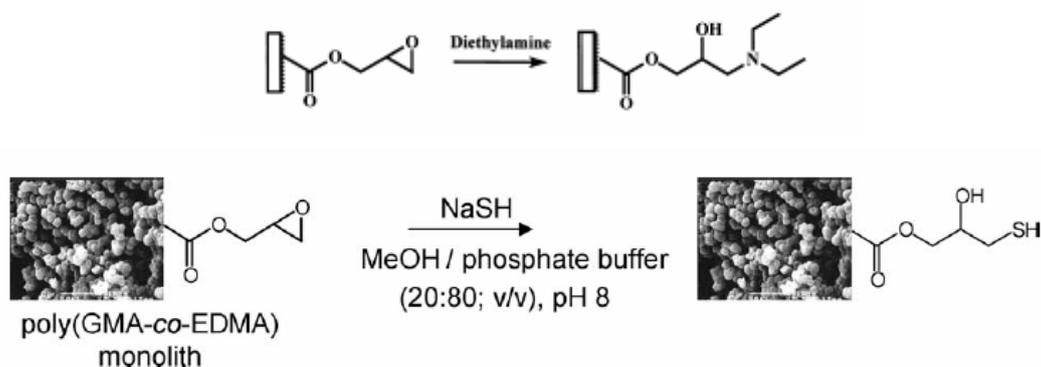


Figure 103 : Exemples de deux fonctionnalisations possibles du groupement époxy à la surface du monolithe permettant ensuite de réaliser d'autres réactions de greffage [1,2].

Cette approche a été développée par l'équipe de Svec et Fréchet [3] en 1996 pour la synthèse de bioréacteurs enzymatiques à base de trypsine et pour la chromatographie d'affinité [4,5]. Une publication récente présente les divers chemins réactionnels permettant de greffer des protéines à un monolithe contenant du glycidylméthacrylate [6] dont la Figure 104 donne un exemple.



Figure 104 : Schéma réactionnel global permettant de lier une protéine à une phase stationnaire comportant un groupement époxy [6].

Une autre méthode développée plus récemment par la même équipe consiste à synthétiser un monolithe contenant un monomère dont la fonctionnalité libre après polymérisation est un azlactone, le 2-vinyl-4,4-diméthylazlactone, Figure 105. Cette fonctionnalité permet de greffer des composés spécifiques selon le même mode que l'époxyde mais elle présente l'avantage d'être beaucoup plus réactive et donc de nécessiter un temps de réaction plus court, environ une heure. Cette approche a été développée pour la réalisation de bioréacteurs trypsiques [7].

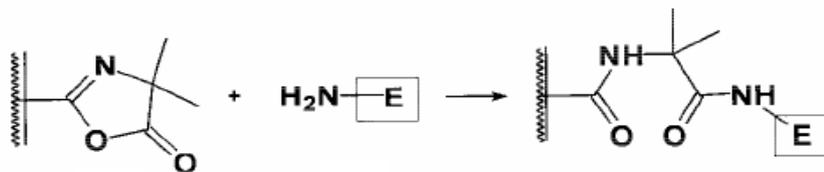


Figure 105 : schéma de la réaction de greffage d'un composé E possédant une fonction amine primaire sur l'azlactone du monolithe [7].

La dernière méthode permettant de greffer des composés sur une phase stationnaire monolithique, consiste en l'utilisation des fonctionnalités vinyloxy restantes à la surface du polymère. En effet, ces fonctions peuvent être employées pour des synthèses photoinitiées permettant de greffer des monomères sur l'ensemble de la surface irradiée du monolithe. Ce type de réaction de greffage est intéressant lorsque le composé à greffer contient aussi une fonction vinyle polymérisable. Cette approche développée toujours par le même groupe de Svec et Fréchet [8,9] s'appelle du photografting ou greffage photoinduit.

Toutes ces méthodes décrites précédemment apportent des solutions intéressantes et performantes quant au greffage de composés spécifiques sur un monolithe. Cependant, elles nécessitent des conditions de synthèse qui ne conviennent pas toujours à la bonne conservation du matériel biologique tel que les anticorps. Pour la méthode utilisant un époxyde, les temps de réaction sont longs, d'environ 16h. La méthode de greffage photoinduit nécessite l'utilisation de solvants organiques pour la synthèse et pour le rinçage de la phase greffée, ce qui n'est pas toujours compatible avec du matériel biologique. Les deux premières méthodes décrites, époxyde et azlactone, permettent de greffer des composés par leur groupement  $-NH_2$  quelle que soit la méthode employée. La protéine se liera donc à la phase stationnaire par son extrémité  $-NH_2$  terminale ou par une fonction  $-NH_2$  des acides aminés de la chaîne peptidique.

Dans le cas particulier des anticorps, le greffage par cette fonction amine terminale va engendrer une orientation plus ou moins favorable de l'anticorps. En effet, un anticorps est constitué de plusieurs chaînes peptidiques reliées entre elles par des ponts disulfure. Brièvement, il existe des chaînes lourdes et des chaînes légères qui, associées, donnent une forme de Y à l'anticorps. La Figure 106 illustre la structure et la composition en chaînes peptidiques d'un anticorps.

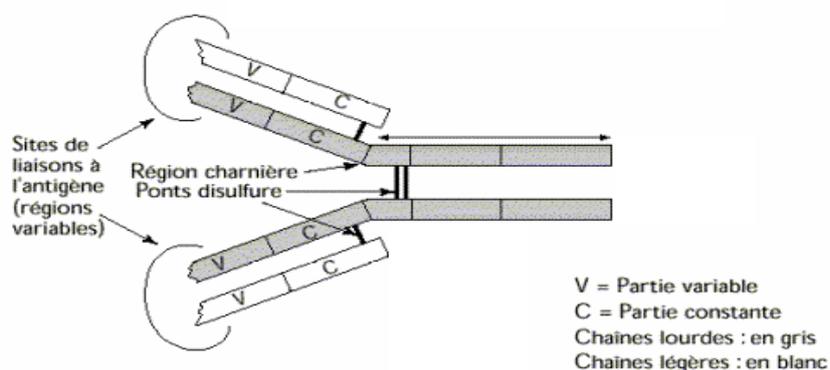


Figure 106 : Schéma de la structure d'un anticorps

Les différentes chaînes peptidiques présentent une extrémité acide carboxylique terminale et une extrémité amine primaire terminale. La structure d'un anticorps présente la particularité d'avoir les extrémités amine des chaînes peptidiques au niveau des sites de liaison aux antigènes. Cela signifie donc que les extrémités carboxyle se situent au niveau de la partie constante des chaînes légères et à la base du Y pour les chaînes lourdes. Le greffage de cette protéine par un de ses groupements amine va certes permettre de la fixer à un support, mais par un greffage non-orienté si bien qu'une partie des anticorps ne sera pas accessible aux solutés. C'est pourquoi il serait plus intéressant de greffer un anticorps de façon orientée sur le monolithe, c'est-à-dire en le fixant par une de ses extrémités carboxyle, de façon à rendre tous les sites de liaison accessibles aux solutés. Néanmoins, il ne faut pas négliger la présence de fonctions amine et carboxyle le long des chaînes polypeptidiques, en fonction de leur composition en acides aminés acides et basiques. Si ces groupements sont accessibles, ils deviennent alors des sites potentiels pour le greffage à une phase stationnaire et l'orientation n'est plus assurée.

Le greffage orienté des anticorps nous a semblé une approche intéressante et efficace pour réaliser un support monolithique spécifique. Nous nous sommes donc intéressés aux réactions permettant de greffer du matériel biologique en utilisant leurs fonctions carboxyle.

## 5.2 Développement d'une méthode permettant le greffage orienté d'anticorps

La réaction de greffage orienté utilisée est décrite dans divers traités biochimiques et de chromatographie d'affinité [10,11]. Elle permet de coupler un groupement amine primaire et un groupement carboxyle. Afin de vérifier le bon fonctionnement de cette réaction, nous allons tout d'abord la tester en greffant une diamine, l'éthylènediamine (EDA), sur les groupements carboxyle d'une phase stationnaire monolithique.

### 5. 2. 1 Synthèse et caractérisation du monolithe contenant des groupements carboxyle

Nous disposons de phases stationnaires dont le groupement fonctionnel chargé est l'acide acrylique sous sa forme acrylate, permettant d'obtenir un flux électroosmotique cathodique, représenté sur le schéma de la Figure 107.

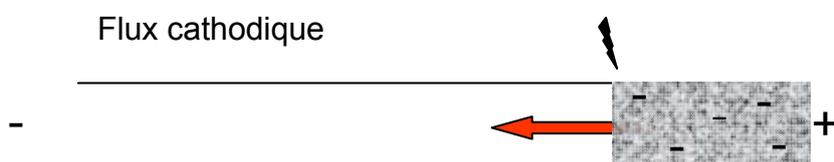


Figure 107 : Schéma du FEO engendré par les groupements carboxylates de la phase stationnaire monolithique.

Les premières expériences ont été réalisées sur des colonnes de 8,5 cm de longueur efficace, afin d'utiliser le côté court du capillaire. Ce choix se justifie par la moindre résistance à la pression opposée par une phase plus courte. Le protocole adopté consiste tout d'abord en la préparation d'une colonne monolithique à partir du mélange d'hexylacrylate, de butanediol diacrylate, et d'acide acrylique dont la composition est la même que celle décrite dans le chapitre 3. Une fois cette colonne rincée, des mesures du flux électroosmotique ont été entreprises. La colonne se situant du côté court du capillaire, les injections se font donc par le petit côté du capillaire. La Figure 108 présente l'électrochromatogramme d'une séparation d'alkylbenzènes sur une colonne dont un des monomères est l'acide acrylique, soit avant greffage. La mobilité électroosmotique mesurée est cathodique et a pour valeur  $40,4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  pour une phase mobile composée d'acétonitrile et de tampon phosphate 5 mM, pH=7,2 (80:20, v/v).

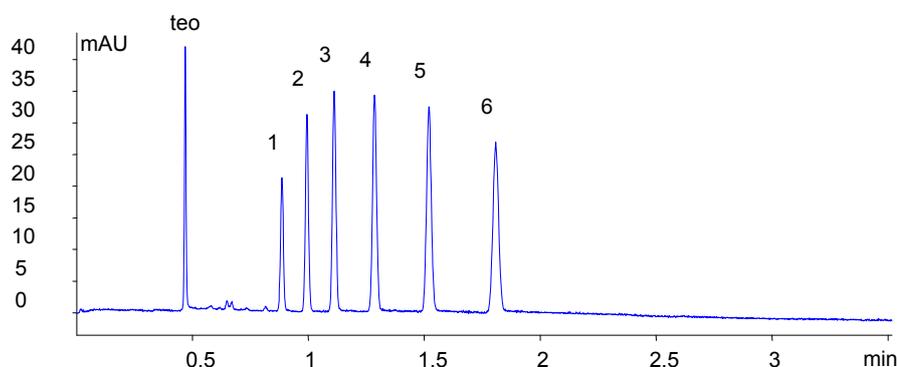


Figure 108 : Electrochromatogramme obtenu sur un monolithe non greffé, comprenant des fonctions carboxylate. Injection -3 kV, -3 sec. Phase mobile : acétonitrile-tampon phosphate 5 mM, pH=7,2 (80:20, v/v). Tension -25 kV. Composés : teo : formamide ; 1 : benzène, 2 : toluène, 3 : éthylbenzène ; 4 : propylbenzène ; 5 : butylbenzène ; 6 : pentylbenzène. L = 33,5 cm ; l = 8,5 cm.

Les analyses ont lieu en polarité positive, le monolithe présente bien un flux électroosmotique cathodique, comme attendu et la séparation présente des efficacités de l'ordre de 300 000 plateaux/m. La réaction de greffage par une diamine peut avoir lieu.

### 5. 2. 2 Réaction et protocole de greffage d'une diamine sur les groupements carboxyle

Une fois la phase négativement chargée obtenue, la procédure de greffage est mise en place et est schématisée sur la Figure 109. Elle consiste tout d'abord en un conditionnement du monolithe par le tampon phosphate des solutions de greffage. La colonne est conditionnée sous pression et sous tension par un mélange des solutions d'EDAC (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride) et de sulfo-NHS (N-hydroxysulfo succinimide ) dans un rapport 3/1 pendant 20 minutes. Puis la percolation sous pression et tension de la colonne par la solution du composé à greffer, l'éthylènediamine, intervient pendant 20 minutes. Ces deux étapes sont répétées deux fois et la colonne est ensuite rincée par le tampon phosphate 50 mM, pH = 7,1 et enfin conditionnée avec une phase mobile constituée d'acétonitrile et de tampon phosphate 50 mM, pH = 2,6.

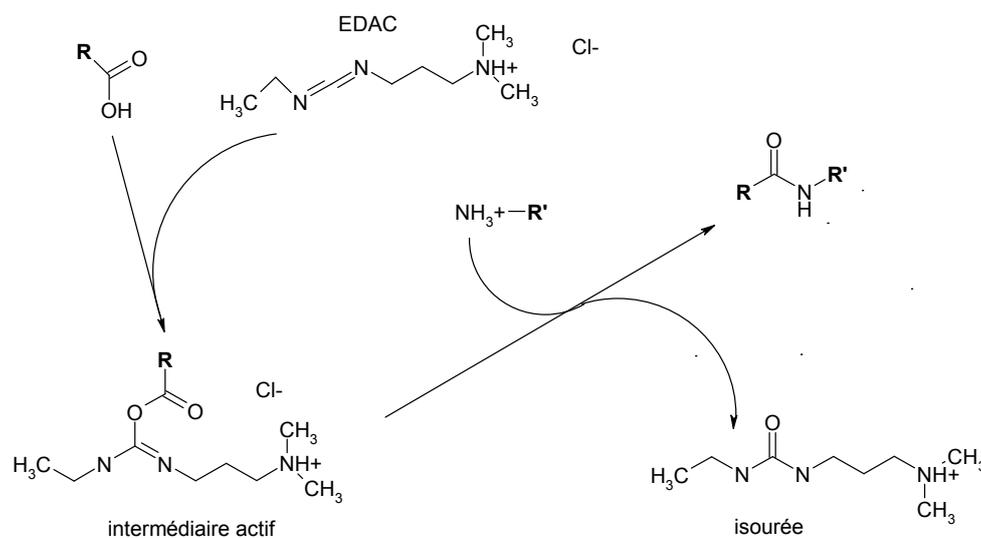


Figure 109 : Schéma de la réaction de greffage, l'EDAC réagit avec l'acide carboxylique pour former un ester actif intermédiaire. En présence d'une amine, une liaison amide est formée avec élimination d'un dérivé isourée. Cette réaction peut être réalisée en présence de sulfo-NHS, celui-ci formant un intermédiaire réactionnel esterifié stable subséquent à celui formé entre l'EDAC et l'acide carboxylique. Le sulfo-NHS est régénéré à la fin de la réaction de greffage.

Les solutions intervenant dans la réaction de greffage sont en solution dans un tampon phosphate à 50 mM, pH = 7,1. La solution d'EDAC est à 0,1 M dans le tampon phosphate décrit précédemment. Une solution de N-hydroxysulfo succinimide, ou sulfo-NHS, est également utilisée à 20 mM. Enfin l'éthylènediamine, EDA, est préparée à 1 M dans le

tampon phosphate. L'utilisation d'un carbodiimide couplé au sulfo-NHS permet d'obtenir une meilleure stabilité de l'intermédiaire réactionnel formé entre le carboxylate et le carbodiimide.

### 5. 2. 3 Caractérisation de la phase greffée présentant des groupements amine

Une fois le greffage des groupements carboxylate par l'EDA réalisé, le monolithe doit présenter des groupements amine et un flux électroosmotique anodique devrait être obtenu en se plaçant dans des conditions de phase mobile pour lesquelles l'amine greffée sera sous forme ammonium, soit à pH plutôt acide. La Figure 110 illustre le changement de groupement fonctionnel chargé du monolithe et les conditions de champ électrique nécessaires à l'obtention d'analyses.

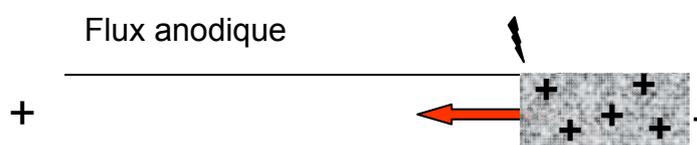


Figure 110 : Schéma du FEO engendré par les groupements amine protonés greffés sur les groupements carboxylate de la phase stationnaire.

Des mesures de flux électroosmotique ont ainsi été réalisées afin de vérifier son inversion par rapport aux analyses réalisées avant greffage. La Figure 111 présente l'électrochromatogramme d'une séparation obtenue sur la même colonne monolithique que la séparation présentée sur la Figure 108 mais greffée par la diamine selon le protocole décrit précédemment. La mobilité électroosmotique est anodique et a une valeur de  $-49,6 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , le système séparatif présente des efficacités de l'ordre de 100 000 plateaux/m.

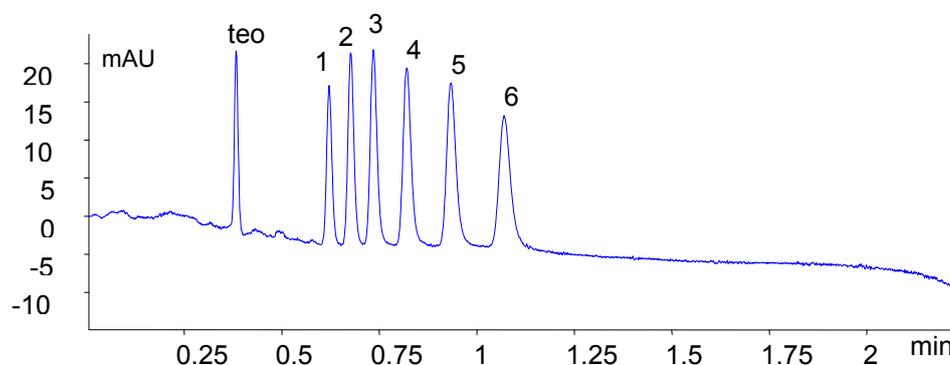


Figure 111 : Electrochromatogramme obtenu sur un monolithe greffé par de l'EDA. Séparation d'une série de 6 alkylbenzènes linéaires. Injection 3 kV, 3 sec. Phase mobile : acétonitrile-tampon phosphate 5mM, pH=2,18 (80:20, v/v). Tension +25 kV. Composés : teo : formamide ; 1 : benzène, 2 : toluène, 3 : éthylbenzène ; 4 : propylbenzène ; 5 : butylbenzène ; 6 : pentylbenzène. L = 33,5 cm ; l = 8,5 cm.

La comparaison des électrochromatogrammes des Figure 108 et Figure 111 nous permet de vérifier qu'il y a bien eu un greffage effectif des groupements carboxylate par l'EDA ce qui a conduit à une inversion du flux électroosmotique. Pour observer le flux, nous avons dû nous placer dans des conditions expérimentales adaptées impliquant l'inversion de la polarité des électrodes, et permettant l'ionisation des groupements carboxylate pour la phase non greffée (phase mobile à pH = 7,2) et après greffage, des groupements amine (pH = 2,18). Après avoir greffé les monolithes par de l'EDA, des expériences ont également été menées à différents voltages : -25 et +25 kV. Si le greffage est réussi nous devrions détecter nos composés en tension positive et ne rien détecter en tension négative. C'est ce qui a été observé et nous a permis de vérifier que le greffage a été effectif.

De plus, des expériences ont été menées à différents pH sur la phase non greffée, le FEO étant généré par les groupements carboxylate. Nous avons remarqué qu'à pH = 4,6 et à pH = 2,18 pour la phase mobile, les composés ne sont plus détectables et une ligne de base assez continue est obtenue. Il semblerait donc que les groupements carboxylate soient sous forme acide et ainsi le flux électroosmotique est quasi nul. A pH = 7,2 et 9,2, les groupements carboxylate sont chargés négativement et un FEO est généré permettant de réaliser des séparations.

Le procédé de greffage utilisant comme réactif de couplage le carbodiimide est donc envisageable sur les phases stationnaires monolithiques. Cependant, il faudrait poursuivre les expérimentations afin de vérifier que le protocole décrit est optimal concernant les conditions de la réaction de greffage.

#### *5. 2. 4 Perspectives : greffage d'anticorps*

Une fois ces expériences réalisées, il est possible de renouveler la réaction de greffage, cette fois à partir du groupement amine primaire greffé précédemment avec un des groupements carboxyle présentés par un anticorps. Ainsi, le monolithe présenterait un anticorps greffé par l'intermédiaire d'un bras espaceur constitué des deux carbones de l'éthylènediamine. Par manque de temps, nous n'avons pas pu réaliser cette étape ultérieure, mais ces expériences seront poursuivies prochainement.

Une alternative consiste à développer des monolithes comprenant un monomère présentant une fonctionnalité amine primaire afin de réaliser le greffage en une seule étape, en greffant directement l'anticorps sur cette fonction amine de la phase stationnaire. L'absence de bras

espaceur permettrait certainement de limiter les effets d'interactions non-spécifiques entre les composés cibles et la structure de la phase stationnaire.

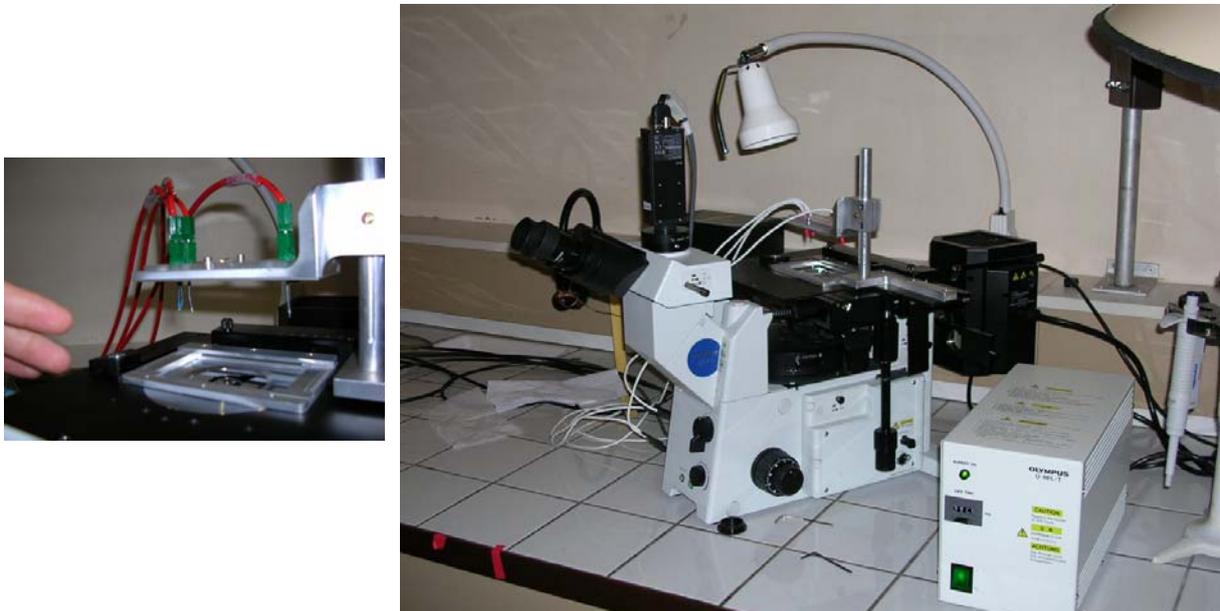
Une méthode originale est donc disponible pour la synthèse *in situ* de phases stationnaires monolithiques immunospécifiques. Cette procédure de greffage est prometteuse pour une transposition au format microsystème dont la géométrie des canaux peut être adaptée en vue d'effectuer les étapes d'extraction et de préconcentration spécifiques de composés cibles suivies de leur séparation.

## 6. Annexes

### 6.1 Description du montage et du matériel utilisé pour les microsytèmes

Le système est composé d'un microscope inversé Olympus, équipé d'une lampe à mercure. Différents cubes filtres peuvent être utilisés pour fixer la gamme de longueurs d'onde d'excitation. Différents objectifs ont été mis en oeuvre : 4x, 10x, 40x.

Deux types de potentiostat ont été utilisés pour appliquer les tensions au niveau de chacun des puits du microsysteme. Deux modèles Labsmith HVS 448 ont été utilisés, l'un permettant de couvrir une gamme de tension allant de 0 à 3000V et le second de 0 à 6000V.



En ce qui concerne les microsystèmes, ils proviennent de la société Micralyne et présentent les caractéristiques suivantes :

$l = 16\text{mm}$ ,  $L = 95\text{mm}$ , épaisseur totale = 2,2mm

Microsysteme de type simple croix en verre borosilicaté

Dimensions des canaux :

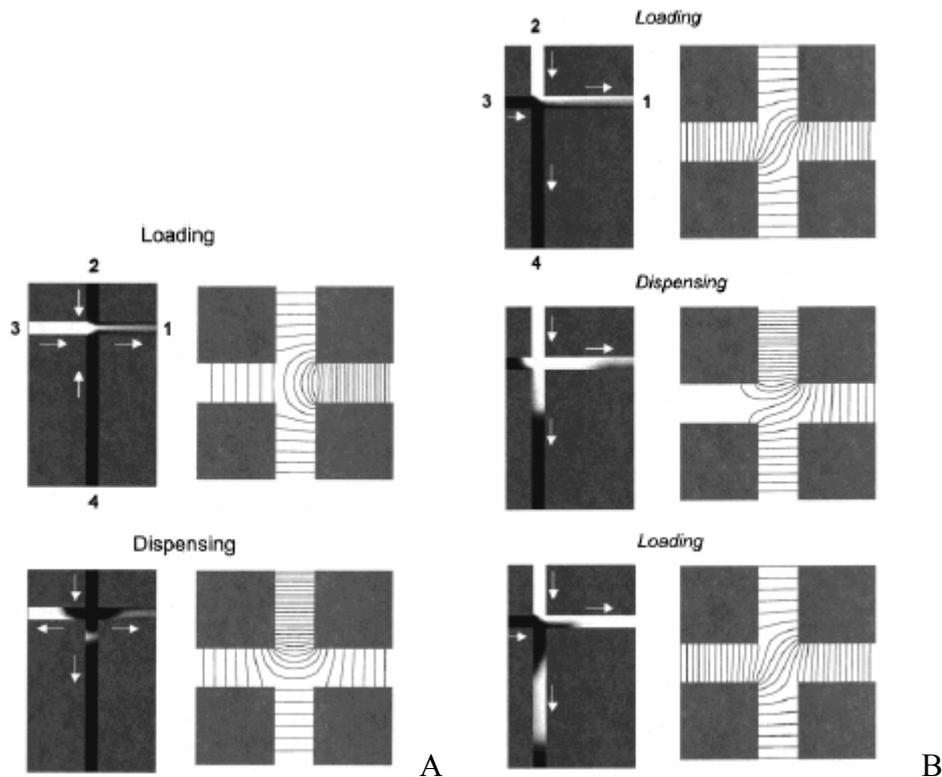
longueur du canal de séparation: 90,28 mm (80, 89 mm à partir de l'intersection des canaux)

Diamètre des puits :  $2\text{ mm} \pm 0,1\text{ mm}$

Largeur des canaux :  $50\text{ }\mu\text{m}$

Epaisseur des canaux :  $20\text{ }\mu\text{m}$

## 6.2 Modes d'injection en microsystèmes



Description et lignes de champ correspondant à une injection en mode pincé (A) et à une injection en mode « gated » (B) (S.V. Ermakov, S.C. Jacobson, J.M. Ramsey, *Analytical Chemistry* 72 (2000) 3512).

Lors de la phase de chargement (loading) de l'injection en mode pincé (A), une différence de potentiel est appliquée entre le réservoir 3 contenant l'échantillon et le réservoir 1 rempli d'électrolyte. L'échantillon se déplace ainsi en continu du réservoir 3 vers le réservoir 1. Simultanément, deux potentiels de confinement sont appliqués aux réservoirs 2 et 4 (contenant de l'électrolyte de séparation) pour permettre d'éviter la diffusion de l'échantillon au niveau de la chambre d'injection. Prenons l'exemple d'un microsysteme en verre où l'échantillon à analyser est un mélange de composés neutres suivant le flux électroosmotique. Le potentiel appliqué en 1 sera alors négatif et ceux en 2, 3 et 4 positifs, les potentiels appliqués en 2 et 4 étant plus faibles que celui appliqué en 3.

La seconde phase consiste en la séparation du mélange. Pour ce faire, une différence de potentiel est appliquée aux extrémités du canal entre 2 et 4, les réservoirs 1 et 3 étant soumis à des potentiels de retour. Dans le cas de l'exemple précédent, le potentiel appliqué en 2 sera positif alors que les potentiels appliqués en 1, 3 et 4 seront négatifs (ceux en 1 et 3 étant

moins négatif que celui en 4). Comme le montre la Figure A, le basculement de la phase de chargement à celle de séparation induit l'injection de l'échantillon.

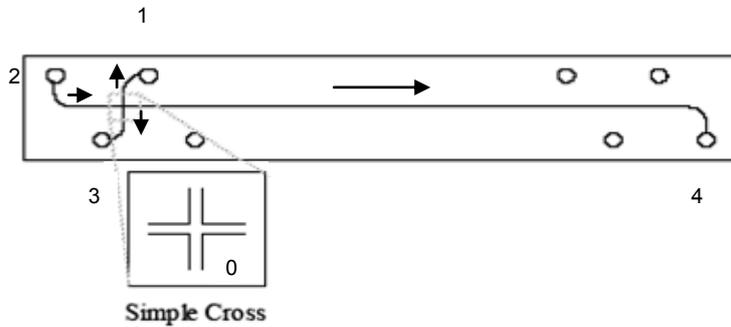
Contrairement à l'injection en mode pincé qui se déroule en deux phases, l'injection en mode « gated » comporte trois phases (B) : deux phases de chargement et une phase de séparation.

Lors de la première phase de chargement, une différence de potentiel est appliquée entre le réservoir 2 contenant l'échantillon et le réservoir 1 rempli d'électrolyte. L'échantillon se déplace ainsi continuellement du réservoir 2 vers le réservoir 1. Simultanément, deux potentiels sont appliqués aux réservoirs 1 et 4 (contenant de l'électrolyte de séparation) pour que l'échantillon ne diffuse pas. Dans un second temps, le potentiel appliqué en 3 est laissé flottant (proche de 0) et le potentiel conféré en 4 permet d'attirer une zone d'échantillon dans le canal de séparation. Si l'on garde l'exemple d'un microsystème en verre où l'échantillon à analyser est un mélange de composés neutres suivant le flux électroosmotique, le potentiel appliqué en 1 sera alors négatif et celui en 2 positif, les potentiels appliqués en 3 et 4 seront dans un premier temps négatifs et plus faibles que celui appliqué en 2, puis le potentiel 3 sera laissé flottant et le potentiel appliqué en 4 deviendra positif.

La dernière phase consiste en la séparation du mélange. Pour ce faire, les mêmes potentiels sont conservés en 1, 2 et 3. L'échantillon se déplace donc toujours de 2 vers 1 et le potentiel appliqué en 3 permet d'éviter l'observation de fuite. Cependant, le potentiel appliqué en 4 évolue pour conférer une plus grande différence de potentiel entre les puits 2 et 4, ce qui induit l'injection puis la séparation de la zone d'échantillon précédemment envoyée dans le canal de séparation. Dans le cas de l'exemple précédent, les potentiels appliqués en 2 et 3 seront positifs alors que ceux conférés en 1 et 4 seront négatifs, le potentiel en 4 étant plus important en valeur absolue que dans la phase précédente.

### 6.3 Calcul du champ électrique appliqué dans un microsystème lors d'une séparation

Le but de ce calcul est d'obtenir la valeur du champ électrique effectif que les composés perçoivent dans le canal de séparation. En utilisant les notations de la figure suivante, cela revient à calculer la différence de potentiel (V) entre le point 0 et le puits 4.



Le champ électrique effectif (E) vaut alors :

$$E = \frac{U_{40}}{L} = \frac{V_0 - V_4}{L} \quad (1)$$

où L est la longueur du canal de séparation, V le potentiel appliqué en un point et  $U_{40}$  la tension appliquée entre le point 0 et le puits 4.

Pour calculer la tension  $U_{40}$ , on commence par écrire la loi des nœuds au point 0 :

$$i_2 = i_1 + i_3 + i_4 \quad (2)$$

où i est le courant appliqué en un point

En appelant  $R_k$  la résistance électrique contenue dans une branche k, on a également via la loi d'Ohm :

$$i_k = \frac{U_{0k}}{R_k} = \frac{U_{4k} - U_{40}}{R_k} \quad (3)$$

On obtient alors en insérant l'expression 2 et après simplification :

$$U_{40} = \frac{\frac{U_{42}}{R_2} - \frac{U_{41}}{R_1} - \frac{U_{43}}{R_3}}{\frac{1}{R_4} + \frac{1}{R_2} - \frac{1}{R_3} - \frac{1}{R_1}} \quad (4)$$

On peut alors reconnaître le théorème de Millman. La résistance électrique de chaque branche étant proportionnelle à la longueur de celle-ci, on peut écrire :

$R_k = lR_0$  pour  $k = 1, 2, 3$  sachant que  $l_{01} = l_{02} = l_{03} = l$ , longueur adimensionnelle.

Et  $R_4 = L(R'+R_0)$

où  $R_0$  est la résistance de l'électrolyte dans un canal creux dépendant de la conductivité du tampon et de la section du canal et  $R'$  est la résistance due à la phase stationnaire. Les valeurs des courants obtenus en électrophorèse capillaire pour un capillaire silanisé ( $i_s$ ) et une colonne entièrement remplie ( $i_r$ ) de même dimension et dans les mêmes conditions expérimentales permettent de remplacer les résistances dans le calcul :

$$\frac{i_s}{i_r} = \frac{R'+R_0}{R_0} \quad (5)$$

En exprimant les tensions en fonction des potentiels au puits, on obtient finalement :

$$V_0 = \frac{V_1 + V_2 + \frac{V_4 i_r}{I_s}}{3 + \frac{i_r}{i_s}} \quad (6)$$

Après réinsertion de l'équation 6 dans l'équation 1, on obtient la valeur du champ effectif dans le canal de séparation.

## 7. Références bibliographiques

- [1] D. Sykora, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Journal of Chromatography A* 852 (1999) 297-304.
- [2] B. Preinerstorfer, W. Bicker, W. Lindner, M. Lämmerhofer, *Journal of Chromatography A* 1044 (2004) 187-199.
- [3] M. Petro, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Biotechnology and Bioengineering* 49 (1996) 355-363.
- [4] M. Bedair, Z. El Rassi, *Journal of Chromatography A* 1044 (2004) 177-186.
- [5] M. Bedair, Z. El Rassi, *Journal of Chromatography A* 1079 (2005) 236-245.
- [6] T. Jiang, R. Mallik, D.S. Hage, *Analytical Chemistry* 77 (2005) 2362-2372.
- [7] S. Xie, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Biotechnology and bioengineering* 62 (1999) 30-35.
- [8] U. Meyer, F. Svec, J.M.J. Fréchet, C.J. Hawker, K. Irgum, *Macromolecules* 33 (2000) 7769-7775.
- [9] T. Rohr, E.F. Hilder, J.J. Donovan, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Macromolecules* 36 (2003) 1677-1684.
- [10] L. Korecka, Z. Bilkova, M. Holeapek, J. Kralovsky, M. Bene, J. Lenfeld, N. Minc, R. Cecal, J.-L. Viovy, M. Przybylski, *Journal of Chromatography A* 808 (2004) 15-24.
- [11] *Chromatographie d'affinité, principes et méyhodes*, Pharmacia Fine Chemicals, 1979.



## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés au développement de phases stationnaires monolithiques photopolymérisées *in situ* tout d'abord en format capillaire puis en format microsysteme en vue d'applications analytiques par électrochromatographie.

Dans un premier temps, nous avons étudié les conditions de polymérisation de phases monolithiques à base d'acrylate. Pour ce faire, les conditions de prétraitement des parois internes du capillaire ainsi que l'énergie d'irradiation imposée ont été optimisées, et ce pour un mélange réactionnel préalablement mis au point. Cette étude a montré la nécessité d'une étape de prétraitement adaptée permettant l'attachement du monolithe aux parois du capillaire et l'amélioration des performances séparatives. L'étude sur l'énergie d'irradiation imposée nous a permis de mettre en évidence l'existence d'une plage d'énergies utilisables, depuis un seuil au dessus duquel il faut se placer pour l'obtention d'un matériau séparatif jusqu'à une énergie maximale au début de laquelle il y a dégradation du polymère. Par ailleurs, la répétabilité et la reproductibilité des caractéristiques séparatives de ces phases stationnaires monolithiques ont également été évaluées. Les résultats obtenus attestent de la bonne maîtrise des procédés de synthèse.

Dans un deuxième temps, nous avons caractérisé fonctionnellement les phases stationnaires ainsi synthétisées. Pour ce faire, la porosité des monolithes ainsi que le flux électroosmotique généré au sein de ceux-ci ont été déterminés. Ces études ont permis d'évaluer l'influence de la composition de la phase mobile sur ces deux paramètres. Le mode de rétention mis en jeu avec ces phases stationnaires a également été étudié. En effet, ces phases comportent des groupements fonctionnels de différentes natures et nos résultats ont mis en évidence qu'hormis les interactions hydrophobes, des interactions secondaires (dipôle-dipôle, donneur-accepteurs d'électrons, dipôle-ions) pouvaient intervenir. Par la suite, afin de vérifier la modularité des phases stationnaires monolithiques, nous avons développé des phases aux fonctionnalités variées à la fois en termes d'hydrophobie mais aussi de la nature et de la charge du monomère générant le flux électroosmotique. La synthèse de telles phases a nécessité dans un premier temps la mise au point des mélanges réactionnels. Dans un second temps, ces phases ont été évaluées en termes séparatifs et ont montré leur potentiel pour la séparation d'une large gamme d'analytes avec des efficacités élevées et, partant, une très bonne résolution.

En vue d'intégrer ces phases stationnaires dans des microsystèmes pour l'extraction sélective, la préconcentration et la séparation de composés d'intérêt, nous avons tout d'abord évalué le potentiel de ces phases pour la préconcentration en format capillaire. Des étapes de préconcentration ont été réalisées pour des composés de polarité variée et ont permis dans certains cas d'obtenir des facteurs d'enrichissement en signal de l'ordre de 18 000 par rapport à une injection classique. Par ailleurs, les étapes de préconcentration menées ont également permis d'améliorer les limites de détection pour des chlorophénols. Néanmoins, la percolation en tête de colonne étant de type hydrodynamique avec des pressions assez faibles, les temps de percolation sont extrêmement longs ; des percolations de type électrocinétique devraient également être testées.

Enfin, nous avons transposé la polymérisation *in situ* de ces phases monolithiques au format microsysteme. L'intérêt de la localisation de la zone polymérisée prend tout son sens dans ce type d'application ; en effet, nous avons pu confiner la présence de la phase stationnaire uniquement dans le canal de séparation du microsysteme. Dans un premier temps, une séparation de HAP a été optimisée ; celle-ci est effectuée avec une longueur utile de 1.5 cm, en moins de 4, minutes et avec de bonnes efficacités. Différents paramètres ont été étudiés tels que le champ électrique appliqué, la longueur utile ou les paramètres d'acquisition. Les résultats ont permis de mettre en évidence la présence d'effets extra-colonnes relativement importants. A l'avenir, il sera nécessaire de minimiser ceux-ci, notamment en diminuant la zone de canal vide comprise entre la zone d'injection et la zone du canal contenant la phase stationnaire. Par ailleurs, il reste de nombreux paramètres à optimiser, comme le montre la courbe de van Deemter réalisée en première approximation ; ainsi, des efficacités supérieures à 200 000 plateaux/m, qui sont celles obtenues actuellement, pourraient être atteintes en augmentant le champ électrique appliqué. Dans un deuxième temps, nous avons transposé avec succès la méthode de préconcentration optimisée en capillaire. Nous avons ainsi obtenu la préconcentration avec un facteur d'enrichissement d'au moins 140 suivie de la séparation de différents HAP. Finalement, afin d'obtenir une extraction et préconcentration spécifique de composés cibles, l'évaluation d'une méthode de greffage orientée d'anticorps a été développée en format capillaire. Les premiers résultats semblent prometteurs et cette étude devrait être menée à terme et testée en format capillaire, puis transposée en microsysteme.

Ces travaux ont permis la mise en place d'une nouvelle technologie de phases stationnaires tant en format capillaire qu'en format microsysteme, permettant des séparations et des extractions/préconcentrations performantes. L'objectif étant de pouvoir coupler ces deux

étapes dans des géométries de canaux adaptées à ces étapes de la chaîne analytique. Etant donnée la grande modularité de ces phases stationnaires et du format microsysteme, des applications très variées pourront être développées, permettant des séparations fondées sur des interactions spécifiques, des résolutions élevées résultant des très bonnes efficacités et des analyses à haut débit.

## **Publications et communications**

---

### **Publications**

- 1** Selection of two reliable parameters to evaluate the impact of the mobile phase composition on capillary electrochromatography performance with monolithic and particle-packed capillary columns  
F. Progent, V. Augustin, N. Thuy Tran, S. Descroix, M. Taverna  
Acceptée, *Electrophoresis à paraître*
- 2** In situ synthesis of monolithic stationary phase for electrochromatography: study of polymerization conditions  
V. Augustin, A. Jardy, P. Gareil and M-C. Hennion  
En correction, *Journal of Chromatography A*
- 3** On-line preconcentration of environmental interest compounds on monolithic column for electrochromatography and microsystems  
V. Augustin, G. Proczek, S. Descroix, P. Gareil, A. Jardy and M-C. Hennion  
En rédaction, *Analytical Chemistry*
- 4** Study of retention mechanism on monolithic column in capillary electrochromatography compared to reversed phase stationary phase in HPLC  
V. Augustin, G. Proczek, S. Descroix, A. Jardy and M-C. Hennion  
En rédaction, *Journal of Chromatography A*

### **Communications orales**

- 1** Les colonnes monolithiques en électrochromatographie capillaire : de nouvelles phases stationnaires  
V. Augustin, J. Dugay, A. Jardy and M-C. Hennion  
**AFSEP** meeting of a french society of separative sciences, Paris, France, March 4, 2004
- 2** Development of monolithic stationary phase in CEC for on-line preconcentration: environmental and biological applications  
V. Augustin, J. Dugay, A. Jardy and M-C. Hennion  
**HPLC 05**, Stockholm, Sweden, June 26-30, 2005

### **Communications sous forme de posters**

#### *Symposiums internationaux*

- 1** Synthesis and characterization of monolithic stationary phases for electrochromatography  
V. Augustin, J. Dugay, M-C. Hennion and A. Jardy  
**ESBC 2003**, International Symposium on Polymer designs for Bioseparation and Nanobiotechnology, Compiègne, France, November 27-29, 2003
- 2** Synthesis and characterizations of monolithic stationary phases for electrochromatography – comparison with MECC  
V. Augustin, J. Dugay, M-C. Hennion, A. Jardy  
**HPCE 2004**, International Symposium on Microscale Separations and Capillary Electrophoresis, Salzburg, Austria, February 8-12, 2004
- 3** Synthesis of monolithic columns for electrochromatography : application to on-column preconcentration of some phenol derivatives

V. Augustin, J. Dugay, A. Jardy and M-C. Hennion

**ISC 2004**, International Symposium on Chromatography, Paris, France, October 5-8, 2004

- 4 Stationary Phase in CEC: influence of polymerization energy and pretreatment procedures on the separation properties

V. Augustin, J. Dugay, A. Jardy and M-C. Hennion

**MSB 2005**, Microscale Bioseparations, New-Orleans, France, February 5-8, 2005

- 5 Preconcentration on monolithic stationary phase in CEC: environmental and biological applications

V. Augustin, J. Dugay, A. Jardy and M-C. Hennion

**MSB 2005**, Microscale Bioseparations, New-Orleans, France, February 5-8, 2005

*Symposiums nationaux*

- 6 Synthèse et caractérisation de phases stationnaires monolithiques en électrochromatographie capillaire

V. Augustin, J. Dugay, A. Jardy and M-C. Hennion

**Forum labo 2004**, Paris, France, Mars 8-10, 2004

- 7 Séparation et préconcentration en ligne en électrochromatographie capillaire et dans les microsystèmes analytiques : développement de phases stationnaires monolithiques, applications aux composés environnementaux et biologiques

V Augustin, G. Proczek, S. Descroix, P. Gareil, A. Jardy, M.-C. Hennion

**SCBA 2005**, Montpellier, France, September 25-29, 2005